

УДК 577.1+599:539.1.047

*В. А. ГОЛОВАЧ¹, М. М. ЗАФРАНСКАЯ¹, К. Я. БУЛАНОВА¹,
В. Э. СЯХОВИЧ¹, А. С. ЩЕКОЛОВА², С. В. КВАЧ²,
член-корреспондент А. И. ЗИНЧЕНКО², С. Б. БОКУТЬ¹*

ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ БИС-(3',5')-ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИМЕРНОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА С ТЕТРАМЕРАМИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

¹Международный государственный экологический
университет им. А. Д. Сахарова, Минск

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

Поступило 04.08.2014

Введение. Гемоглобин представляет собой тетрамерный аллостерический белок, выполняющий две важнейшие биологические функции: транспорт молекулярного кислорода из легких к периферическим тканям и перенос углекислого газа и протонов от периферических тканей к дыхательным органам для последующего выведения из организма. Эффективность функционирования гемоглобина в качестве переносчика кислорода зависит от связывания эндогенных гетеротропных эффекторов, таких как 2,3-дифосфоглицерат (DPG), двуокись углерода, протоны и хлорид-ионы, которые модулируют аффинность к кислороду и кооперативное поведение тетрамеров белка. С другой стороны, описан целый ряд синтетических лигандов, которые также способны связываться с гемоглобином и модулировать его транспортную активность путем сдвига равновесия от Т-состояния к R-состоянию гемопротейда и наоборот [1]. Способность синтетических эффекторов аллостерически регулировать это равновесие в любом направлении представляет огромный интерес для медицины вследствие их практической значимости. Эффекторы, которые сдвигают аллостерическое равновесие в сторону высокоаффинного состояния гемоглобина, определены клинически как агенты, пригодные для лечения серповидноклеточной анемии, поскольку повышение аффинности S-гемоглобина к кислороду способствует увеличению его растворимости и препятствует, тем самым, формированию полимеров гемопротейда [2; 3]. В то же время соединения, которые сдвигают равновесие в сторону низкоаффинного состояния гемоглобина и усиливают доставку кислорода к тканям рассматриваются как потенциальные препараты для терапии гипоксических и ишемических состояний [4; 5].

Ранее было установлено [6], что ряд широко распространенных соединений нуклеиновой природы, к которым относятся АТФ, никотинамидадениновые динуклеотиды (NADPH, NADP и NADH), а также диаденозинполифосфаты (Ar_nA) являются мощными эндогенными аллостерическими эффекторами, способными связываться с тетрамерами гемоглобина человека в его низкоаффинном Т-состоянии и стабилизировать гемопротейд в Т-конформации. Существенным структурным сходством (рис. 1) с никотинамидадениновыми динуклеотидами и Ar_nA обладают некоторые не свойственные для эукариотических клеток необычные циклические динуклеотиды, в частности, бис-3',5'-циклический димерный гуанозинмонофосфат (с-di-GMP), физиологические эффекты и различные терапевтические активности которого вызывают в последнее время повышенный интерес исследователей [7].

Если поведение никотинамидадениновых динуклеотидов и Ar_nA в качестве регуляторов функции гемоглобина описано [6], то данные о роли с-di-GMP как возможного гетеротропного эффектора, способного влиять на аллостерические свойства данного гемопротейда, в литературе отсутствуют.

Поскольку, как естественные [1; 8], так и синтетические [1; 8] гетеротропные эффекторы способны взаимодействовать не только с дезокси-, но и оксиформой гемоглобина человека, в настоящей работе сделана попытка методами молекулярного моделирования и ингибиторного анализа с использованием стационарной флуоресцентной спектроскопии охарактеризовать сайты связывания c-di-GMP в тетрамерах основной формы гемоглобина человека (HbA₁) в оксигенированном R-состоянии.

Материалы и методы исследования. Гемоглобин выделяли методом ионообменной колоночной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе DE-52. Концентрацию гемоглобина на всех стадиях выделения и очистки определяли спектрофотометрически, используя для расчетов молярный коэффициент поглощения, равный при 541 нм $13,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [9]. C-di-GMP синтезировали из GTP с помощью рекомбинантной дигуанилатциклазы [10].

Ингибиторный анализ проводили методом стационарной флуоресцентной спектроскопии. Ингибирующее действие c-di-GMP на взаимодействие 1-анилинонафталин-8-сульфоната (1,8-ANS) с гемоглобином оценивали по параметрам флуоресценции 1,8-ANS при его связывании с тетрамерами гемопротейда. Спектры флуоресценции 1,8-ANS регистрировали при 20 °С в термостабируемой кювете. Ширина щелей на возбуждение и регистрацию флуоресценции составляла 7,5 нм. Сродство гемоглобина к 1,8-ANS в отсутствие и в присутствии c-di-GMP определяли по значениям констант диссоциации (K_S), которые рассчитывали из концентрационных кривых насыщения при длине волны регистрации флуоресценции $\lambda_{em} = 486 \text{ нм}$ с использованием программы Enzfitter. Константы ингибирования (K_i) рассчитывали с использованием программного обеспечения Enzyme Kinetics Pro (Chem SW).

Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой доверительные интервалы среднего арифметического для 95 %-ного уровня вероятности.

Результаты и их обсуждение. Известно, что добавление 1,8-ANS в раствор оксигемоглобина человека с последующим увеличением концентрации зонда приводит к снижению интенсивности белковой флуоресценции, сдвигу максимума люминесценции 1,8-ANS с 550 нм для водного раствора до ~486 нм в присутствии белка и увеличению интенсивности флуоресценции зонда в области 470–486 нм [11]. Указанное поведение 1,8-ANS в растворе оксигемоглобина позволяет количественно охарактеризовать взаимодействие зонда с HbA₁. Количественной мерой связывания 1,8-ANS с HbA₁ могут служить K_S , рассчитываемые из зависимостей обратной величины интенсивности флуоресценции зонда от обратной величины его концентрации в растворе оксигемоглобина. Как следует из данных таблицы, процесс взаимодействия 1,8-ANS с тетрамерами HbA₁ характеризуется двумя K_S . Для диапазона концентраций зонда $1,25\text{--}9,95 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ в отсутствие c-di-GMP значение первой K_S^1 составляет величину, равную $3,11 \pm 0,30 \cdot 10^{-6} \text{ М}$. В интервале концентраций 1,8-ANS $9,95\text{--}39,2 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ обнаруживается вторая K_S^2 , равная $1,54 \pm 0,08 \cdot 10^{-5} \text{ М}$. Двойной набор K_S указывает на существование двух типов центров связывания 1,8-ANS в тетрамерной молекуле HbA₁. Приведенные выше результаты хорошо согласуются с данными анализа кривых затухания флуоресценции 1,8-ANS в растворе HbA₁, полученными методом лазерной спектродиффузиометрии с субнаносекундным временным разрешением [12]. Так, кинетики затухания флуоресценции зонда содержат компоненты со средним временем жизни <0,5 нс, 3,1–5,5 нс и 12,4–15,1 нс; при этом наиболее короткоживущая компонента относится к молекулам 1,8-ANS, находящимся в водной фазе, а две долгоживущие компоненты характеризуют два типа центров связывания 1,8-ANS в тетрамерах HbA₁, различающихся полярностью и доступностью для молекул воды.

В последнее время представления о природе сайтов связывания 1,8-ANS в белках претерпели ряд существенных изменений. Вследствие двойственной природы зонда, который может существовать как в виде нейтральной гидрофобной молекулы, так и в виде иона, процесс связывания 1,8-ANS в первую очередь определяется электростатическим взаимодействием его сульфатной группы с катионными группами (остатками Lys, His и Arg) водорастворимых белков [13].

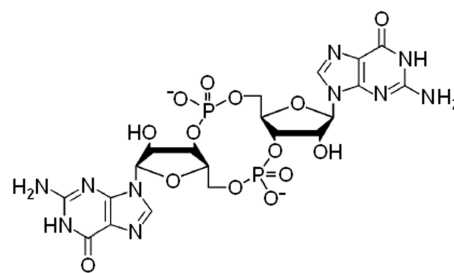


Рис. 1 Структурная формула бис-(3',5')-циклического димерного гуанозинмонофосфата

**Ингибирующее действие с-di-GMP на связывание 1,8-ANS с гемоглобином человека
в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4)**

Интервал концентраций 1,8-ANS, 10^{-6} М	Концентрация с-di-GMP, 10^{-6} М	Тип ингибирования	K_S^1 , 10^{-6} М	K_S^2 , 10^{-5} М	K_i^K , 10^{-5} М	K_i^H , 10^{-4} М
1,25–9,95	– 20 40	Конкурентный	$3,11 \pm 0,30$ $5,49 \pm 0,17$ $7,04 \pm 0,26$		$2,91 \pm 0,54$	
9,95–39,2	– 20 40	Неконкурентный		$1,54 \pm 0,08$ $1,54 \pm 0,08$ $1,54 \pm 0,08$		$0,79 \pm 0,11$

Примечание. Длина волны регистрации флуоресценции $\lambda_{em} = 486$ нм. Длина волны возбуждения $\lambda_{ex} = 296$ нм; $[HbA_1-O_2] = 20 \cdot 10^{-6}$ М; $T = 20$ °С. * – K_i^K – константа ингибирования для конкурентного типа; ** – K_i^H – константа ингибирования для неконкурентного типа.

Основываясь на склонности 1,8-ANS взаимодействовать с катионными группами белков и формировать при этом свое гидрофобное микроокружение, которое обеспечивает флуоресценцию зонда [13], установлено, что наиболее специфичным участком связывания 1,8-ANS в молекуле оксигемоглобина HbA₁ является регуляторный DPG-связывающий сайт белка [14], расположенный у β -входа в центральную полость тетрамеров и представленный кластером из восьми положительно заряженных остатков Val NA1, His NA2, Lys EF6 и His H21 в каждой β -цепи.

Принимая во внимание приведенные выше рассуждения, можно утверждать, что первая из обнаруженных K_S^1 (таблица) характеризует взаимодействие зонда в центральной регуляторной области тетрамеров HbA₁, а вторая K_S^2 относится к поверхностным участкам в молекулах гемоглобина, которые отличаются большей доступностью для молекул воды.

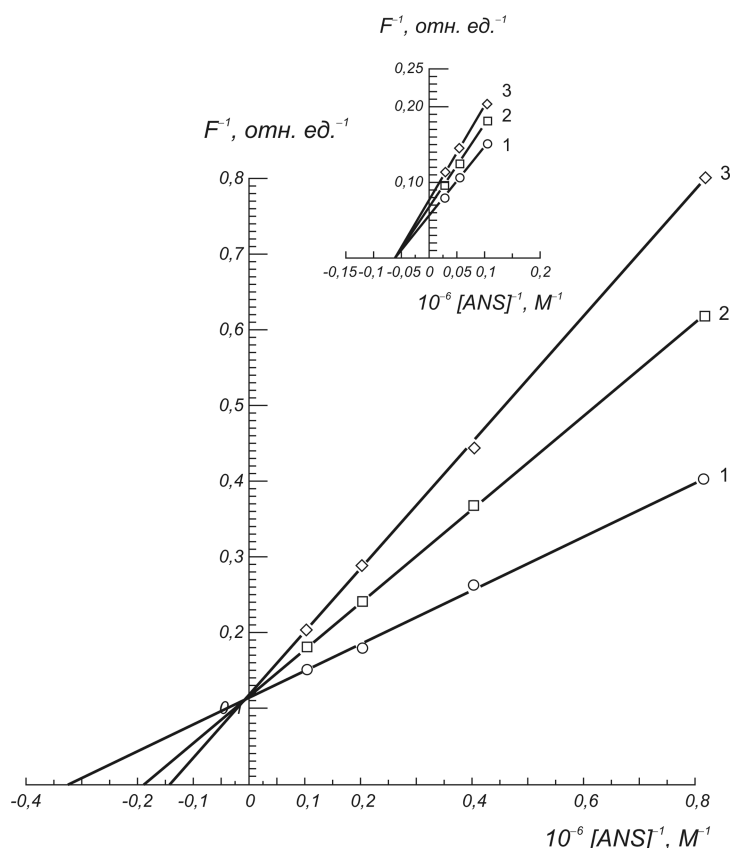


Рис. 2. Ингибирующее действие с-di-GMP на связывание 1,8-ANS с оксигемоглобином человека в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4) при 20 °С: 1 – в отсутствие с-di-GMP; 2 – 20 мкМ с-di-GMP; 3 – 40 мкМ с-di-GMP. Длина волны возбуждения $\lambda_{ex} = 296$ нм, длина волны испускания $\lambda_{em} = 486$ нм; $[HbA_1-O_2] = 20$ мкМ

Экспериментально доказать способность *c*-di-GMP связываться с тетрамерами HbA₁ можно путем сравнительного изучения флуоресцентных характеристик 1,8-ANS в растворе гемопротейда как в отсутствие, так и в присутствии *c*-di-GMP. На рис. 2 в координатах Лайнуивера–Берка приведены зависимости интенсивности флуоресценции 1,8-ANS от его концентрации в отсутствие (прямые 1) и в присутствии (прямые 2, 3) разных концентраций *c*-di-GMP. Из этого рисунка и таблицы следует, что при концентрациях зонда $1,25-9,95 \cdot 10^{-6}$ М *c*-di-GMP оказывает на взаимодействие 1,8-ANS с гемоглобином ингибирующее действие конкурентного типа, а при концентрациях 1,8-ANS $9,95-39,2 \cdot 10^{-6}$ М ингибирование становится неконкурентным. Величины констант ингибирования, рассчитанные для первого K_i^K и второго K_i^H интервалов концентраций зонда, составляют при 20 °С $2,91 \pm 0,54 \cdot 10^{-5}$ М и $0,79 \pm 0,11 \cdot 10^{-4}$ М соответственно (таблица).

Результаты молекулярного моделирования комплексов *c*-di-GMP с гемоглобином человека в окислительном состоянии показали, что *c*-di-GMP связывается с тетрамерами гемоглобина человека в R-состоянии со стороны β-входа в центральную регуляторную полость гемопротейда в DPG-связующем сайте белка.

В стабилизации комплекса димерного циклодигуанилата с оксигемоглобином принимают участие многочисленные водородные связи, возникающие, главным образом, между остатками LysEF6 и HisH21 β-цепей белка и, в зависимости от ориентации, атомами N7, O⁶, N² азотистых оснований и 2'ОН-группами рибозы циклодигуанилата, а также солевые мостики между протонированными ε-аминогруппами LysEF6 и ионизованным кислородом фосфатных групп *c*-di-GMP.

Заключение. Молекулярные модели комплексов *c*-di-GMP с оксигемоглобином человека HbA₁ показывают, что одним из сайтов связывания изученного алармона в олигомерах данного белка является его центральная регуляторная область. Полученные модели хорошо согласуются с данными ингибирующего действия *c*-di-GMP на связывание 1,8-ANS с HbA₁. При низких концентрациях 1,8-ANS наблюдается ингибирующее действие циклической диугуаниловой кислоты конкурентного типа на взаимодействие зонда с HbA₁. Такой характер ингибирования и молекулярные модели указывают на то, что *c*-di-GMP специфично связывается в DPG-сайте центральной полости олигомеров гемоглобина, что подтверждается численным значением ($2,91 \pm 0,54 \cdot 10^{-5}$ М) константы конкурентного ингибирования. При концентрациях 1,8-ANS выше насыщающей ($\sim 10 \cdot 10^{-6}$ М) молекулы зонда и, возможно, *c*-di-GMP взаимодействуют с разными и менее специфическими поверхностными участками оксигемоглобина.

Таким образом, обнаруженная способность *c*-di-GMP связываться с тетрамерами гемоглобина человека со стороны β-входа в центральную полость в DPG-связующем сайте позволяет рассматривать данное соединение подобно другим эффекторам, таким как DPG, инозитолгексафосфат и инозитолтриспирофосфат [1] в качестве аллостерического регулятора транспортной функции гемоглобина человека, склонного понижать аффинность гемоглобина к кислороду.

Литература

1. Safo M. K., Ahmed M. H., Ghatge M. S., Boyiri T. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. Vol. 1814. P. 797–809.
2. Nnamani I. N., Joshi G. S., Danso-Danquah R. et al. // Chem. Biodivers. 2008. Vol. 5. P. 1762–1769.
3. Abdulmalik O., Safo M. K., Chen Q. et al. // Br. J. Haematol. 2005. Vol. 128. P. 552–561.
4. Watanabe T., Takeda T., Omiya S. et al. // J. Am. Coll. Cardiol. 2008. Vol. 52. P. 779–786.
5. Kieda C., El Hafny-Rahbi B., Collet G. et al. // J. Mol. Med. 2013. Vol. 91. P. 883–899.
6. Bonaventura C., Cashon R., Colacino J. M., Hilderman R. H. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 4652–4657.
7. Kalia D., Mery G., Nakayama S. et al. // Chem. Soc. Rev. 2013. Vol. 42. P. 305–341.
8. Laberge M., Kövesi I., Yonetani T., Fidy J. // FEBS Lett. 2005. Vol. 579. P. 627–632.
9. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Amsterdam, 1971.
10. Korovashkina A. S., Rymko A. N., Kvach S. V., Zinchenko A. I. // J. Biotechnol. 2012. Vol. 164, N 2. P. 276–280.
11. Паруль Д. А., Бокуть С. Б., Киселев П. А. и др. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 481–488.
12. Parul D. A., Bokut S. B., Milyutin A. A. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2000. Vol. 58. P. 156–162.
13. Matulis D., Lovrien R. // Biophys. J. 1998. Vol. 74. P. 422–429.
14. Syakhovich V. E., Parul D. A., Ruta E. Ya. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 317. P. 761–767.

*V. A. GOLOVACH, M. M. ZAPHRANSKAYA, K. Ya. BULANOVA, V. E. SYAKHOVICH, A. S. SHCHOKOLOVA,
S. V. KVACH, A. I. ZINCHENKO, S. B. BOKUT*

microbio@mbio.bas-net.by

**PECULIARITY OF BIS-(3', 5')-CYCLIC DIMERIC GUANOSINE MONOPHOSPHATE BINDING
TO HUMAN HEMOGLOBIN TETRAMERS**

Summary

Molecular modeling complexes of bis-(3', 5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) with human oxyhemoglobin HbA₁ and the analysis of the cyclic diguanylic acid inhibitory effect on the binding of 1,8-ANS to HbA₁ carried out by the steady-state fluorescence spectroscopy showed that the most specific binding site of c-di-GMP in hemoglobin oligomers is the central regulatory region of this protein (competitive inhibition constant is $2.91 \pm 0.54 \cdot 10^{-5}$ M). At high concentrations of 1,8-ANS c-di-GMP inhibitory effect on the probe binding is non-competitive (non-competitive inhibition constant is $0.79 \pm 0.11 \cdot 10^{-4}$ M), indicating the ability of c-di-GMP interact with less specific surface areas of human oxyhemoglobin.