

Piotr Duchnowicz, Wirgiliusz Duda

PODSTAWOWE ZAGADNIENIA EWOLUCJI HEMOGLOBIN

Artykuł przedstawia zagadnienia dotyczące ewolucji hemoglobiny. Omówione zostały główne etapy ewolucji tego białka – rodowód genów globiny, powstanie tetrameru i jego rozpuszczalność oraz regulacja funkcji utlenowania hemoglobiny przez efekторы allosteryczne. Omówiona została duplikacja genów przy tworzeniu hemoglobiny zarodkowej i embrionalnej oraz szybkość ewolucji tego białka u kręgowców. Przedstawiono udział eksonów, intronów i pseudogenów w procesie ewolucji globiny i możliwości przyspieszenia ewolucji białka przez rekombinacje pomiędzy eksonami i intronami.

Hemoglobina jest jednym z najlepiej poznanych białek. Dużo publikacji poświęcono studiom nad ewolucją tego białka. Do niedawna jedyne źródłami informacji w badaniach nad ewolucją białek były dane uzyskane z sekwencji aminokwasowej, porównania immunologicznego, struktury trójwymiarowej i właściwości funkcjonalnych. Obecnie wszystkie geny globiny człowieka zostały sklonowane i poznano ich sekwencje w DNA oraz ustalono lokalizacje w chromosomach. Odkrycie niekodujących fragmentów („intronów”) i sekwencji „flankujących” dodatkowo zwiększa możliwości poznania ewolucji hemoglobiny [13]. Przyjmuje się, że ewolucja hemoglobiny mogła zachodzić dwoma drogami: poprzez selekcję adaptacyjną oraz drogą zmian neutralnych; która z tych dróg dostarczyła większej ilości zmian jest obecnie dyskutowane przez wielu badaczy. Wiadomo jednak, że obie drogi mają w tym swój udział. Być może szybki postęp w badaniach nad ewolucją białek i wprowadzanie nowych technik obliczeniowych pozwala odpowiedzieć na to pytanie. Niniejszy artykuł przedstawia stan wiedzy o ewolucji hemoglobiny opartej na podstawowej aktualnie literaturze przedmiotu.

RODOWÓD GENÓW GLOBINY

Hemoglobina jest białkiem występującym bardzo szeroko, została znaleziona nie tylko wśród bezkręgowców i kręgowców, ale także u roślin i bakterii [32]. Tak szerokie występowanie w świecie żywym jednego, specyficznego białka daje podstawę do zadania pytania – czy hemoglobiny tych rozmaitych organizmów „są spokrewnione” ze sobą poprzez wspólny pień rozwoju? Dwa fakty wskazują na pozytywną odpowiedź na to pytanie. Pierwszy, bliskie pokrewieństwo konformacyjne mioglobiny i łańcuchów α oraz β hemoglobiny kręgowców z łańcuchami hemoglobiny skąposzczetów, przedstawicieli *Glycera*, owadów z grupy *Chironomus*, i z leghemoglobiną pochodzącą z łubinu czy też z hemoglobiną drożdży lub bakterii np. *Saccharomyces cerevisiae* i *Vitreoscilla* [32, 33] sugeruje, że wszystkie łańcuchy globiny wywodzą się z wspólnego „pnia rozwoju”. Drugi, sporządzony za pomocą komputera plan ujawniający odległe w czasie pokrewieństwo pomiędzy sekwencjami aminokwasowymi sugeruje, że podobieństwa pomiędzy globiną bakterii, drożdży, roślin, bezkręgowców i kręgowców są zbyt wielkie, aby mogły powstać przypadkowo lub być wynikiem zbieżności [18].

Rodowód hemoglobiny wydaje się być co najmniej tak stary jak pierwsze zwierzęta (przypuszczalny podział na rośliny i zwierzęta nastąpił ok. $0.7\text{--}1.0 \times 10^9$ lat temu) [30].

Hemoglobina ma nieregularne, przerywane występowanie wśród bezkręgowców. Teraźniejsze protochordata, które prawdopodobnie są podobne bardziej do przodków chordata niż do współczesnych kręgowców, nie posiadają hemoglobiny. Dotychczas panowało przekonanie, że geny, które nie ulegają ekspresji mogły być ostatecznie usunięte z genomu. Jeśli „przedstawiające” hemoglobinę geny różnych gatunków są spokrewnione wspólnym przodkiem, to jak wytłumaczyć fakt, że niektórzy przodkowie organizmów posiadających hemoglobinę nie mieli jej, a geny hemoglobiny zostały zachowane w genomie podczas ich ewolucyjnych przejść przez organizmy nie posiadające tego białka? Można zaproponować dwa rozwiązania tego problemu. Pierwszy, cytochrom b_5 jest podobny strukturalnie do mioglobiny, cytochrom b_{562} ma sekwencję homologiczną z globiną [28], a cytochromy znaleziono we wszystkich aerobowych komórkach, istnieje więc potencjalna pula genetyczna, z której mogła powstać wielokrotnie hemoglobina poprzez duplikację i dalsze różnicowanie. Drugi, geny hemoglobiny mogły nie ulegać ekspresji lub ulegać ekspresji na poziomie niższym niż obecnie wykrywany. Posiadane dowody są jednak niewystarczające do dokonania wyboru pomiędzy tymi propozycjami.

EWOLUCJA FUNKCJI HEMOGLOBIN U KRĘGOWCÓW

Tetramer. Powstanie tetrameru jest być może najważniejszym wydarzeniem w ewolucji hemoglobiny u kręgowców. U wszystkich klas kręgowców oprócz *Agnata* (śluzica i minóg morski) hemoglobina krwi jest tetramerem złożonym z dwóch α i dwóch β łańcuchów globiny [18]. Integralność tetrameru zależy od dwóch rodzajów kontaktów, szczególnie $\alpha_1\beta_1$ i $\alpha_1\beta_2$, każdy łańcuch α ma kontakt z oboma łańcuchami β (tab. 1). Aminokwasowe reszty w tych rejonach na ogół nie ulegają wymianom u kręgowców. Połączenie $\alpha_1\beta_2$ jest funkcjonalnie ważniejsze dla zmian konformacyjnych związanych z przyłączeniem tlenu – stała dysocjacji tetrameru do dimeru wzrasta 10^6 razy po przyłączeniu tlenu do hemów. Ta zmiana czwartorzędowa ściśle związana ze zmianami w strukturze trzeciorzędowej jest odbiciem ważnej fizjologicznie kooperatywności w przyłączaniu tlenu. Konformacja „deoksy” białka (stan T) z niskim powinowactwem do tlenu jest zmieniana w konformację „oksy” (stan R) z wysokim powinowactwem do tlenu [3, 23].

Poznane sekwencje aminokwasowe wskazują na homologie pomiędzy wszystkimi istniejącymi obecnie α i β łańcuchami [19]. Rodowe geny α i β muszą być reprezentowane u przodka współczesnych kręgowców od ok. 420–500 mln lat. Istniejąca homologia dopuszcza stwierdzenie, że geny łańcuchów α i β wywodzą się z jednego źródła przez duplikację, po której nastąpiła dywergencja. Dodatkowym dowodem na istnienie „wspólnego przodka” łańcuchów α i β są opisane sekwencje w obu genach α i β , zajmujące dokładnie pozycje homologiczne w tych genach, np. u człowieka i myszy oraz w genach β królika [20, 25]. Przyporządkowanie tetramerowi funkcji kooperatywnego wiązania tlenu wymusza istnienie dokładnych relacji sferycznych pomiędzy różnymi resztami aminokwasowymi w rejonach kontaktu między podjednostkami. Przedstawione fakty prowadzą do nieuniknionej konkluzji, że geneza funkcjonalnego tetrameru hemoglobiny jest skorelowana z duplikacją genów i następującą po tym dywergencją dającą podjednostki białkowe α i β . Proces ten musiał nastąpić w czasie kiedy powstały kręgowce szczękowe od wspólnego przodka *Osteichthyes* i *Elasmobranchii* i był zależny od ewolucji specyficznych regionów kontaktu między tymi łańcuchami [7].

Konformacja łańcuchów α i β była prawdopodobnie zachowana przez cały czas ewolucji kręgowców. Perutz zaobserwował, że wewnętrzne reszty aminokwasowe w regionach helikalnych łańcuchów α i β są rzadko wymieniane – są konserwatywne. Reszty te w dużej mierze uczestniczą w oddziaływaniach hydrofobowych odpowiedzialnych za strukturę globularną całej cząsteczki, jak i poszczególnych podjednostek hemoglobiny. C o a t e s [7] wykazał statystycznie, opierając się na sekwencjach globiny różnych gatunków (wg Deyhoffa) i analogii z trzeciorzędową strukturą hemoglobiny człowieka, że reszty te są

bardzo stabilne (rzadko wymieniane – konserwatywne) przez cały okres ewolucji, tak jak i w przypadku krótkiej ewolucji hemoglobiny u ssaków. Goodman [16] ułożył na podstawie danych sekwencyjnych drzewo genealogiczne genów globiny. Za podstawę przyjął, że najlepsza genealogia ma najmniejszą liczbę wymienianych nukleotydów. Na podstawie tego drzewa Goodman wnioskuje o niejednolitej ewolucji genów globiny zarówno przy rozpatrywaniu całości drzewa, jak i poszczególnych jego gałęzi. W początkowej ewolucji tetrameru, w rejonie kontaktów $\alpha_1\beta_2$ reszty aminokwasowe były częściej wymieniane niż w okresie późniejszym [20].

U kręgowców prymitywnych z podtypu *Agnatha* wszystkie formy monomeryczne hemoglobiny są związane z ligandem, a formy niezwiązane tworzą agregaty. To funkcjonalne, czasowe połączenie powoduje kooperatywność w przyłączaniu tlenu. Utlenowanie powoduje dysocjację do monomerów, które mają większe powinowactwo do tlenu niż agregat [26]. Dwa składniki hemoglobiny wyizolowane od słuzicy są oddzielnie monomerami (brak kooperatywności), a po połączeniu tworzą układ tetrameryczny (pojawia się kooperatywność). Składniki te zachowują się jak podjednostki α i β u kręgowców wyższych. Sekwencja tych składników nie została jeszcze poznana i brak jest zatem ich pełnego porównania z łańcuchami α i β kręgowców wyższych.

Rozpuszczalność tetrameru. Cecha agregacji zasługuje na bliższe rozpatrzenie. Hemoglobina w krwinkach czerwonych kręgowców występuje w stężeniu bliskim granicy jej rozpuszczalności [27]. Każda zmiana w topologii, która powoduje komplementarność powierzchniową tetrameru, prowadzi do dodatkowej agregacji i precypitacji. Ekstremalnym przykładem jest tu hemoglobina S w krwinkach sierpowatych. Tendencja do tworzenia agregatów wyższych niż tetramer została opisana u wielu kręgowców [2, 4, 12]. Precypitacja wewnątrz krwinki czerwonej może być zatrzymana przez co najmniej trzy mechanizmy, pierwszy z nich – brak komplementarności powierzchniowej pomiędzy dwiema identycznymi molekułami – już o tym mówiliśmy. Druga możliwość to ewolucja przez duplikacje genów wielorakich hemoglobin, których ekspresja jest szeroko rozpowszechniona wśród kręgowców. Obecność kilku różnych hemoglobin w organizmie może podnosić rozpuszczalność zgodnie z regułą faz (prawo rozpuszczalności między fazami). Trzecia możliwość to obserwowane, np. u niektórych ptaków zjawisko podniesienia rozpuszczalności hemoglobiny przez fosforany organiczne.

Effekt Bohra i efekty allosteryczne. Ewolucja kooperatywnego tetrameru była połączona z nabyciem mechanizmu kontroli utlenowania przez protony (efekt Bohra), CO_2 , fosforany organiczne i chlorki. Nie jest zaskoczeniem, że rola tych różnych czynników zmienia się u różnych gatunków. Kontrola utlenowania i kooperatywność sprawiają, że system transportu tlenu jest

bardzo sprawny w wyniku różnic w powinowactwie tlenowym na powierzchni pęcherzyków płucnych i w tkankach. Każdy z tych czynników obniża powinowactwo poprzez uprzywilejowane wiązanie się do konformacji „deoksy” hemoglobiny. Ewolucja tych mechanizmów zależy od niewielkiej liczby reszt aminokwasowych, które zostały zlokalizowane w N- i C-końcowych segmentach łańcuchów polipeptydowych. W ten sposób blisko 50% alkalicznego efektu Bohra w hemoglobinie człowieka zależy od wiązania wodorowego w „deoksy” hemoglobinie pomiędzy C-terminalną histydyną ($\beta_{146}\text{His}$) każdego łańcucha β a β_{93} asparagina (Asp) tego samego łańcucha. To wiązanie ulega przerywaniu w czasie utlenowania, pK grupy imidazolowej histydyny spada i uwalniany jest proton. Następne 25% alkalicznego efektu Bohra jest rezultatem mostka solnego pomiędzy grupami $-\text{NH}$ łańcuchów α a C-terminalną arginina sąsiedniego łańcucha α . Za pozostałe 25% odpowiedzialna jest α_{122} histydyna (His). Podobnie mała liczba reszt aminokwasowych odpowiedzialna jest za wiązanie CO_2 i fosforanów organicznych [24]. Fakt, że tylko mała liczba reszt aminokwasowych ma znaczącą rolę wskazuje na możliwość zmiany tego efektu w ewolucji poprzez wymianę tylko jednego aminokwasu. Utrata regulacji funkcji hemoglobiny przez fosforany organiczne wiąże się z jedną lub dwoma substytucjami aminokwasowymi. Opisane mechanizmy kontrolne zostały znalezione u wszystkich kręgowców z wyjątkiem prymitywnych *Agnatha*. U bezkręgowców nie znaleziono regulacji funkcji hemoglobiny przez fosforany organiczne, w znaczeniu jak to ma miejsce u kręgowców.

Głównymi efektorami fosforanowymi u *Elasmobranchii* i *Osteichthyes* są ATP i GTP. Gady wykorzystują głównie ATP, a płazy i ssaki ATP i 2,3-DPG (2,3-difosfoglicerynian), pentaosforan inozytoli (IPP) jest głównym fosforanem u ptaków i żółwi [5]. 2,3-DPG jest głównym efektem allosterycznym hemoglobiny „dorosłych” (adult) w krwinkach czerwonych ssaków. Te obserwacje sugerują, że trifosfonukleotydy były prawdopodobnie efektorami allosterycznymi wczesnych kręgowców wykorzystujących tetramer $\alpha_2\beta_2$, wykorzystywanie 2,3-DPG i IPP jest sprawą późniejszego dostosowania, jakkolwiek IPP jest obecny u prymitywnych ryb oddychających powietrzem. Efektory fosforo-organiczne wzmagają efekt Bohra, obniżając powinowactwo tlenowe i stabilizują formę „deoksy” hemoglobiny. Ich stężenie w krwinkach czerwonych może się zmieniać w odpowiedzi na zmiany zachodzące w środowisku wewnętrznym i zewnętrznym, tak że wyrównują zmiany w powinowactwie tlenowym hemoglobiny. Przykładem jest wzrost stężenia 2,3-DPG w krwinkach czerwonych u ludzi w warunkach wysokogórskich i u owiec cierpiących na anemię [1, 6].

Interesujące są dwie grupy ssaków, przeżuwacze i kotowate, które nie posiadają hemoglobiny regulowanej przez 2,3-DPG. Stężenie 2,3-DPG w ich krwinkach czerwonych jest niskie; ich hemoglobiny nie wiążą 2,3-DPG

w sposób znaczący. U człowieka hemoglobina A (adult) wiąże 2,3-DPG w kieszeni uformowanej pomiędzy dwoma łańcuchami β po odtlenowaniu. Ujemnie naładowane grupy 2,3-DPG za pomocą wiązań elektrostatycznych wiążą się z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi w każdym łańcuchu β : N-terminalną walinę, NA2 histydyną, EF6 lizyną i H21 histydyną [24]. Łańcuch β hemoglobiny B kota ma N-terminalną serynę acetylowaną, a histydyna NA2 zastąpiona jest przez fenyloalaninę i w ten sposób cztery dodatnio naładowane grupy zostają „zgubione”. W hemoglobinie A kota N-terminalnym aminokwasem jest glicyna i brak jest NA2 histydyny. Formy te słabo reagują na 2,3-DPG [31]. Łańcuch β przeżuwaczy ma delecję w N-terminalnym końcu, brak jest NA2-histydyny oraz w miejscu N-terminalnej waliny (powszechnie występującej w tej pozycji) występuje w hemoglobinie *Bos sp.* – metionina, zatem łańcuch ten jest krótszy o jeden aminokwas (145 aminokwasów). Perutz obserwował, że w tym przypadku odległość między dwoma łańcuchami β jest zbyt duża w formie „deoksy”, aby mogło zajść przyłączenie 2,3-DPG. „Zgubienie” regulacji funkcji hemoglobiny poprzez fosforany organiczne u przeżuwaczy i kotowatych, jakkolwiek mechanizmy tego zgubienia są różne – obie grupy są odizolowane filogenetycznie, jest niewątpliwie sprawą wtórną.

DUPLIKACJA GENU PRZY TWORZENIU HEMOGLOBINY ZARODKOWEJ I EMBRIONALNEJ

U kręgowców niższych posiadających stadia „larwalne” różniące się od form dorosłych rozpowszechnione jest występowanie „larwalnych” hemoglobin różniących się od hemoglobiny osobników dorosłych (hemoglobina adult). Przykładem może być kijanka *bullfrog* (gatunek żaby amerykańskiej), która posiada łańcuchy α i β znacznie różniące się od tych łańcuchów u osobnika dorosłego [21].

Embriony i zarodki wielu ssaków posiadają hemoglobiny różne od ich form dorosłych. Te rozwojowe hemoglobiny są korzystne, ponieważ wysokie powinowactwo do tlenu tych form hemoglobin pozwala na łatwe przechodzenie tlenu z krwi matki do krwi zarodka. Niektóre hemoglobiny zarodkowe mają wysokie wewnętrzne powinowactwo do tlenu w nieobecności 2,3-DPG. Wpływ 2,3-DPG na hemoglobinę zarodkową człowieka różni się od efektu z hemoglobiną adult, ponieważ β_{143} histydyna jest zastąpiona w łańcuchu γ hemoglobiny zarodkowej przez serynę. Ponadto stężenie 2,3-DPG w krwinkach czerwonych zarodka jest niższe niż u dorosłego człowieka, tak że powinowactwo do tlenu jest znacznie wyższe u zarodka. Zróżnicowane powinowactwo do tlenu może być osiągnięte także wyłącznie poprzez różnice

w stężeniu fosforanów organicznych, tak jak jest to osiągane w przypadku zarodka konia. Hemoglobina zarodka i dorosłego zwierzęcia nie różnią się, a jedynie stężenie 2,3-DPG w krwinkach zarodka jest dużo niższe.

Ontogeneza ekspresji genów hemoglobiny embrionalnej i płodowej została dobrze poznana w przypadku człowieka. Najwcześniejsza hemoglobina, znaleziona w zarodku przed 8 tygodniem ciąży, jest tetramerem złożonym z dwóch ϵ i dwóch ζ łańcuchów. Później wytwarzany jest tetramer zbudowany z dwóch α i dwóch γ łańcuchów. Tuż przed porodem łańcuch γ jest zastępowany łańcuchem β i następnie w niewielkiej ilości ok. 1% przez łańcuch δ , tworzą się hemoglobiny: A_1 o budowie $\alpha_2\beta_2$ i $A_2 - \alpha_2\delta_2$. Geny łańcuchów podobnych do łańcucha α (dwa ζ i dwa α) zlokalizowane są w chromosomie 16, a geny z serii łańcucha β (jeden ϵ , dwa γ , jeden δ i jeden β) w chromosomie 11 (rys. 1) [10, 13]. Zbadano sekwencję aminokwasową i nukleotydową tych łańcuchów i wyciągnięto wniosek, że rodzina tych genów powstała ze „wspólnego przodka” w procesie duplikacji, a następnie dywergencji. Proces kształtowania się genów hemoglobiny przebiegał przez długi czas i można go skorelować z procesem ewolucji zwierząt, kolejne etapy ewolucji datowano na podstawie szczątków kopalnych. Powstanie łańcuchów α i β jest związane z pojawieniem się pierwszych kręgowców szczękowych ok. 420–500 mln lat temu. Efs-tratiadis i wsp. [11] podaje, na podstawie obliczeń, w których przyjął 10 mln lat za 1% dywergencji, że początek istnienia genów embrionalnych/zarodkowych przypada na 200 mln lat temu – w okresie intensywnej ewolucji gadów będących przodkami ssaków. Rozdzielenie się genów γ i ζ przypada na ok. 100 mln lat temu, mniej więcej na czas rozdzielenia się ssaków łożyskowych i torbaczy. Wydaje się, że ewolucja genów hemoglobiny płodowej (zarodkowej) i embrionalnej człowieka była związana z ewolucją długiego okresu ciąży i łożyskowym utrzymaniem płodu u ssaków.

SZYBKOŚĆ EWOLUCJI GENÓW HEMOGLOBINY U KRĘGOWCÓW

Holmguist [17] wykazał niejednolite tempo ewolucji hemoglobiny używając modelu REH (*random evolutionary hits* – przypadkowe trafienia ewolucyjne), w którym liczba wymienionych nukleotydów jest obliczana z sekwencji aminokwasowej i dostarcza dwa parametry: T_2 – liczba miejsc mutacji w sekwencji DNA i U_2 – średnia zmienność pozycji, gdzie REH (liczba nukleotydów wymienionych) równa się $T_2 \cdot U_2$.

Coates i Stone [8] także wnioskuje o ogólnej powolności ewolucji, w obu genach α i β od momentu rozejścia się linii owodniowców (ptaki i ssaki) na podstawie korelacji pomiędzy liczbą wymienionych aminokwasów i czasem ewolucji określonym na podstawie szczątków kopalnych i porównania morfologicznego.

Z drugiej strony, wg Kimura [19] szybkość ewolucji hemoglobiny jest względnie stała.

Poznanie problemu szybkości ewolucji hemoglobiny, jak widać, wiąże się z dokładnym określeniem czasu powstania wielu linii filogenetycznych, czyli na określeniu punktów dywergencji i powstawania gatunków. Pomimo tego, zastosowanie testu względnej szybkości Saricha i Wilsona [29], który jest zależny od danych uzyskanych ze szczątków kopalnych, doprowadziło do wniosku, że ewolucja hemoglobiny była ok. 1,5 raza wolniejsza u naczelnych w porównaniu do innych ssaków. Dowody na wolne tempo ewolucji hemoglobiny w linii prowadzącej od przodka owodniowców do współczesnych ptaków i ssaków przedstawił Goodman [15]. Dodatkowe zwolnienie ewolucji obserwuje się u naczelnych z wyjątkiem pawianów (*Papio sp.*), gdzie szybkość ewolucji łańcucha α jest podwyższona.

Przy zastosowaniu tego samego czasu dywergencji tempo ewolucji dla cytochromu c wydaje się być bardziej jednolite u kręgowców niż tempo ewolucji łańcuchów α i β hemoglobiny [8].

EKSONY, INTRONY I PSEUDOGENY

Sekwencjonowanie genów globiny ujawniło istnienie niekodujących fragmentów („intronów”), które rozdzielają sekwencje kodujące białko („eksony”). Łańcuch α kodują trzy eksony określające reszty aminokwasowe 1–31, 32–99 i 100–141, łańcuch β również trzy eksony 1–30, 31–104 i 105–146 (rys. 2) [13]. Introny zajmują pozycje homologiczne w obu genach. Podział genów na eksony związany jest z różnymi właściwościami funkcjonalnymi hemoglobiny. Ekson centralny koduje większość reszt z regionu kontaktu z hemem i kontaktu $\alpha_1\beta_2$, który zapewnia kooperatywność pomiędzy dimerami. Grupy aminokwasów odpowiedzialne za efekt Bohra i za przyłączanie fosforanów organicznych kodowane są głównie przez pierwszy i ostatni ekson.

Gilbert [14] sugerował, że istnienie intronów i eksonów może być wynikiem rekombinacji genów kodujących różne funkcje innych białek. Taki proces mógłby przyspieszyć proces ewolucji hemoglobiny powyżej tempa możliwego do uzyskania poprzez substytucje pojedynczych nukleotydów. Połączenie regionów kodujących, różnych funkcjonalnie części hemoglobiny było przytaczane przez Eatona jako poparcie tej hipotezy. Sugerował on, że ewolucja hemoglobiny przebiegała etapowo poprzez:

- 1) wiązanie hemu i odwracalne utlenowanie;
- 2) formowanie tetrameru i ewolucję kontaktów $\alpha_1\beta_1$ i $\alpha_1\beta_2$ oraz kooperatywność;

3) wytworzenie grup odpowiedzialnych za efekt Bohra i przyłączanie fosforanów organicznych.

Craig i wsp. [9] zwrócił uwagę, że fragment polipeptydowy, zgodny z centralnym eksonem łańcucha β , silnie i specyficznie wiązał hem, co potwierdzaoby hipotezę Gilberta [14].

Segregacja wariantów hemoglobiny „Lepore” człowieka, ukazuje, że zachodzi rekombinacja części genów. Siedem takich „fuzji” łańcuchów hemoglobiny zostało zidentyfikowanych, sześć z nich zachodzi pomiędzy łańcuchami β i δ , a jeden pomiędzy β i γ . Dwie z sześciu rekombinacji mogły powstać przez rekombinacje eksonów 1 i 2, dwie następne eksonów 2 i 3. Większość rekombinacji hemoglobiny „Lepore” (60%) może być wyjaśnione przez przestawienia całych eksonów. Sugeruje to, że zmiany pomiędzy eksonami i intronami, prowadzące do rekombinacji, mogły być częstsze niż zmiany w obrębie samych eksonów. Zostały także odkryte geny, które nie są transkrybowane z powodu insercji lub delecji, będących przyczyną zmiany struktury. Te „pseudogeny” oznaczone $\Psi\alpha$ i $\Psi\beta$, znalezione u królika, myszy i człowieka, są w ok. 75–80% homologiczne do prawidłowych genów globiny. Duże podobieństwo „pseudogenów” do genów kodujących globinę wchodzącą w skład hemoglobiny sugeruje, że powstały razem z tymi genami. W „pseudogenach” połączenie intron-ekson różni się od połączenia w normalnych genach i prawdopodobnie dlatego geny te nie produkują funkcjonalnego m-RNA; u myszy znaleziono nawet „pseudogen” α globiny nieposiadający obu intronów. Jakkolwiek wszystkie możliwe funkcje „pseudogenów” nie są znane, ich istnienie sugeruje dynamiczny stan loci genetycznych, którego rezultatem jest zróżnicowanie sekwencji genowych. Te sekwencje mogły być pülą, z której wyłoniły się później nowe funkcjonalnie geny.

Porównanie sekwencji nukleotydowych genów hemoglobiny wskazuje na dwa modele ewolucji tych genów. Jeden to nagły proces składający się z insercji, delecji i duplikacji, który zachodził przede wszystkim w intronach i sekwencjach flankujących te geny. Drugi to powolne w czasie mutacje punktowe (substytucje pojedynczych nukleotydów), obserwowane przede wszystkim w regionach kodujących białko. Inne typy zmian prowadziły do powstania нефункциональных бiałek [22].

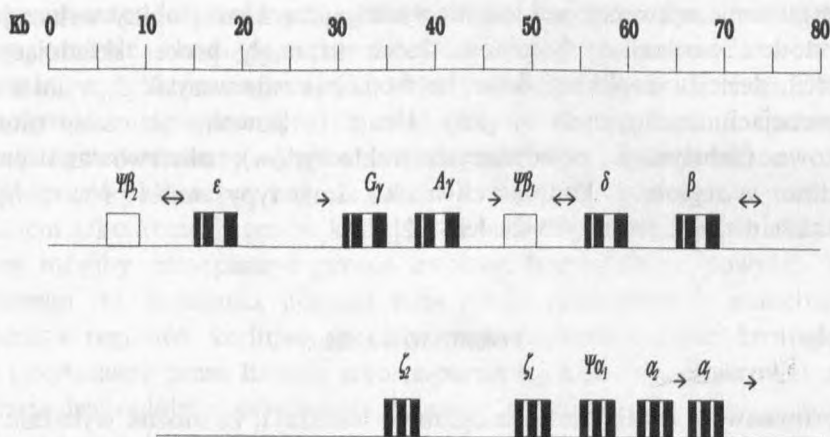
PODSUMOWANIE

Porównawcze studia nad hemoglobina wskazują, że można wyróżnić trzy aspekty ewolucji jej części białkowej. Pierwszy to ewolucja głównych właściwości funkcjonalnych, ogólnej konformacji łańcuchów, okolicy przyłączania hemu, regionów kontaktu w utworzonym tetramerze i prawdopodobnie

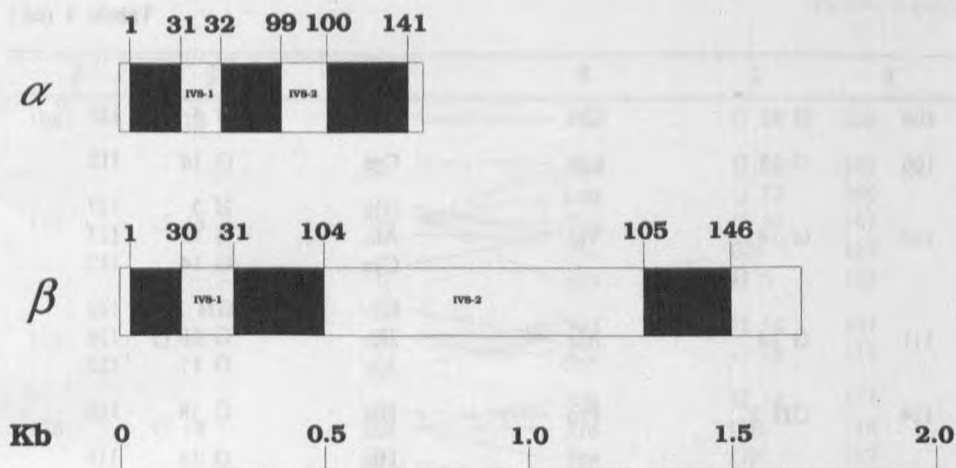
kieszeni przyłączającej fosforany organiczne. Drugi – wolne, mniej lub bardziej regularne w czasie gromadzenie różnic sekwencyjnych. Większość zmian obserwowano przez porównanie hemoglobiny kręgowców. Trzeci stanowią małe, często pojedyncze zmiany sekwencji aminokwasowej, które mogły dawać drastyczne zmiany we właściwościach funkcjonalnych hemoglobiny, takich jak powinowactwo tlenowe, efekt Bohra, przyłączanie CO_2 , fosforanów organicznych i rozpuszczalność tetrameru. Te małe zmiany są często obserwowane między blisko spokrewnionymi gatunkami i w wariantach wewnątrzgatunkowych (np. hemoglobina S człowieka). W niektórych jednak przypadkach rozpatrywanie typów zmian, jakie zaszły w ewolucji hemoglobiny kręgowców, może prowadzić do mylnych wniosków. Na przykład powinowactwo tlenowe głównych hemoglobin człowieka i kury jest zasadniczo identyczne pomimo faktu, że różnice w sekwencji aminokwasowej wynoszą ponad 1/3 ogólnej liczby aminokwasów.

W ostatnich latach dużo doniesień na temat ewolucji białek opiera się na badaniach sekwencji nukleotydowej genów kodujących te białka i ich sekwencji aminokwasowej. Wskazuje to na rosnącą rolę badań ewolucji molekularnej i można się spodziewać, że wraz z rozwojem i doskonaleniem metod badawczych najbliższe lata przyniosą rozwiązanie wielu problemów zasygnalizowanych w tym artykule. Ponadto artykuł niniejszy, ograniczony wydawniczo w swej objętości, omawia ogólnie podstawowe zagadnienia dotyczące ewolucji hemoglobiny.

5' → 3'



Rys. 1. Lokalizacja genów globiny ludzkiej na poziome chromosomów



Rys. 2. Struktura genów α i β globiny człowieka (IVS-1 i IVS-2 oznaczają introny, eksony oznaczone zostały czarnymi prostokątami)

Tabela 1

Kontakty między aminokwasami poszczególnych łańcuchów globiny

A. Kontakt $\alpha_1\beta_1$ – dimer. Kontakt łańcucha α z β .

α_1			β_1		
Nr pozycji	Nr pozycji heliksu	Aminokwas	Aminokwas	Nr pozycji heliksu	Nr pozycji
1	2	3	4	5	6
30	B 11	Glu	Pro	H 2	124
31	B 12	Arg	Gln	H 5	127
			Pro	H 2	124
			Thr	H 1	123
			Phe	GH 15	122
34	B 15	Leu	Ala	H 6	128
			Pro	H 3	125
			Pro	H 2	124
35	B 16	Ser	Gln	H 9	131
			Ala	H 6	128
36	C 4	Phe	Gln	H 9	131
103	G 10	His	Gln	H 9	131
			Cys	G 14	112
			Asn	G 10	108

Tabela 1 (cd.)

1	2	3	4	5	6
104	G 11	Cys —————	Gln	H 5	127
106	G 13	Leu —————	Cys	G 14	112
107	G 14	Val	Gly	H 5	127
			Ala	G 17	115
			Cys	G 14	112
111	G 18	Ala	Gly	GH 2	119
			His	G 18	116
			Ala	G 17	115
114	GH 2	Pro —————	His	G 18	116
117	GH 5	Phe	His	G 18	116
			Cys	G 14	112
			Arg	B 12	30
119	H 2	Pro	Met	D 6	55
			Pro	D 2	51
			Arg	B 15	33
122	H 5	His	Cys	G 14	112
			Arg	B 12	30
123	H 6	Ala —————	Val	B 16	34
126	H 9	Asp	Tyr	C 1	35
			Val	B 16	34

B. Kontakt $\alpha_1\beta_1$ – dimer. Kontakt łańcucha β z α .

β_1			α_1		
Nr pozycji	Nr pozycji heliksu	Aminokwas	Aminokwas	Nr pozycji heliksu	Nr pozycji
1	2	3	4	5	6
30	B 12	Arg	Phe	GH 5	117
			His	H 5	112
33	B 15	Val —————	Pro	H 2	119
34	B 16	Val	Ala	H 6	123
			Asp	H 9	126
35	C 1	Tyr —————	Asp	H 9	126
51	D 2	Pro —————	Pro	H 2	119
55	D 6	Met —————	Pro	H 2	119

Tabela 1 (cd.)

1	2	3	4	5	6
108	G 10	Asn	His	G 10	103
112	G 14	Cys	His	G 10	103
			Leu	G 13	106
			Val	G 14	107
			Phe	GH 5	117
			His	H 5	122
115	G 17	Ala	Val	G 14	107
			Ala	G 18	111
116	G 18	His	Ala	G 18	111
			Pro	GH 2	114
			Phe	GH 5	117
119	GH 2	Gly	Ala	G 18	111
122	GH 5	Phe	Arg	B 12	31
123	H 1	Thr	Arg	B 12	31
124	H 2	Pro	Glu	B 11	30
			Arg	B 12	31
			Leu	B 15	34
125	H 3	Pro	Leu	B 15	34
127	H 5	Gln	Arg	B 12	31
			Cys	G 11	104
			Val	G 14	107
128	H 6	Ala	Leu	B 15	34
			Ser	B 16	35
131	H 9	Gln	Ser	B 16	35
			Phe	C 1	36
			His	G 10	103

C. Kontakt $\alpha_1\beta_2$ – dimer. Kontakt łańcucha α z β – konfiguracja oksy.

α_1			β_2		
Nr pozycji	Nr pozycji heliksu	Aminokwas	Aminokwas	Nr pozycji heliksu	Nr pozycji
1	2	3	4	5	6
37	C 2	Pro	His	HC 3	146
38	C 3	Thr	Tyr	HC 2	145
			Pro	G 2	100
			Asp	G 1	99

Tabela 1 (cd.)

1	2	3	4	5	6
40	C 5	Lys	His	HC 3	146
42	C 7	Tyr	Asp Arg	G 1 C 6	99 40
44	CD 2	Pro	His	FG 4	97
92	FG 4	Arg	Arg Trp	C 6 C 3	40 37
94	G 1	Asp	Glu Trp	G 3 C 3	101 37
95	G 2	Pro	Trp	C 3	37
96	G 3	Val	Glu	G 3	101
140	HC 2	Tyr	Trp	C 3	37

D. Kontakt $\alpha_1\beta_2$ – dimer. Kontakt łańcucha α z β – konfiguracja deoksy.

α_1		β_2			
Nr pozycji	Nr pozycji heliksu	Aminokwas	Aminokwas	Nr pozycji heliksu	Nr pozycji
1	2	3	4	5	6
38	C 3	Thr	His Val	FG 4 FG 5	97 98
41	C 6	Thr	Arg His	C 4 FG 4	40 97
42	C 7	Tyr	Arg	C 6	40
91	FG 3	Leu	Arg	C 6	40
92	FG 4	Arg	Trp Gln Arg	C 3 C 5 C 6	37 39 40
93	FG 5	Val	Trp	C 3	37
94	G 1	Asp	Trp Asn	C 3 G 4	37 102
95	G 2	Pro	Trp	C 3	37
96	G 3	Val	Asp Glu	G 1 G 3	99 101
140	HC 2	Tyr	Pro Trp	C 2 C 3	36 37

Tabela 1 (cd.)

E. Kontakt $\alpha_1\beta_2$ – dimer. Kontakt łańcucha β z α – konfiguracja oksy.

β_2		α			
Nr pozycji	Nr pozycji heliksu	Aminokwas	Aminokwas	Nr pozycji heliksu	Nr pozycji
1	2	3	4	5	6
36	C 2	Pro	Tyr	HC 2	140
37	C 3	Thr	Arg	FG 4	92
			Val	FG 5	93
			Asp	G 1	94
			Pro	G 2	95
			Tyr	HC 2	140
39	C 5	Gln	Arg	FG 4	92
40	C 6	Arg	Thr	C 6	41
			Tyr	C 7	42
			Leu	FG 3	91
			Arg	FG 4	92
97	FG 4	His	Thr	C 3	38
			Thr	C 6	41
98	FG 5	Val	Thr	C 3	38
99	G 1	Asp	Val	G 3	96
101	G 3	Glu	Val	G 3	96
102	G 4	Asn	Asp	G 1	94

F. Kontakt $\alpha_1\beta_2$ – dimer. Kontakt łańcucha β z α – konfiguracja deoksy.

β_2		α			
Nr pozycji	Nr pozycji heliksu	Aminokwas	Aminokwas	Nr pozycji heliksu	Nr pozycji
1	2	3	4	5	6
37	C 3	Trp	Arg	FG 4	92
			Asp	G 1	94
			Pro	G 2	95
			Tyr	HC 2	140
40	C 6	Arg	Arg	FG 4	92
			Tyr	C 7	42
97	FG 4	His	Thr	C 6	41
			Pro	CD 2	42

Tabela 1 (cd.)

1	2	3	4	5	6
98	FG 5	Val	Thr	C 6	41
99	G 1	Asp	Tyr	C 7	42
			Thr	C 3	38
100	G 2	Pro	Thr	C 3	38
101	G 3	Glu	Asp	G 1	94
			Val	G 3	96
145	HC 2	Tyr	THr	C 3	38
146	HC 3	His	Pro	C 2	37
			Lys	C 3	40

LITERATURA

- [1] Agar N. S., Harley J. D., Civca M. A., Roberts J. (1977), *Experimentia*, **33**, 275-276.
- [2] Araki T., Okazaki T., Kajita H., Shukuya R. (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **351**, 427-436.
- [3] Arata Y., Seno Y., Otsuda J. (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **956**, 243-255.
- [4] Atha D. H., Riggs A. (1980), [w:] *Symposium on Interactions between Iron and Proteins in Oxygen and Electron Transport*.
- [5] Bunn H. F. (1980), *Amer. Zool.*, **20**, 199-211.
- [6] Bunn H. F., Forget B. G., Ranney H. M. (1977), [w:] *Human Hemoglobins*, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- [7] Coates M. (1975), *J. Mol. Evol.*, **6**, 285-307.
- [8] Coates M., Stone S. (1981), *J. Mol. Evol.*, **150**, 43-54.
- [9] Craig C. S., Ruchman S. R., Beychok S. (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 1384-1388.
- [10] Deisseroth A., Niehuis A., Lawrance J., Turner P., Ruddle F. H., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 1456-1460.
- [11] Efstradiatis A., Posakony J. W., Maniatis T., Lawn R. M., O'Connell C., Spritz R. A., de Riel J. K., Forget B. G., Weissman S. M., Sligh-tom J. L., Blechl A. E., Smithies O., Baralle F. E., Shoulders C. C., Proudfoot N. J. (1980), *Cell*, **21**, 653-668.
- [12] Elli R., Guijliani A., Tentori L., Chiancone E., Antonini E., (1970), *Comp. Biochem. Physiol.* **36**, 163-171.
- [13] Forget B. G. (1981), *Texas Reports on Biology and Medicine* **40**, 77-86.
- [14] Gilbert W. (1978), *Nature*, **274**, 501.
- [15] Goodman M. (1978), [w:] *Evolution of Protein Molecules*, Japan Scientific Societies Press, Center for Academic Pub., Tokyo, 17-32.
- [16] Goodman M. (1981), *J. Mol. Evol.*, **17**, 114-120.
- [17] Holmquist R., Jukes T. H., Moise H., Goodman M., Moore G. W. (1976), *J. Mol. Biol.*, **105**, 39-74.

- [18] Hunt L. T., Hurst-Calderone S., Dayhoff M. O. (1978), [w:] *Atlas Protein Sequence and Structure* 5, supp. 3, Nat. Biomed. Res. Found. Washington, 229-249.
- [19] Kimura M. (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 3440-3444.
- [20] Leder P., Hansen J. N., Konkel D., Leder A., Nishioka Y., Tellington C. (1980), *Science*, **209**, 1336-1342.
- [21] Maruyama T., Watt K. W. K., Riggs A. (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3285-3301.
- [22] Nishioka Y., Leder P. (1979), *Cell*, **18**, 875-882.
- [23] Perutz M. F. (1970), *Nature*, **228**, 726-739.
- [24] Perutz M. F., Kilmartin J. V., Nishikura K., Fogg J. M., Butler P. J. G., Rollemma H. S. (1980), *J. Mol. Biol.*, **138**, 649-670.
- [25] Proudfoot M. J., Shandler M. H. M., Manley J. L., Gefter M. L., Maniatis T. (1980), *Science*, **209**, 1329-1336.
- [26] Riggs A. (1972), [w:] *Biology of Lampreys*, eds M.W. Hardisty, I.C. Potter, Academic Press, 261-286.
- [27] Riggs A. (1976), *Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **35**, 2115-2118.
- [28] Rossmann M. G., Agros P. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7525-7532.
- [29] Sarich V. M., Wilson A. C. (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **58**, 142-148.
- [30] Schwartz R. M., Dayhoff M. O. (1978), *Science*, **199**, 395-403.
- [31] Taketa F. (1973), *Comp. Biochem. Physiol.*, **45B**, 813-823.
- [32] Wagenbach M., O'Rourke K., Vitez L., Wiczorek A., Hoffman S., Duffee S., Tedesco J., Stetler G. (1991), *Bio/Technology*, **9**, 57-61.
- [33] Wakabayashi S., Matsubara H., Webster D. A. (1986), *Nature*, **322**, 481-483.

Wpłynęło do Redakcji Folia
5.06.1992 r.

Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Piotr Duchnowicz, Wirgiliusz Duda

FUNDAMENTAL QUESTIONS ON THE EVOLUTION OF HAEMOGLOBIN

The paper presents problems concerning the evolution of haemoglobin. The main stages of Hb evolution: globin gene evolution, formation and solubility of Hb tetramer and functional Hb regulation by allosteric effectors have been presented. The gene duplication, occurring during the formation of fetal and embryonal Hb as well as the evolution rate of vertebrate Hb were discussed. The authors presented the role of exons, introns and pseudogenes in the evolving of globin and discussed the possibility of the acceleration of evolutionary process by means of exon-intron recombinations.