

ГЕМОГЛОБИНЫ: ЭВОЛЮЦИЯ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ

© 2001 г. А. Ф. ТОПУНОВ, Н. Э. ПЕТРОВА

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Гемоглобины животных. III. Гемоглобины растений. IV. Гемоглобины грибов и прокариот. V. Ранняя эволюция и возникновение гемоглобинов. VI. Механизмы регуляции функциональной активности гемоглобинов. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Гемоглобины (Hb) — очень древние и широко распространенные в живой природе белки, которые давно и активно исследуются. Помимо основной функции — снабжения кислородом органов и тканей животных, включая человека, их изучение играет важную роль и при установлении филогенетических отношений между различными таксономическими группами в процессе эволюции.

Гемоглобины различных организмов существенно различаются между собой по структуре и физико-химическим свойствам. Во многих работах прослежены изменения этих свойств в процессе эволюции. Благодаря современным методам исследований оказалось возможным реконструировать структуру ранних предковых Hb и рассчитать скорость их эволюции на разных этапах.

Довольно часто у одного организма можно обнаружить несколько гемоглобинов, иногда близких по свойствам, а иногда сильно различающихся по структуре и функциям. Гетерогенность может быть «постоянной», когда несколько Hb присутствует в организме одновременно, и «переменной», когда Hb сменяют друг друга в процессе индивидуального развития организма. Последний случай хорошо известен для гемоглобинов крови человека. Гетерогенность Hb может различаться и еще по одному признаку: формы Hb могут кодироваться как различными генами, так и быть продуктами посттрансляционной

Принятые сокращения: Hb — гемоглобин; Mb — миоглобин; Lb — левоглобин; HbF — фетальный гемоглобин;ДФГ — 2,3-дифосфоглицерат.

Адрес для корреспонденции: e-mail: topunov@inbi.ras.ru

модификации (чаще всего рассматриваются результаты гликозилирования). Особенно интенсивно гетерогенность Hb стали изучать во второй половине XX века, причем первые работы в этой области заключались в основном в выявлении случаев такой гетерогенности на белковом уровне и разработке способов разделения различных форм Hb. Подробный обзор известных к середине 60-х гг. случаев гетерогенности Hb, правда в основном относящихся к представителям позвоночных, был дан в работе Л. Н. Иржака [9]. В дальнейшем основной упор был сделан на выявление генов, кодирующих различные Hb, и на изучение механизмов их функционирования.

Однако, как ни странно, крайне редко в качестве гетерогенности рассматривается наличие в одном организме нескольких принципиально разных Hb, часто возникавших в разные периоды эволюции и сильно различающихся по свойствам, например, существование у одного организма и Hb и миоглобина (Mb). Более того, мы считаем, что в качестве функциональной гетерогенности можно рассматривать и наличие димерных или тетрамерных гемоглобинов с мономерами, кодируемыми различными генами. В качестве примера можно привести Hb человека: его α - и β -субъединицы кодируются разными генами, причем расположенными в разных хромосомах.

В нашем обзоре будут рассмотрены история возникновения различных Hb и некоторые особенности их функционирования. Особого внимания заслуживает такой важный аспект проблемы, как ферментативное восстановление Hb. Наличие гемоглобина известно не только у животных, но и у растений. Однако в то время, как гемоглобины животных обсуждались достаточно подробно, Hb растений значительно менее изучены, поэтому в нашем обзоре этот вопрос будет рассмотрен более подробно.

Начнем с описания самих фактов нахождения Hb у представителей различных таксонов. В качестве иллюстрации приведем схему распространенности гемоглобинов у различных таксономических групп (рис. 1). В основу этой схемы положены принципы классификации живых организмов, принятые в отечественной литературе [8, 19, 20], с некоторыми изменениями. Она составлена на основании материалов многих авторов. Данная классификация является лишь одним из возможных вариантов. Она, как нам кажется, достаточно наглядна, хотя мы понимаем и ее упрощенность, и неполноту, если принимать во внимание все многообразие идей по данному вопросу.

Hb были найдены и у прокариот, и у эукариот, причем у последних — во всех царствах. Перейдем к более подробному рассмотрению Hb у представителей различных царств живой природы.

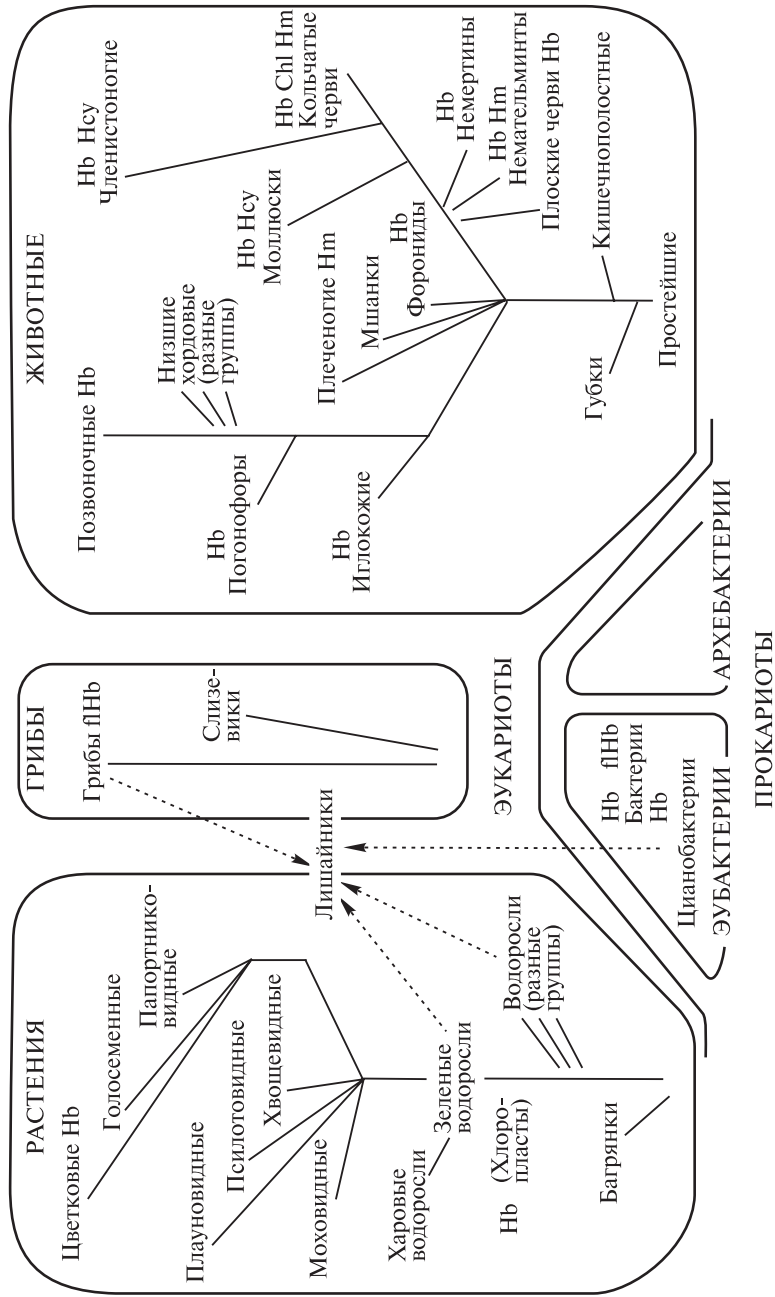


Рис. 1. Распространение гемоглобинов у представителей различных царств живой природы. Hb — гемоглобин (включая Mb и Lb), flHb — флавогемоглобин, chl — хлорокрукорин, Hm — гемэригрин, Hsu — гемоцианин.

II. ГЕМОГЛОБИНЫ ЖИВОТНЫХ

Вначале остановимся на хорошо известных фактах. У животных обнаружено несколько кислородпереносящих белков. Помимо Hb, известно еще два железосодержащих белка: хлорокруорин и гемэритрин. Хлорокруорин по своим свойствам и строению похож на Hb, однако обладает зеленой окраской. Это связано со строением протетической группы, которая несколько отличается от обычного гема гемоглобина и носит название хлорогема. В отличие от гемоглобина и хлорокруорина, у которых железо связано с гемом координационными связями, у гемэритрина железо ковалентно связано с белковой молекулой. Известен и медь-содержащий голубой кислородпереносящий белок — гемоцианин.

Филогенетическое древо царства животных с указанием нахождения всех кислородпереносящих белков у представителей разных таксонов к середине 60-х годов было приведено в известной работе П.А.Коржуева [12]. Ситуация на конец 70-х годов отражена в книге И.О.Алякринской [1]. Однако после этого число таксонов, у которых обнаружены подобные белки, существенно возросло. В статье Тервиллигер [123] приводится соотношение числа видов у различных таксономических групп, у которых те или иные пигменты найдены к настоящему времени. Отмечено, что число гемоцианин-содержащих видов хоть и велико, однако все же меньше, чем Hb-содержащих. Среди представителей ряда таксонов беспозвоночных имеются как гемоглобин-содержащие, так и гемоцианин-содержащие виды. Интересно, что есть организмы, например, некоторые моллюски, у которых могут одновременно присутствовать оба эти пигмента, причем в некоторых случаях один из них выполняет роль переносчика кислорода в крови, а другой — в тканях. Добавим, что хлорокруорин, гемэритрин и гемоцианин обнаружены только у беспозвоночных, причем гемоцианин встречается лишь у моллюсков и членистоногих, а хлорокруорин — только у кольчатых червей (рис. 1).

Отметим, правда, существенное различие в локализации этих кислородпереносящих белков. В то время, как Hb может содержаться и в плазме, и в форменных элементах крови (чаще всего в эритроцитах), гемоцианин просто растворен в плазме крови. Хлорокруорин всегда растворен в плазме, а гемэритрин, наоборот, локализован в клетках, которые, в отличие от обычных эритроцитов, носят название розовых кровяных телец. Известен, правда, и так называемый мио-гемэритрин (аналог миоглобина). Внеклеточный гемоглобин имеется у многих беспозвоночных, причем его молекулярный вес достигает огромных величин: у некоторых двустворчатых моллюсков субъединицы образуют ансамбли с молекулярной массой 8000—12000 кДа

[124, 138]; высокомолекулярный внеклеточный Нв иногда называют эритрокруорином.

Как видно из рис. 1, Нв имеются у представителей большинства типов царства животных. Основные этапы эволюции Нв беспозвоночных будут рассмотрены в главе 5.

Гетерогенность Нв обнаружена у многих животных из разных таксономических групп. Наиболее интересны случаи гетерогенности Нв у позвоночных (Vertebrata), поскольку на этом примере очень хорошо видны эволюционные шаги в изменении гемоглобинов. На рис. 2 представлена схема появления разных форм Нв у позвоночных с указанием примерной хронологии. За основу принципа построения взяты схемы, предложенные ранее [16, 58].

Отметим, что даты появления той или иной формы Нв рассчитываются достаточно приблизительно, в связи с чем у разных авторов имеются расхождения. Поэтому могут быть разночтения в определе-

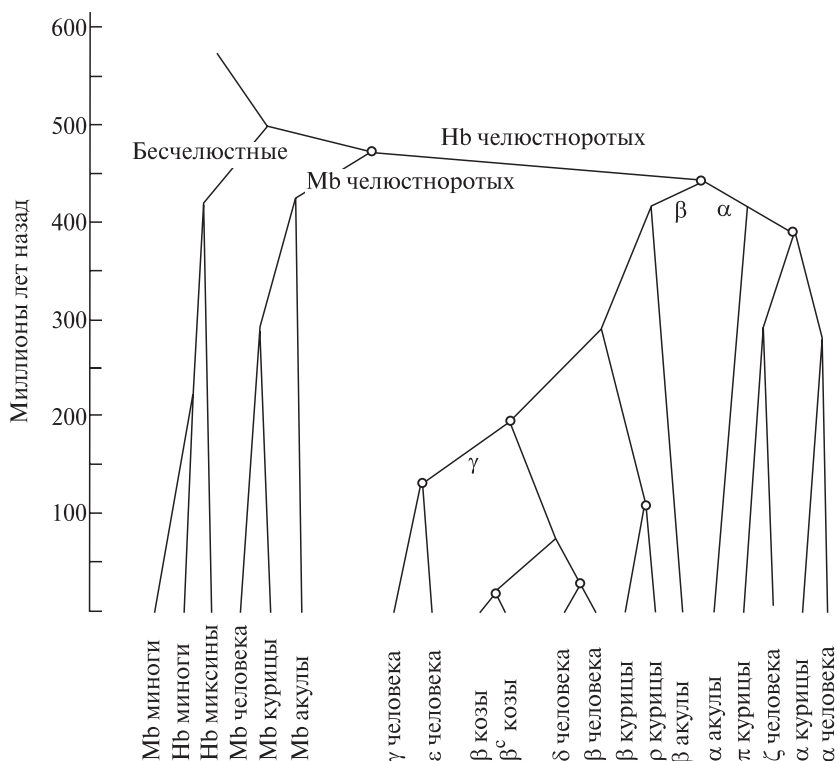


Рис. 2. Эволюционное древо гемоглобинов позвоночных с указанием времени их происхождения. Выделено расхождение генов путем дупликации.

нии, какому этапу эволюции соответствует появление той или иной формы Hb. В дальнейшем при описании Hb позвоночных мы будем придерживаться хронологии, приведенной в работе [58].

Как видно, вначале произошло разветвление путей эволюции гемоглобинов челюстноротых и бесчелюстных (около 500 млн. лет назад); миоглобины и гемоглобины разделились чуть позже, но также в самом начале эволюции позвоночных (~475 млн. лет назад). Лишь у круглоротых (у миноги) имеется свой собственный миоглобин, ответвившийся от ее гемоглобина около 200 млн. лет назад. Расхождение генов α - и β -цепей Hb произошло 400–450 млн. лет назад еще у рыб и предшествовало выходу позвоночных на сушу. Все современные позвоночные, начиная с рыб, имеют как α - и β -цепи Hb, так и миоглобин. Предполагается, что возникновение тетрамерного Hb, характерного для позвоночных, было очень важным эволюционным приобретением, позволившим им приспособиться к новым условиям жизни. При этом нормальное взаимодействие субъединиц Hb необходимо для его функционирования как переносчика кислорода. При потере кооперативности взаимодействия субъединиц Hb становится легкоокисляемым и быстро теряет свои функциональные свойства. У человека известен аномальный гемоглобин Канзас, который как раз и обладает указанным недостатком [9]. Отметим также, что субъединицы Hb настолько хорошо приспособлены друг к другу, что их соединения можно достичь и *in vitro*, используя экспрессированные цепи [140].

Возникновение эмбриональной формы гемоглобина предшествовало возникновению амниот (группы, объединяющей рептилий, птиц и млекопитающих) — ~400 млн. лет назад. У млекопитающих цепь эмбрионального гемоглобина α -типа называется ζ -цепь, у птиц — π -цепь. 200 млн. лет назад возникает фетальный Hb ($\alpha_2\gamma_2$), который у многих видов отличается большим сродством к кислороду, что соответствует появлению плацентарных млекопитающих. С развитием основной ветви этой группы, давшей начало всем основным отрядам, можно связать появление ϵ -цепей (150 млн. лет назад). Чуть позже возникает зародышевый гемоглобин у птиц, который содержит так называемую цепь ρ .

И даже значительно позднее возникали новые формы Hb: около 50 млн. лет назад у копытных возникает гемоглобин С (включающий новую β -подобную цепь). Примерно в то же время в начале истории приматов возникает σ -цепь, которая включается в состав гемоглобина HbA₂, почти не отличающегося по свойствам от обычного гемоглобина HbA.

Интересно, что скорость эволюции гемоглобинов позвоночных была максимальной на ранних этапах и в период выхода на сушу, после чего уменьшилась в несколько раз [16].

Отметим, что ген ζ отделился от α -гена, а γ -, ϵ - и σ -гены входят в дерево β -гемоглобинов, причем если γ - и σ -гены отделились непосредственно от β -гена, то ген ϵ сам отделился от γ -гена. Причем ϵ -цепь образует тетрамер $\zeta_2\epsilon_2$, т.е. похоже, что образование этой цепи произошло «специально» для взаимодействия также с относительно молодой ζ -цепью.

Нб позвоночных разветвлялись как путем дивергенции, так и дупликацией генов с их последующей независимой эволюцией. Из упомянутых выше расхождений, по мнению Челюсняка с соавт. [58], последним способом произошло расхождение миоглобинов и гемоглобинов челюстноротых, α - и β -цепей Нб, эмбриональных и взрослых цепей α -типа, β - и γ -цепей, γ - и ϵ -цепей, и, наконец β - и σ -цепей приматов. Путем дивергенции разошлись гемоглобины позвоночных и беспозвоночных, челюстноротых и бесчелюстных, а также аналогичные Нб при расхождении более мелких таксономических групп.

Для многих организмов известно и расположение генов, кодирующих упомянутые выше цепи гемоглобина. Все цепи α - и β -типа локализованы в соответствующих хромосомах, причем в каждой из хромосом существуют специальные Нб-локусы [72].

Хорошо известно, что некоторые из упомянутых выше Нб сменяют друг друга в процессе индивидуального развития человеческого организма (рис. 3). Раньше всего появляется так называемый эмбриональный Нб, также представленный несколькими формами. Наиболее важной является форма Нб-Gower-1 ($\zeta_2\epsilon_2$). Эта форма практически полностью исчезает через 3 месяца после зачатия, однако уже на 6 неделе развития зародыша еще до полного ее исчезновения начинает появляться фетальный Нб (НбF — $\epsilon_2\gamma_2$). НбF снижается до минимума в первые месяцы после рождения и заменяется нормальным взрослым Нб (НбA — $\alpha_2\beta_2$). Отметим, что НбA

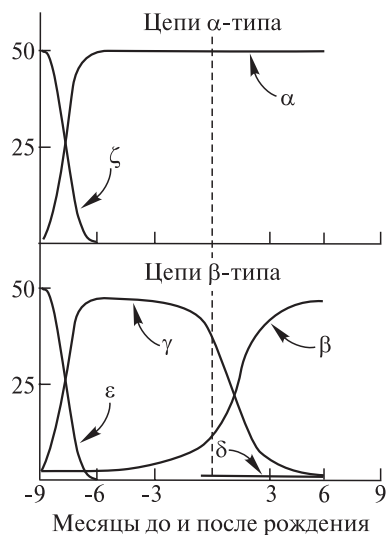


Рис. 3. Смена гемоглобинов в процессе индивидуального развития человеческого организма (по: [116]).

начинает появляться в организме практически одновременно с фетальным HbF, однако у зародыша он составляет минорную фракцию. Обнаруживаются и еще две эмбриональные формы Hb-Gower-2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) и Hb-Portland ($\zeta_2\gamma_2$) [75]. Однако предполагают, что последняя форма может являться результатом гибридизации Hb-Gower-1 и HbF при гемолизе клеток.

В последние месяцы эмбрионального развития у зародыша человека и других приматов появляется гемоглобин HbA₂ ($\alpha_2\sigma_2$), присутствующий на протяжении всей жизни человека и который, однако, составляет всего около 2% от всего Hb во взрослом организме. Функциональный смысл существования гемоглобина HbA₂ пока не ясен. До сих пор неизвестно, несло ли возникновение σ -цепи у приматов какую-либо функциональную или приспособительную роль. Нельзя исключать и возможность нейтральной роли возникновения σ -цепи, а также сцепления этого признака с каким-либо другим, характерным для приматов. В то же время достаточно ясен смысл возникновения гемоглобина C у копытных, который возник примерно в то же время, что и HbA₂ приматов. Он вырабатывается в условиях высокогорья при более низком парциальном давлении кислорода.

Иногда содержание фетального HbF бывает достаточно заметным и во взрослом организме. Это может быть как при некоторых заболеваниях (β -талассемии и серповидно-клеточной анемии), так и при адаптации людей к условиям высокогорья или в арктической зоне. При некоторых случаях патологии незначительно повышается и содержание HbA₂ (цит. по: [17]). То есть в обоих случаях вместо β -цепи Hb, синтез которой нарушен при β -талассемии, усиливается синтез других цепей β -типа

В процессе эволюции позвоночных наблюдается и направленное изменение свойств главной фракции гемоглобина. При движении от бесчелюстных к птицам и млекопитающим происходило увеличение внутримолекулярной подвижности молекулы Hb и уменьшение сродства к кислороду [10, 11]. По-видимому, причиной этого являлись важнейшие ароморфозы позвоночных: выход на сушу, появление легких и теплокровность, что потребовало повышения эффективности метаболизма на этапе разгрузки кислорода в тканях.

III. ГЕМОГЛОБИНЫ РАСТЕНИЙ

В то время, как Hb животных изучаются уже очень давно, гемоглобины растений значительно менее изучены, поэтому этим белкам в нашем обзоре будет уделено особое внимание.

Открытие первого растительного гемоглобина у сои в 1939 г. [90] в течение долгого времени рассматривалось скорее как курьез и только в течение последних двух десятилетий стало ясно, что эти белки достаточно широко распространены в растительном царстве. Наиболее часто Hb встречаются у бобовых растений и даже получили специальное название – леугоглобины (леггемоглобины) (Lb). Они содержатся в азотфиксирующих клубеньках бобовых и необходимы для нормального протекания процесса симбиотической фиксации азота. В одной из последних публикаций по этой проблеме показано, что Lb присутствует даже у примитивного бобового *Leucaena esculenta*, относящегося к мимозовым [98].

У всех изученных бобовых растений обнаружена гетерогенность Lb. Впервые это было показано для сои [62]. В дальнейшем то же самое было обнаружено и у многих других бобовых. Различные молекулярные формы Lb традиционно называют компонентами. Эпплби [40] высказал предположение, что основные компоненты соевого Lb кодируются разными генами. Впоследствии это предположение подтвердилось [119], а в работе [100] был представлен детальный анализ генов соевого Lb. В дальнейшем была определена и структура генов ряда других бобовых, причем во всех случаях первичная последовательность генов была в хорошем соответствии с ранее установленными первичными структурами белков.

У всех изученных бобовых обнаружено по два главных компонента Lb, кодируемых разными генами, а у многих еще найдены и так называемые «минорные» компоненты. Последние либо также кодируются разными генами как, например, у сои, либо являются продуктами посттрансляционной модификации. Гетерогенность Lb свойственна также и упомянутому выше примитивному *L. esculenta* [98].

Интересные данные были получены для тропического бобового растения *Sesbania rostrata*. У данного растения имеются как корневые, так и стеблевые клубеньки. Гетерогенность Lb обнаружена в обоих типах клубеньков однако они несколько различаются по составу компонентов [48].

Расхождение генов Lb происходило у каждой таксономической группы отдельно. В отличие от α - и β -цепей Hb позвоночных, главные компоненты Lb люпина ближе между собой, чем с соответствующими Lb сои или гороха. Было рассчитано, что расхождение двух генов Lb люпина произошло примерно 20 млн. лет назад, а расхождение Lb люпина и сои – около 32 млн. лет назад [7].

Долгое время считалось, что только бобовые растения содержат Hb. Однако в последние годы Hb были обнаружены и у небобовых растений, причем не только у образующих, но и у не образующих азот-

фиксирующие симбиозы. Правда, количество последних пока еще очень ограничено. Первые четкие свидетельства о присутствии Нб в небобовых растениях появились в 1983 г., когда он был обнаружен в клубеньках растения *Parasponia*, так же, как и бобовые, живущего в симбиозе с бактериями *Rhizobium* [41], и сразу еще у нескольких актиноризных растений, живущих в симбиозе с актиномицетами рода *Frankia* [125].

При обсуждении растительных Нб также нужно говорить о двух принципиально разных типах гетерогенности. К давно и хорошо известным фактам наличия нескольких компонентов Лб нужно добавить и так называемые несимбиотические растительные гемоглобины. Дело в том, что такие Нб содержатся не только в растениях, не образующих азотфиксирующие симбиозы, но и в растениях, такие симбиозы образующие.

В 1985 г. Нб—подобные последовательности были обнаружены в геномах ряда растений, не образующих азотфиксирующие симбиозы [74], а в дальнейшем были выделены и сами несимбиотические Нб. Отметим, что Нб—подобные геномные последовательности с очень интенсивным гибридным ответом были обнаружены в таком хорошо известном представителе семейства крестоцветных, как редис (*Raphanus sativus ssp. sativus*) [13]. Интересно, что в геноме редиса также присутствуют как минимум две Нб—подобные последовательности.

В нескольких работах делались попытки выяснить систематическое положение растений, у которых обнаружены Нб [93, 102]. При этом были использованы различные возможные классификации растений. На рис. 4 приведен наш вариант такой схемы. В ней мы придерживаемся классификации А.Л. Тахтаджяна [21]. Как видно, распространение известных к настоящему времени симбиотических и несимбиотических растительных Нб сильно различается. Понятно, что первые могут быть обнаружены лишь у растений, образующих азотфиксирующие симбиозы. Симбиотические растительные Нб пока обнаружены только у двудольных, более того, у представителей лишь двух подклассов: розидов и гамемелидидов. К симбиозу с клубеньковыми бактериями, которых теперь относят к нескольким родам: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Azorhizobium*, способны в основном бобовые, относящиеся к розидам (есть лишь одно исключение — *Parasponia*, относящаяся к семейству ильмовых и, соответственно, к подклассу гамемелидидов). В то же время к актиноризным растениям относятся представители различных семейств. Симбиотические Нб были обнаружены у представителей березовых — черной ольхи *Alnus glutinosa* [118] и красной ольхи *Alnus rubra*, казуариновых — *Casuarina cunninghamiana*, мириковых — *Myrica gale* и *Comptonia peregrina* (все

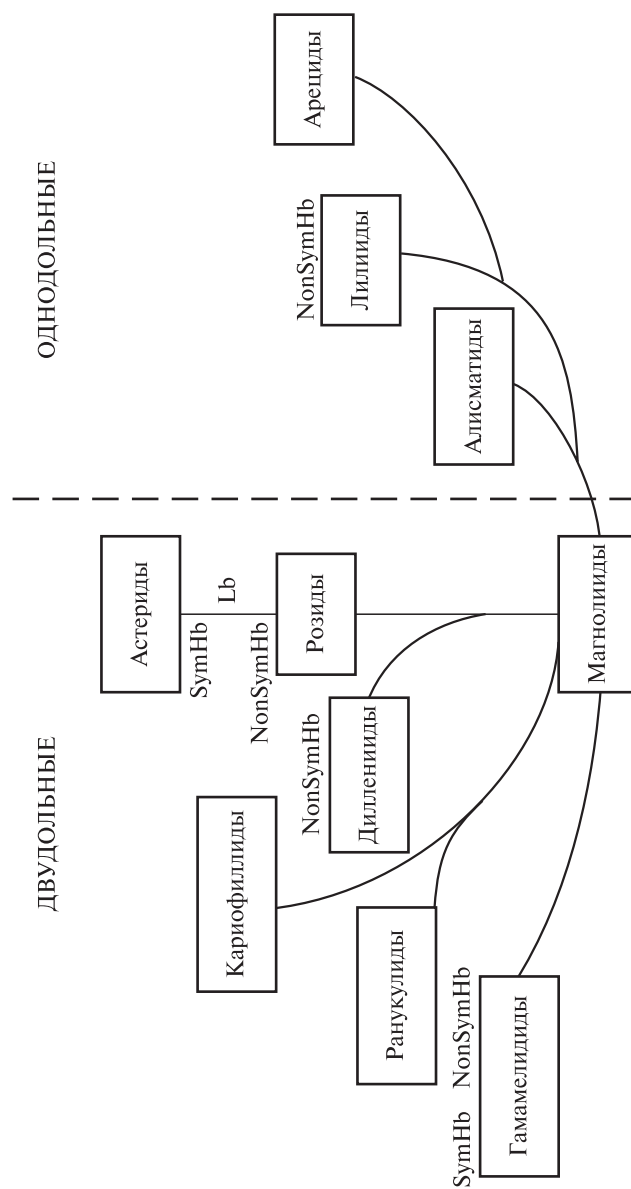


Рис. 4. Распространение гемоглобинов у покрытосеменных растений.
 Lb — леугоглобин, SumHb — симбиотический гемоглобин, NonSumHb — несимбиотический гемоглобин.

относятся к гаммелидидам) и лоховых — лоха узколистного *Eleagnus angustifolia*, который, как и бобовые, относится к розидам [125].

Первый несимбиотический растительный Нб был обнаружен у близкого родственника *Parasponia* — растения *Trema*, которое, в отличие от первого, не образует клубеньков [49]. Существование несимбиотических Нб в дальнейшем было показано и у бобовых (соя) [31], и у актиноризных растений (*Casuarina glauca*) [82]. Кроме того, несимбиотические Нб обнаружены у крестоцветного *Arabidopsis* [128], относящегося к подклассу диллениидов, и у однодольных — ячменя *Hordeum* [122] и риса *Oryza* [43], относящихся к семейству злаков и, соответственно, к подклассу лилииидов класса однодольных. Таким образом, несимбиотические Нб обнаружены у представителей четырех подклассов из обоих классов покрытосеменных. Все эти растения, кроме ячменя, имеют два и более гена несимбиотических Нб. Отметим, что содержание несимбиотических Нб в растениях, как правило, крайне мало и для выяснения строения и свойств этих белков обычно осуществляют их экспрессию в клетках *E. coli* [45, 61, 73].

В связи с обнаружением Нб разных типов, содержащихся во многих растениях и выполняющих различные функции, в настоящее время ведется дискуссия о создании новой классификации генов Нб, учитывающей все эти моменты [65].

История несимбиотических растительных Нб составляет как бы отдельную ветвь общего дерева растительных Нб. Несимбиотический Нб сои ближе к Нб злаков, чем к Lb той же сои. Можно было сделать вывод, что после отделения растительных Нб от животных сначала произошло разделение симбиотических и несимбиотических Нб, а уже потом происходила самостоятельная эволюция обеих групп. Именно такая последовательность приведена в работе [72]. Оказалось, однако, что все не так просто. После сравнения первичных последовательностей различных растительных Нб стало ясно, что симбиотические гены небобовых все же ближе к несимбиотическим генам, чем к Lb бобовых [44]. По-видимому, эволюция растительных Нб проходила следующим образом (рис. 5). Сначала шла общая эволюция этих Нб, затем произошло отделение Lb как самостоятельной ветви. Результатом эволюции второй ветви растительных Нб стало возникновение различных несимбиотических и ряда симбиотических Нб, кроме Lb бобовых. В дальнейшем Lb эволюционировали по-другому, поскольку они были и распространены шире, и содержание их, как правило, выше, и функционируют они не раз от раза, как это, по-видимому, имеет место у несимбиотических Нб, а постоянно.

По-видимому, несимбиотические Нб могут быть обнаружены практически во всех систематических группах покрытосеменных.

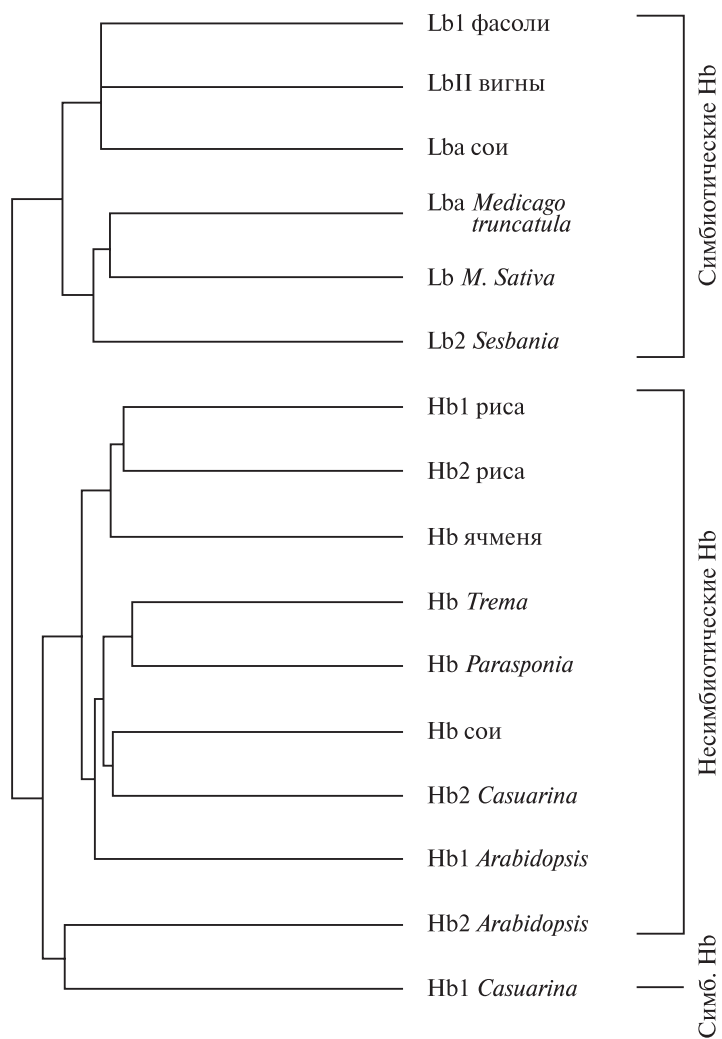


Рис. 5. Эволюционное древо симбиотических и несимбиотических растительных гемоглобинов (по: [44]).

Симбиотические же Нв могут быть обнаружены у многих растений, образующих азотфиксирующие симбиозы, у которых они пока не найдены. Интерес в этом отношении представляет тропическое растение *Gunnera*, живущее в симбиозе с сине-зелеными водорослями, что является достаточно редким явлением для покрытосеменных растений. Отметим кстати, что и это растение относится к уже отмеченному подклассу розидов.

В настоящее время достаточно хорошо изучено функционирование Lb у бобовых растений: они участвуют в поддержании кислородного режима в клубеньках, оптимального для процесса азотфиксации [24, 37]. Притом они играют как бы двойную роль: это и защита от избытка свободного кислорода, и снабжение азотфиксирующего микросимбионта связанным кислородом. В то же время было показано, что Lb может влиять и на метаболизм митохондрий [117].

Что касается функций несимбиотических Нв растений, то здесь еще много неясного. Возможно, что они также участвуют в регуляции уровня кислорода в клетках. Однако в работе [38] обосновывалось мнение, что роль несимбиотических Нв вряд ли заключается в облегчении диффузии кислорода. Они скорее могут работать как сигнальные молекулы, фиксирующие его дефицит и вызывающих необходимость переключения путей метаболизма. Высказывалось и предположение, что небольшие количества таких белков, как Mb у животных и Нв у растений, могут присутствовать практически во всех клетках, возможно, помогая эффективному транспорту кислорода к митохондриям и хлоропластам [139].

Различия в функциях симбиотических и несимбиотических Нв отражаются и в структуре их генов. Так, промоторы генов Lb содержат так называемые «нодулиновые участки», необходимые для их экспрессии в клубеньках [110, 120], в то время как в промоторах несимбиотических растительных Нв такой участок отсутствует, однако содержится другой участок, общий для несимбиотических гемоглобинов [31].

Гетерогенность Нв растений также имеет определенное физиологическое значение; их содержание в клубеньках разного возраста и даже в разных зонах клубенька различно. Изменения в соотношении компонентов объясняли как различиями в скоростях биосинтеза [63], так и различиями в скоростях деградации [136]. По-видимому, более правильной является первая гипотеза [131]. Кроме того, компоненты различаются по окислительно-восстановительным свойствам и сродству к кислороду, что также важно, так как в клубеньках может быть разное содержание кислорода. Как у гороха, так и у сои, компоненты Lb, синтезируемые в старых клубеньках, имеют большее сродство к кислороду, чем синтезируемые в молодых клубеньках, что может

быть важно для клубеньков, достигших структурной зрелости, когда нормально функционирует барьер газовой диффузии и количество поступающего в клубенек кислорода ограничено [131, 132]. То есть и здесь гетерогенность Hb расширяет норму физиологической реакции организма. Нами было высказано предположение о том, что благодаря разнообразию форм Hb бобовые растения способны лучше переносить резкие изменения внешних условий, включая стрессовые [28].

До самого последнего времени наличие Hb было известно только для покрытосеменных растений. И лишь совсем недавно показано, что Hb содержится и в водорослях *Chlamydomonas eugametos* [53, 54]. Правда, этот гемоглобин обнаружен в хлоропластах водорослей, поэтому, как будет отмечено ниже, его с большим сомнением можно считать настоящим эукариотическим Hb.

IV. ГЕМОГЛОБИНЫ ГРИБОВ И ПРОКАРИОТ

Само обнаружение бактериальных гемоглобинов сравнительно недавно было настоящей сенсацией, хотя в работе [35] сообщалось о присутствии Hb—подобного белка в клубеньковых бактериях *Rhizobium japonicum*, выращенных в свободной культуре. Первой бактерией, из которой был выделен Hb, стала *Vitreoscilla*, живущая в кишечнике крупного рогатого скота [137]. К настоящему времени Hb обнаружены уже у нескольких видов бактерий [55, 56, 92, 134], в том числе у цианобактерий *Nostoc* [109] и *Synechocystis* [85]; для их Hb было даже предложено специальное название – цианогемоглобин. Гемоглобины пока не обнаружены в архебактериях.

Функции прокариотических Hb еще до конца неясны, но они также тем или иным образом могут быть связаны с кислородным обменом. Так было показано, что у *Vitreoscilla* синтез Hb резко увеличивается при снижении концентрации кислорода в окружающей среде [137]. При экспрессии Hb *Vitreoscilla* в клетках *E. coli* он способствует улучшению обмена и росту своего нового хозяина в условиях дефицита кислорода [59, 129]. Интересно что Hb *Vitreoscilla* усиливает рост растений при его экспрессии в трансгенном табаке [76], что может говорить о сходных функциях таких далеких друг от друга белков, как прокариотические и несимбиотические растительные Hb. Интересно, что по первичной структуре Hb *Vitreoscilla* ближе к растительным, чем к животным Hb [42]. Высказывалась и точка зрения, что бактериальные Hb могут играть роль сенсоров кислорода или быть составными частями сенсорных систем [67, 108]. В отношении Hb *Mycobacterium tuberculosis* высказано предположение, что его оксиге-

нированная форма может защищать бактерию от соединений азота, выделяемых макрофагами хозяина [55].

Гемоглобины грибов известны достаточно давно, и Hb дрожжей *Candida* [104, 106] и *Saccharomyces* [144] активно изучался. Показано, что, в отличие от большинства других гемоглобинов, синтез Hb *Saccharomyces* индуцируется высоким уровнем кислорода [57, 145] и что его роль возможно состоит в защите клеток от окислительного стресса [144]. В отношении Hb *Candida* высказано предположение, что он может защищать клетки дрожжей от активных форм кислорода [106].

Отметим также следующее. Имеются Hb, объединяющие свойства как собственно гемоглобинов, так и редуктаз, например, упоминавшиеся выше Hb дрожжей [105, 145]. Флавогемоглобинами являются также и Hb бактерий *Alcaligenes eutrophus* [56], *Bacillus subtilis* [92] и *E. coli* [134]. Эти Hb являются двухдоменными белками, содержащими глобиновый и флавиновый домены [103, 145]. Здесь можно предположить как независимое выполнение данными белками функций их составляющих, так и участие редуктазной части в поддержании в активном состоянии гемоглобинового домена. Такая возможность обсуждается для гемоглобина из *E. coli* [108] и, по нашему предположению, для Hb *Candida* [25]. Возможно, что эти белки могут функционировать и как переносчики электронов [50].

V. РАННЯЯ ЭВОЛЮЦИЯ И ВОЗНИКНОВЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНОВ

Когда говорят о возникновении какого-либо гемоглобина, то под этим понимают не возникновение какого-либо Hb *de novo*, а расхождение путей развития гемоглобинов. Сейчас уже не считается возможным независимое возникновение Hb у какой-либо одной таксономической группы, хотя ранее такие гипотезы имели место. Длительное время именно таким образом объяснялся факт наличия Hb у растений, когда был известен только Lb бобовых. Тогда в качестве возможных причин появления Hb у растений рассматривались и общее происхождение (что подтвердилось впоследствии), и независимое конвергентное происхождение [36], и даже горизонтальный перенос генов Hb из других организмов [36, 79].

Отметим сразу, что, по имеющимся в настоящее время данным, почти все эукариотические Hb происходят от общего предка, то есть возникновение предкового гена Hb произошло около 1500 млн. лет назад, еще до расхождения растений и животных [38, 39]. Интересно, что ген растительного Hb ближе всех стоит к предковому, что выяснилось при изучении экзон–интронной структуры генов. Так, гены

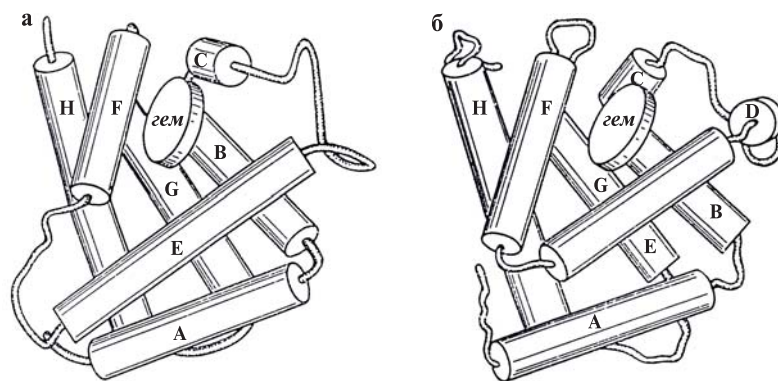


Рис. 6. Сравнение пространственной структуры леглобина II люпина (А) и миоглобина кашалота (Б) (по: [5]).

растительных Hb содержат три интрона, а гены большинства животных — два. Причем по некоторым данным можно полагать, что у этого общего предка эукариотических Hb также было три интрона, один из которых (центральный) выпал при эволюции Hb животных, хотя пространственная структура животных Hb «сохраняет следы» пропавшего третьего интрона [68].

В процессе эволюции эукариотических Hb наиболее консервативной оказалась третичная структура. Несмотря на то, что при сравнении Lb люпина и Mb кашалота инвариантными являются всего 17% аминокислот, эти белки оказались очень близки по пространственной структуре, вплоть до расположения α -спиральных участков (рис. 6) [5].

Скажем об основных этапах дальнейшей эволюции Hb животных. В работе Гудмена с соавт. [70], где впервые было построено эволюционное древо Hb беспозвоночных, было рассчитано время расхождения Hb позвоночных и беспозвоночных — ~670 млн. лет назад. Однако на основании изучения экзон-интронной структуры генов Hb эта цифра подверглась корректировке и этапы эволюции животных Hb были уточнены. Оказалось, что потеря центрального интрона у животных произошла не сразу. Так, некоторые нематоды содержат все три интрона, характерные для генов Hb растений и для предполагаемого предкового гена Hb эукариот [60]. В то же время кольчатый червь *Lumbricus* уже содержит двухинтронный ген Hb [83]. Все гены Hb позвоночных также содержат лишь по два интрона. Теперь предполагается, что дата — ~670 млн. лет назад — относится ко времени выпадения центрального интрона, а Hb позвоночных отдели-

лись от остальных животных Hb ~650 млн. лет назад [72]. Интересно, что процесс выпадения интронов мог продолжаться и дальше. Так, гены Hb некоторых насекомых (*Chironomus*) вообще не содержат интронов [32]. Здесь, по-видимому, произошло выпадение двух оставшихся интронов, характерных для генов Hb животных. По всем остальным параметрам Hb насекомых является обычным животным гемоглобином. Отметим, что гетерогенность Hb беспозвоночных чаще всего связана не с дивергенцией, а с дубликацией генов.

Рассматривая историю Hb у различных таксонов, возникает предположение, что гетерогенность Hb является достаточно поздним эволюционным приобретением, причем каждое увеличение гетерогенности соответствовало новому этапу эволюции и новым особенностям физиологии организмов. Для животных важнейшими этапами были возникновение миоглобинов, которое произошло даже дважды (для круглоротых и высших позвоночных), расхождение α - и β -цепей и возникновение зародышевых и эмбриональных Hb у птиц и млекопитающих.

Отметим, что предположение о достаточно позднем возникновении гетерогенности Hb нельзя абсолютизировать. Ведь не у всех эволюционно древних организмов Hb однороден, а у более молодых — гетерогенен. Например, у простейшего *Paramecium* имеется целое семейство Hb генов [141]. Поэтому, скорее всего, возникновение гетерогенности каждой таксономической группы или «ветви» Hb являлось достаточно поздним явлением.

При сравнении сроков возникновения новых Hb со сроками тех морфологических изменений, когда эти новые Hb становились нужны, можно сделать вывод, что возникновение новых Hb, как правило, предшествовало морфологическим и физиологическим изменениям. Однако ничего парадоксального в этом нет. По-видимому, возникновение этих новых Hb являлось классическим случаем преадаптации, предшествующей очередному ароморфозу. В дальнейшем сохранились именно те формы, которые оказались заранее приспособленными к предстоящим изменениям условий жизни.

Более ранняя история Hb является более спорной. Разночтения здесь касаются и экзон-интронной структуры, на основании которой было сделано заключение об общем происхождении растительных и животных Hb. Было высказано предположение, что тот самый общий анцестральный ген эукариотических Hb может относиться к общему предку лишь некоторых из этих Hb. На основании изучения экзон-интронной структуры высказывается предположение о том, что Hb простейших (Protozoa) отделились от общей ветви эукариот до разделения основных животных и растительных Hb [72]. Так, Hb *Tetrahy-*

тепа не содержит интронов вообще [121], а Hb *Paramecium* содержит один интрон, не соответствующий интронам других гемоглобинов [141].

Гемоглобины дрожжей, бактерий и хлоропластов водорослей также имеют другую структуру кодирующих их генов. У бактериальных и дрожжевых Hb интроны вообще не обнаружены, а Hb хлоропластов, хотя и содержит три интрона, но расположены они иначе, чем в генах большинства эукариот [53]. Именно поэтому, как мы отметили ранее, хлоропластный Hb вряд ли входит в общее семейство эукариотических Hb и его нужно считать скорее прокариотическим. Кстати, этот факт может являться еще одним доводом в пользу симбиогенного происхождения эукариот. Эта точка зрения в последнее время получила дополнительные доказательства [135].

Однако причины различного положения интронов в генах, кодирующих разные Hb, не выяснены до конца. Этот вопрос активно обсуждается [69, 72]. Выдвигались предположения как о «сдвиге» интронов в процессе длительной дивергенции генов, так и об их независимой «вставке». Однако по отношению к первому и третьему интронам, присутствующим в генах большинства животных и растительных Hb, наиболее вероятным считается предположение, что они являются такими же древними, как и анцестральный ген для всех этих гемоглобинов [72].

После обнаружения бактериальных Hb возникла гипотеза, что Hb прокариот и эукариот также имеют общее происхождение [87, 137], как это было установлено ранее для растительных и животных Hb. В настоящее время такая точка зрения становится все более и более популярной. Обсуждаются самые различные даты возникновения общего предка всех Hb — от 1800 млн. [72] до 3 млрд. лет назад [39].

В то же время экзон-интронная структура гена общего предка всех Hb пока остается загадкой. Он мог содержать как три интрона [39], так и не содержать интронов вообще. Именно первое предположение во многом объясняет мнение о том [39], что общий предок Hb возник у древних архебактерий. Дело в том, что гены архебактерий достаточно часто содержат интроны, что, вообще говоря, нетипично для прокариот.

Интересная обобщающая схема эволюции Hb, сделанная, в первую очередь, на основании данных об экзон-интронной структуре кодирующих их генов, приведена в работе Хардисона [72] (рис. 7). В ней учтены многие данные о возможном возникновении и утрате интронов в этих генах на разных стадиях эволюции, в том числе приводятся и данные об интронах гена общего предка Hb эукариот, и гипотезы о структуре гена общего предка всех Hb. Несколько упрощенной представлена схема расхождения симбиотических и несимбиотических растительных Hb, так как Хардисону к моменту

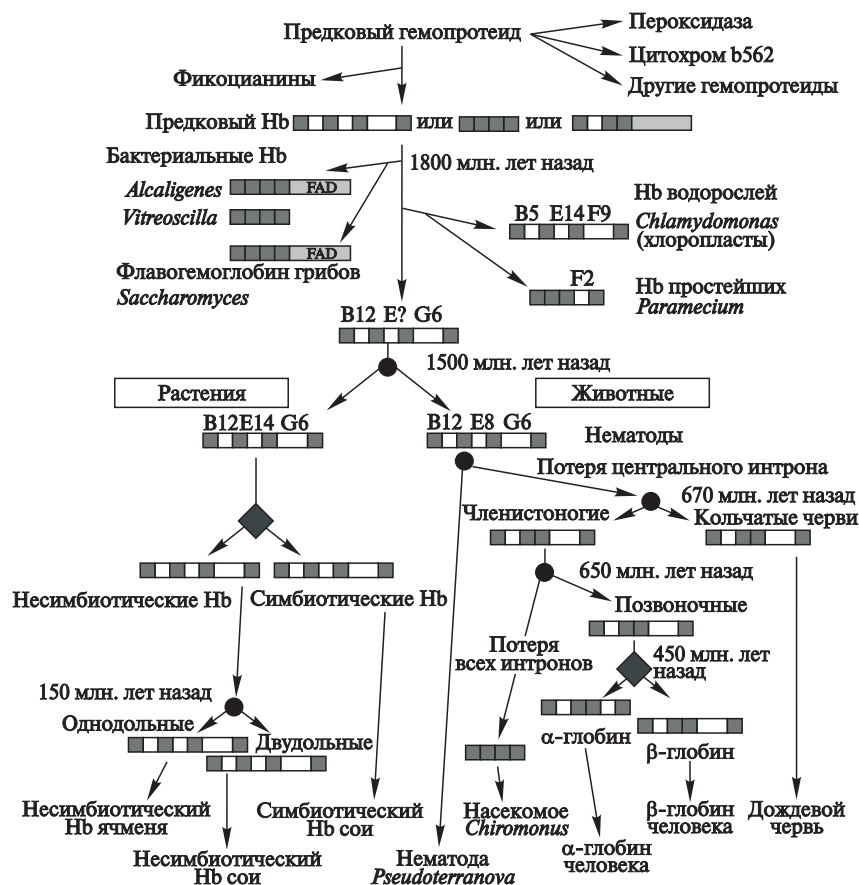


Рис. 7. Эволюционное древо гемоглобинов, построенное на основании экзон-интронной структуры их генов (по: [72]).

написания статьи не были известны результаты упоминавшейся выше работы [44].

Скажем несколько слов и о возникновении гемоглобинов как группы белков. Есть достаточно убедительные доводы в пользу того, что когда возникла необходимость в существовании белка — переносчика кислорода, Hb отделился от цитохрома b_5 -типа [111]. Это могло произойти более 2 млрд. лет назад, когда в атмосфере Земли благодаря процессу фотосинтеза возникло достаточное количество кислорода, хотя его содержание в то время было существенно ниже,

чем в настоящее время. Именно с этим, по-видимому, связан тот факт, что Hb растений ближе по свойствам к предковому гемоглобину. Ведь им приходится функционировать в клубеньках при крайне низкой концентрации кислорода, именно поэтому, очевидно, растительные Hb и обладают очень высоким сродством к кислороду. Отметим, что в статье [72] в эволюционном древе Hb в качестве белка с очень дальним к нему родством отмечен и цитохром *c*.

После обнаружения Hb у бактерии *Vitreoscilla* [137] выяснилось, что этот белок был известен и ранее, однако его относили к цитохромам. Продолжаются дискуссии о том, считать ли гемоглобином гемопротейд из бактерий *Rhizobium meliloti* [67]. Это еще раз подтверждает трудность точного определения принадлежности Hb-подобных белков, особенно возникших на ранних этапах эволюции.

Есть, правда, и другая точка зрения о происхождении Hb от ранее существовавшего гем-содержащего фермента, способного связывать кислород [86]. В пользу этой гипотезы может говорить тот факт, что, по-видимому, Hb у большинства прокариот играет роль не столько переносчика кислорода, сколько сенсора, реагирующего даже на минимальные его количества.

В связи с существованием описанных выше флавогемоглобинов возможно существование нескольких теорий их возникновения: 1) от общего предка Hb с последующим присоединением редуцтазного локуса; 2) от общего предка гемоглобинов и редуцтаз с последующим расхождением этих белков [145]. Именно такое эволюционное древо приведено в статье Хардисона [72]. В этой статье в качестве белков, произошедших уже от общего «прапредка» всех гемопротейдов, упомянуты даже не только цитохромы, но и пероксидазы и фикоцианины.

VI. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕМОГЛОБИНОВ

Описанные выше формы Hb могут характеризоваться как постоянной, так и переменной гетерогенностью. И тот, и другой типы гетерогенности играют свою функциональную роль. Роль постоянной гетерогенности состоит в расширении нормы физиологической реакции организма, поскольку при изменении условий начинает преимущественно функционировать Hb, более приспособленный к данным условиям. Переменная же гетерогенность нужна, когда в процессе онтогенеза изменяются внутренние условия в организме.

Роль гетерогенности Hb может состоять не только в возможности форм функционировать при различных условиях, но и в том, что их функционирование может по-разному регулироваться. Среди путей

такого регулирования особо следует отметить взаимодействие Нб с органическими фосфатами и так называемый эффект Бора.

Хорошо известно влияние органических фосфатов на Нб. Более всего изучено воздействие 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ); показано, что ДФГ уменьшает сродство Нб к кислороду [46, 52]. Известно также, что ДФГ по-разному влияет и на различные формы Нб одного вида (например, человека), и на Нб разных видов. В то время как влияние ДФГ на Нб млекопитающих, птиц, амфибий и большинства костных рыб является заметным, его влияние на Нб такой примитивной рыбы, как скат *Eptatretus stoutii*, не обнаружено [97]. Отметим, что у человека фетальный гемоглобин отличается от взрослого Нб не столько по сродству к кислороду, сколько по характеру взаимодействия с эффекторами, такими, например, как ДФГ [51, 89].

Очень интересна ситуация с эффектом Бора (иногда его еще называют эффектом Бора-Вериге). Так называют изменение сродства Нб к кислороду и другим лигандам под действием рН. Этот эффект был сначала установлен для Нб человека, который, как известно, является тетрамером. А поскольку было показано, что после диссоциации на α - и β -мономеры эффект теряется [33, 130], то многие исследователи стали связывать проявление эффекта Бора с тетрамерной структурой Нб. Однако в дальнейшем обнаружено, что и некоторые мономерные Нб проявляют эффект Бора; одним из наиболее интересных в этом отношении является Нб личинки *Chironomus* (насекомые) [66]. Эффект Бора проявляется и у некоторых левоглобинов [2, 3]. Отметим, что и Нб личинки *Chironomus*, и Lb обладают очень высоким сродством к кислороду.

Как по проявлению эффекта Бора, так и по взаимодействию Нб с органическими фосфатами, у разных организмов имеются серьезные различия. Чаще всего Нб с нулевым эффектом Бора встречаются среди беспозвоночных. Таким образом, при рассмотрении и гетерогенности Нб, и регуляторных механизмов их функционирования видны серьезные изменения в процессе эволюции Нб. В целом главным направлением эволюционных изменений Нб являлось увеличение разнообразия и сложности таких механизмов.

Гемоглобины могут и по-разному подвергаться процессам окисления и восстановления. Известно, что они могут функционировать лишь в физиологически активном восстановленном состоянии. У человека известно заболевание метгемоглобинемия, связанное с тем, что значительная часть Нб находится в окисленном состоянии и не способна переносить кислород. Были выполнены работы по поиску и выделению редуктаз, восстанавливающих гемоглобины. В то время, как для гемоглобинов крови позвоночных такие редуктазы известны

достаточно давно [114], лишь в 70-е годы были найдены редуктазы, восстанавливающие Mb [71, 101] и Lb [14]. Интересно, что пока нет ни одного сообщения о редуктазах, восстанавливающих Hb беспозвоночных животных.

В связи с этим интересен и факт гетерогенности редуктаз, восстанавливающих Hb. Такая гетерогенность хорошо известна для Hb крови человека и некоторых животных. Были выделены как НАДН-, так и НАДФН-зависимые метгемоглобинредуктазы. Предполагается, что важнейшую роль в восстановлении Hb играет НАДН-зависимая метгемоглобинредуктаза [78]. У ряда млекопитающих (в том числе человека) она может быть и растворимой и мембраносвязанной [47, 88]. В то же время из эритроцитов кролика была выделена только растворимая форма [143], а из некоторых птиц, амфибий и рыб — только мембраносвязанная метгемоглобинредуктаза [80, 113, 133]. Гетерогенна и метмиоглобинредуктаза [96].

Интересно, что картина с происхождением редуктаз напоминает таковую у гемоглобинов. Дело в том, что метгемоглобинредуктаза и цитохром b_5 -редуктаза на самом деле являются одним и тем же ферментом [91, 95], занимающим в «Номенклатуре ферментов» одну и ту же позицию 1.6.2.2 (НАДН: феррицитохром b_5 -оксидоредуктаза). А поскольку цитохром b_5 , как было отмечено, может являться предшественником Hb, то и цитохром b_5 -редуктазная функция метгемоглобинредуктазы скорее всего является более ранней. Цитохром b_5 -редуктаза, идентичная редуктазе эритроцитов, присутствует и в клетках, где нет Hb [94]. В этих клетках ее субстратом является сам цитохром b_5 , в то время как в эритроцитах он является лишь переносчиком электронов на Hb [64, 77, 107]. В связи с этим следует отметить, что упомянутая выше метгемоглобинемия также может быть двух типов: «эритроцитарного», когда недостаточность фермента наблюдается только в эритроцитах, и «общего», когда она наблюдается и в других клетках [142]. В дальнейшем было показано, что метмиоглобинредуктаза также является цитохром b_5 -редуктазой [96, 99].

О свойствах метгемоглобинредуктаз (ферментов, восстанавливающих левоглобин) имеются противоречивые данные. Из клубеньков люпина были выделены как редуктаза, не содержащая металлов [6], так и негемовый железопротеид [4]. Оба фермента являлись НАДН-зависимыми флавопротеидами. Нами были получены данные, что в клубеньках люпина содержатся обе эти редуктазы как два индивидуальных фермента [127], то есть метгемоглобинредуктаза также гетерогенна. Что касается вопроса о соотношении метгемоглобинредуктазы и цитохром b_5 -редуктазы, то этот вопрос пока остается нерешенным. Мы показали, что в опытах *in vitro* метгемоглобин-

редуктаза способна восстанавливать Lb с цитохромом b_5 в качестве промежуточного переносчика электронов [27], но происходит ли это в клубеньках *in vivo*, пока неизвестно.

Интересно, что предположения о существовании аналогичных редуктаз у прокариот были высказаны раньше, чем были обнаружены прокариотические Hb. Достаточно долго полагали, что метгемоглобин-редуктаза является белком бактериального происхождения. Собственно, сами исследования ферментативного восстановления Lb начались с того, что метгемоглобинредуктазная активность была обнаружена в белках, выделяемых бактероидами [14, 34]. И в дальнейшем эту активность обнаружили как в цитозоле растительной клетки, так в бактероидах и белках, выделяемых бактероидами при инкубации *in vitro* [15, 22, 26, 112, 126]. Лишь после выяснения растительной природы метгемоглобинредуктазы люпина [30], а, затем, и выделения ее гена из сои [84], была отброшена гипотеза о ее бактериальном происхождении.

Однако после открытия прокариотических Hb вопрос о существовании бактериальных редуктаз снова стал вызывать интерес исследователей. Такие редуктазы были выделены нами вначале из бактерий и бактероидов *Rh. lupini* [29], а затем и из ряда других бактерий [18], причем эти данные были получены практически одновременно с появлением первых данных о существовании прокариотических Hb. В дальнейшем метгемоглобинредуктаза была обнаружена и у бактерии *Vitreoscilla*, из которой выделен первый бактериальный Hb [81]. Можно предполагать, что бактериальные метгемоглобинредуктазы распространены гораздо шире, чем это известно на сегодняшний день. Именно наличием таких редуктаз мы объясняли физиологически активное состояние Lb люпина, экспрессированного в *E. coli* [115]. Данных о гетерогенности прокариотических редуктаз пока нет.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как можно видеть из всего вышесказанного, сама история возникновения и эволюции гемоглобинов является чрезвычайно хорошей иллюстрацией того, как эволюция идет и на молекулярном уровне.

При этом следует подчеркнуть, что количество таксонов (от самых крупных до самых мелких), у которых обнаружены Hb, растет с каждым годом. Интересно, что еще в 1993 г. мы перечислили таксоны, у представителей которых обнаружены Hb и восстанавливающие их редуктазы и предложили список возможных групп организмов, у которых могут быть обнаружены Hb в дальнейшем [23]. И действительно, наши предположения скоро начали оправдываться. Уже через год Hb

был обнаружен в хлоропластах [53]. В дальнейшем Нб были обнаружены у новых групп растений и прокариот. Мы предполагаем, что Нб или их гены будут обнаружены в архебактериях и в митохондриях эукариот. По-видимому, будет увеличиваться и количество известных Нб-содержащих видов и в тех группах, где их число пока ограничено. Можно ожидать интересных результатов, которые принесут поиски редуктаз, восстанавливающих различные гемоглобины.

Авторы уверены, что в области изучения эволюции и функционирования гемоглобинов можно ожидать новых открытий, начиная с их обнаружения в новых организмах и кончая выяснением новых особенностей механизмов функционирования Нб.

Авторы благодарят к.м.н. А.И.Козлова (Инновационная лаборатория арктической антропологии) и к.б.н. Д.Е.Щербакова (Палеонтологический институт РАН) за ценные замечания при обсуждении данной статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант N 99-04-48640).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алякринская И.О. Гемоглобины и гемоцианины беспозвоночных. (Биохимическая адаптация к условиям среды). М.: Наука, 1979. 155 с.
2. Атанасов Б.П., Жизневская Г.Я. // Молек. биол. 1975. Т. 9. № 4. С. 491—501.
3. Атанасов Б.П., Жизневская Г.Я., Бороденко Л.И., Пейве Я.В. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 235. № 3. С. 692—695.
4. Бороденко Л.И., Генина О.С., Жизневская Г.Я., Измайлов С.Ф. // Физиол. растений. 1990. Т. 37. № 6. С. 1131—1138.
5. Вайнштейн Б.К., Куранова И.П., Арутюнян Э.Г., Егоров Ц.А. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 5. С. 683—699.
6. Голубева Л. И., Топунов А.Ф., Гончарова С.С., Асеева К.Б., Кретович В.Л. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 10. С. 1712—1717.
7. Егоров Ц.А., Казаков В.К., Шахнаронов М.И., Фейгина М.Ю., Косецкий П.В. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 4. С. 476—478.
8. Зенкевич Л.А. // Жизнь животных. Т. 1. / Ред. Л.А. Зенкевич — М.: Просвещение, 1968. С. 7—53.
9. Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства. М.: Наука, 1975. 240 с.
10. Коношенко С.В., Осляк Т.В. // Ж. эвол. биохим. физиол. 1998. Т. 34. № 2. С. 173—177.
11. Коношенко С.В., Эльтахир А.Р. // Ж. эвол. биохим. физиол. 1994. Т. 30. № 5. С. 638—689.
12. Коржуев П.А. Гемоглобин. М.: Наука, 1964. 287 с.
13. Матвиенко М.А., Заленский А.А., Филатов А.А., Тихонович И.А. // Генетика. 1991. Т. 27. № 1. С. 160—164.
14. Мелик-Саркисян С.С., Баширова Н.Ф., Зауралова Н.О., Кретович В.Л. // Биохимия. 1976. Т. 41. № 7. С. 1330—1333.
15. Мелик-Саркисян С.С., Тихомирова А. И., Кретович В.Л. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 289. С. 1498—1502.

16. Ратнер В.А., Жарких А.А., Колчанов Н.А., Родин С.Н., Соловьев В.В., Шамин В.В. Проблемы теории молекулярной эволюции. Новосибирск: Наука, 1985. 262 с.
17. Стародуб Н.Ф. // Усп. соврем. биол. 1985. Т. 99. № 3. С. 385—400.
18. Талызин В.В., Топунов А.Ф., Баширова Н.Ф., Кретович В.Л. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 303. № 4. С. 1011—1012.
19. Тахтаджян А.Л. // Жизнь растений. Т. 1 / Ред. Н.А. Красильников, А.А. Уранов — М.: Просвещение, 1974. С. 49—57.
20. Тахтаджян А.Л. // Жизнь растений. Т. 4 / Ред. И.В. Грушвицкий, С.Г. Жилин — М.: Просвещение, 1978. С. 33—35.
21. Тахтаджян А.Л. // Жизнь растений. Т. 5. Ч. 1. / Ред. А.Л. Тахтаджян — М.: Просвещение, 1980. С. 107—112.
22. Тихомирова А.И., Мелик-Саркисян С.С., Топунов А.Ф., Лысенко Л.А., Кретович В.Л. // Прикл. биохим. микробиол. 1982. Т. 18. № 1. С. 123—131.
23. Топунов А.Ф. // Знание — сила. 1993. № 12. С. 30—38.
24. Топунов А.Ф. // Биохимия. 1995. Т. 60. № 1. С. 66—74.
25. Топунов А.Ф., Голубева Л.И. // Успехи биол. химии. 1989. Т. 30. С. 239—252.
26. Топунов А.Ф., Голубева Л.И., Сварадж К., Кретович В.Л. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 5. С. 1258—1261.
27. Топунов А.Ф., Мелик-Саркисян С.С., Лысенко Л.А., Кретович В.Л. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 3. С. 442—445.
28. Топунов А.Ф., Петрова Н.Э. // Физиол. растений. 1997. Т. 44. № 5. С. 671—675.
29. Топунов А.Ф., Талызин В.В., Чекакина Е.В., Кретович В.Л. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 296. № 6. С. 1501—1504.
30. Топунов А.Ф., Шибяк-Стружницкая У., Монджак Ц.Дж., Талызин В.В., Легоцкий А.Б., Кретович В.Л. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 311. № 5. С. 1265—1267.
31. Andersson C.R., Jenesen E.O., Llewellyn D.J., Dennis E.S., Peacock W.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 5682—5687.
32. Antoine M., Niessing J. // Nature. 1984. Vol. 310. P. 795—798.
33. Antonini E., Bucci E., Fronticelli C., Wyman J., Rossi-Fanelli A. // J. Mol. Biol. 1965. Vol. 12. N 2. P. 375—384.
34. Appleby C.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1969. Vol. 172. N 1. P. 71—87.
35. Appleby C.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1969. Vol. 172. N 1. P. 88—105.
36. Appleby C.A. // The Biology of Nitrogen Fixation / Ed. A. Quispel. Amsterdam: North-Holland, 1974. P. 521—554.
37. Appleby C.A. // Ann. Rev. Plant Physiol. 1984. Vol. 35. P. 443—478.
38. Appleby C.A., Bogusz D., Dennis E.S., Peacock W.J. // Plant, Cell and Environment. 1988. Vol. 11. N 5. P. 359—367.
39. Appleby C.A., Dennis E.S., Peacock W.J. // Aust. Syst. Bot. 1990. Vol. 3. P. 81—89.
40. Appleby C.A., Nicola N.A., Hurrell J.G.R., Leach S.J. // Biochemistry. 1975. Vol. 14. N 20. P. 4444—4450.
41. Appleby C.A., Tjepkema J.D., Trinick M.J. // Science. 1983. Vol. 220. P. 951—953.
42. Arredondo-Peter R., Escamilla E. // Plant Mol. Biol. Rep. 1991. Vol. 9. P. 195—207.
43. Arredondo-Peter R., Hargrove M.S., Moran J.F., Sarath G., Lohrman J., Olson J.S., Klucas R.V. // Plant Physiol. 1997. Vol. 115. P. 1259—1266.
44. Arredondo-Peter R., Hargrove M.S., Moran J.F., Sarath G., Klucas R.V. // Plant Physiol. 1998. Vol. 118. P. 1121—1125.
45. Arredondo-Peter R., Moran J.F., Sarath G., Luan P., Klucas R.V. // Plant Physiol. 1997. Vol. 114. P. 493—500.

46. *Benesch R., Benesch R.E.* // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1967. Vol. 26. N 2. P. 162—167.
47. *Bethlenfalvay N.C., Waterman M.R., Lima J.E., Waldrup T.* // Comp. Biochem. Physiol. 1982. Vol. 73 B. P. 518—524.
48. *Bogusz D.* // Advances in Nitrogen Fixation Research. / Eds. Veeger C., Newton W.E. The Hague, etc.: Martinus Nijhoff, Dr. W.Junk Publ., and Wageningen: Pudoc. 1984. P. 534.
49. *Bogusz D., Appleby C.A., Landsmann J., Dennis E.S., Trinick M.J., Peacock W.J.* // Nature. 1988. Vol. 331. N 6151. P. 178—180.
50. *Bolognesi M., Bordo D., Rizzi M., Tarricone C., Ascenzi P.* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1997. Vol. 68. P. 29—68.
51. *Bunn H.F.* // Blood. 1981. Vol. 58. P. 189—197.
52. *Chanutin A., Curnish R.R.* // Arch. Biochem. Biophys. 1967. Vol. 121. N 1. P. 96—102.
53. *Couture M., Chamberland H., St-Pierre B., Lafontaine J., Guertin M.* // Mol. Gen. Genet. 1994. Vol. 243. P. 185—197.
54. *Couture M., Guertin M.* // Eur. J. Biochem. 1996. Vol. 242. P. 779—787.
55. *Couture M., Yeh S.-R., Wittenberg B.A., Wittenberg J.B., Ouellet Y., Rousseau D.L., Guertin M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 11223—11228.
56. *Cramm R., Siddiqui R.A., Friedrich B.* // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 7349—7354.
57. *Crawford M.J., Sherman D.R., Goldberg D.E.* // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 6991—6996.
58. *Czelusniak J., Goodman M., Hewett-Emmett D., Weiss M.L., Venta P.J., Tashian R.E.* // Nature. 1982. Vol. 298. N 5871. P. 297—300.
59. *Dikshit R.H., Dikshit K.L., Liu Y., Webster D.A.* // Arch. Biochem. Biophys. 1992. Vol. 293. P. 241—245.
60. *Dixon B., Walker B., Kimmins W., Pohajdak B.* // J. Molec. Evol. 1992. Vol. 35. P. 131—136.
61. *Duff S.M.S., Wittenberg J.B., Hill R.D.* // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 16746—16752.
62. *Ellfolk N.* // Acta Chem. Scand. 1960. Vol. 14. N 3. P. 609—616.
63. *Fuchsmann W.H., Appleby C.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1979. Vol. 579. N 2. P. 314—324.
64. *Gacon G., Løstang D., Labie D., Kaplan J.C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. Vol. 77. N 4. P. 1917—1921.
65. Gene Families Encoding Globins, Hemoglobins, Leghemoglobins, and Related Proteins. // <http://mbclserver.rutgers.edu/CPGN/GlobinWeb/Globin.Discussion.html>. Modified 17 April 2000.
66. *Gersonde K., Sick H., Wollmer A., Buse G.* // Eur. J. Biochem. 1972. Vol. 25. P. 181—189.
67. *Gilles-Gonzalez M.A., Ditta G.S., Hellinski D.R.* // Nature. 1991. Vol. 350. P. 170—172.
68. *Go M.* // Nature. 1981. Vol. 291. N 5810. P. 90—92.
69. *Goldberg D.E.* // BioEssays. 1995. Vol. 17. P. 177—182.
70. *Goodman M., Pedwaydon J., Czelusniak J., Suzuki T., Gotoh T., Moens L., Shishikura F., Walz D., Vinogradov S.* // J. Molec. Evol. 1988. Vol. 27. P. 236—249.
71. *Hagler L., Coppes R.L., Herman R.H.* // J. Biol. Chem. 1944. Vol. 155. N 1. P. 321—331.
72. *Hardison R.* // J. Exp. Biol. 1998. Vol. 201. P. 1099—1117.
73. *Hargrove M.S., Barry J.K., Bruckner E.A., Berry M.B., Phillips G.N., Olson J.S., Arredondo-Peter R., Dean J.M., Klucas R.V., Sarath G.* // J. Mol. Biol. 1997. Vol. 267. P. 1032—1042.
74. *Hattori J., Johnson D.A.* // Plant Mol. Biol. 1985. Vol. 4. P. 285—292.
75. *Heinz A., Sanguanserm Sri N., Braunitzer G.* // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1981. B. 369. S. 1159—1166.
76. *Holmberg N., Lilius G., Bailey J.E., Bulow L.* // Nat. Biotechnol. 1997. Vol. 15. P. 244—247.

77. *Hultquist D.E., Passon P.G.* // Nature New Biol. 1971. Vol. 229. P. 252—254.
78. *Hultquist D.E., Sannes L.J., Luckett D.A.* // Curr. Top. Cell. Regul. 1984. Vol. 24. P. 287—300.
79. *Hyldig-Nielsen J.J., Jensen E.J., Paludan K., Wiborg O., Garrett R., Jorgensen P., Marcker K.A.* // Nucl. Acids Res. 1982. Vol. 10. N 2. P. 689—701.
80. *Ito T., Mezawa K., Okazaki T., Shikuya R.* // Comp. Biochem. Physiol. 1984. Vol. 78B. P. 683—686.
81. *Jakob W., Webster D.A., Kroneck P.M.* // Arch. Biochem. Biophys. 1992. Vol. 292. P. 29—33.
82. *Jacobsen-Lyon K., Jensen E.J., Jorgensen P., Marcker K.A., Peacock W.J., Dennis E.S.* // Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 213—223.
83. *Jhiang S.M., Garey J.R., Riggs A.F.* // Science. 1988. Vol. 240. P. 334—336.
84. *Ji L., Becana M., Sarath G., Klucas R.V.* // Plant Physiol. 1994. Vol. 104. P. 453—459.
85. *Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A. et al.* // DNA Res. 1996. Vol. 3. P. 109—136.
86. *Keilin D.* The History of Cell Respiration and Cytochrome. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1966.
87. *Khosla C., Bailey J.E.* // Mol. Gen. Genet. 1988. Vol. 214. P. 158—161.
88. *Kitajima S., Yasukochi Y., Minakami S.* // Arch. Biochem. Biophys. 1981. Vol. 210. P. 330—335.
89. *Kitchen H., Brett J.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1974. Vol. 241. P. 653—661.
90. *Kubo H.* // Acta Phytochim. 1939. Vol. 2. P. 195—200.
91. *Kuma F., Prough R.A., Masters B.S.S.* // Arch. Biochem. Biophys. 1976. Vol. 172. N 2. P. 600—607.
92. *LaCelle M., Kumano M., Kurita K., Yamane K., Zuber P., Nakano M.M.* // J. Bacteriol. 1996. Vol. 178. P. 3803—3808.
93. *Landsmann J.* // Rept. 1985—86. CSIRO, Div. Plant Ind. Canberra. 1986. P. 3—7.
94. *Leroux A., Kaplan J.C.* // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1972. Vol. 49. N 4. P. 945—950.
95. *Leroux A., Torlinski L., Kaplan J.C.* // Biochim. Biophys. Acta. 1977. Vol. 481. N 1. P. 50—62.
96. *Levy M.V., Livingston D.J., Criddle B.S., Brown W.D.* // Comp. Biochem. Physiol. 1985. Vol. 81 B. N 4. P. 809—814.
97. *Li Shoei-Lung, Tomita S., Riggs A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1972. Vol. 278. N 2. P. 344—354.
98. *Lira-Ruan K., Sarath G., Klucas R.V., Arredondo-Peter R.* // Brazil. J. Plant Physiol. 2000. Vol. 12. N 1. P. 37—44.
99. *Livingston D.J., McLachlan S.J., La Mar G.M., Brown W.D.* // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. N 29. P. 15699—15707.
100. *Marcker K.A., Bojsen K., Jensen E.J., Paludan K.* // Advances in Nitrogen Fixation Research. / Eds. Veeger C., Newton W.E. The Hague etc.: Martinus Nijhoff, Dr. W.Junk Publ., and Wageningen: Pudoc. 1984. P. 573—578.
101. *Matsui T., Shimizu C., Matsuura P.* // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1975. Vol. 41. N 6. P. 771—777.
102. *McGhee K.* // Austral. Natural History. 1990—91. Vol. 23. N 7. P. 554—561.
103. *Membrillo-Hernandez J., Poole P.K.* // FEMS Microbiol. Lett. 1997. Vol. 155. P. 179—184.
104. *Oshino R., Asakura T., Takio K., Oshino N., Chance B., Hagihara B.* // Eur. J. Biochem. 1973. Vol. 39. P. 581—590.
105. *Oshino R., Asakura T., Tamura M., Oshino N., Chance B.* // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1972. Vol. 46. N 3. P. 1055—1060.
106. *Oshino R., Oshino N., Chance B., Hagihara B.* // Eur. J. Biochem. 1973. Vol. 35. N 1. P. 23—33.
107. *Passon P.G., Hultquist D.E.* // Biochim. Biophys. Acta. 1972. Vol. 275. P. 62—73.

108. *Poole R.K., Ioannidis N., Orii Y.* // Proc. R. Soc. Lond. B. 1994. Vol. 225. N 1344. P. 251—258.
109. *Potts M., Angeloni S.V., Ebel R.E., Bassam D.* // Science. 1992. Vol. 256. P. 1690—1692.
110. *Ramlow K.B., Laursen N.B., Stougaard J., Marcker K.A.* // Plant J. 1993. Vol. 4. P. 577—580.
111. *Runnegar B.* // J. Mol. Evolution. 1984. Vol. 21. N 1. P. 33—41.
112. *Saari L.L., Klucas R.V.* // Arch. Biochem. Biophys. 1984. Vol. 231. P. 102—113.
113. *Scott E. M.* // Comp. Biochem. Physiol. 1985. Vol. 82B. P. 511—513.
114. *Scott E. M., Griffith I.V.* // Biochim. Biophys. Acta. 1959. Vol. 34. N 2. P. 584—586.
115. *Sikorski M.M., Topunov A.F., Strozzycki M.P., Vorgias C.E., Wilson K.S., Legocki A.B.* // Plant Science. 1995. V.108. P. 109—117.
116. *Straer L.* Biochemistry. N.Y.: W.H. Freeman and Co. 1988. Ch. 7. P. 143—176.
117. *Suganuma N., Kitou M., Yamamoto Y.* // Plant Cell Physiol. 1987. Vol. 28. N 1. P. 113—122.
118. *Suharjo U.K.J., Tjepkema J.D.* // Physiol. Plantarum. 1995. Vol. 95. P. 247—252.
119. *Sullivan G.V., Brisson N., Goodchild B., Verma D.P.S., Thomas D.Y.* // Nature. 1981. Vol. 289. N 5797. P. 516—518.
120. *Szczyglowski K., Szabados L., Fujimoto S.Y., Silver D., de Bruijn F.J.* // Plant Cell. 1994. Vol. 6. P. 317—332.
121. *Takagi T., Iwaasa H., Yuasa H., Shikama K., Takemasa T., Watanabe Y.* // Biochim. Biophys. Acta. 1993. Vol. 1173. P. 75—78.
122. *Taylor E.R., Nie X.Z., MacGregor A.W., Hill R.D.* // Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 24. P. 853—862.
123. *Terwilliger N.B.* // J. Exp. Biol. 1998. Vol. 201. P.1085—1098.
124. *Terwilliger N.B., Terwilliger R.C.* // Biochim. Biophys. Acta. 1978. Vol. 537. P. 77—85.
125. *Tjepkema J.D.* // Can. J. Bot. 1983. Vol. 61. N 11. P. 2924—2929.
126. *Topunov A.F., Golubeva L.I.* // Plant Metabolism Regulation. Sofia, 1984. P. 178—181.
127. *Topunov A.F., Shleev S.V., Petrova N.E., Rozov F.N., Zhabaeva M.U.* // Moscow University Chemistry Bulletin. 2000. Special Issue. P. 9—11.
128. *Trevaskis B., Watts R.A., Andersson C.R., Llewellyn D.J., Hargrove M.S., Olson J.S., Dennis E.S., Peacock W.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 12230—12234.
129. *Tsai P.S., Hatzimanikatis V., Bailey J.E.* // Biotechnol. Bioeng. 1996. Vol. 49. P. 139—150.
130. *Tyuma I., Enoki Y., Morikawa S.* // Jap. J. Physiol. 1964. Vol. 14. N 4. P. 573—586.
131. *Uheda E., Syono K.* // Plant Cell Physiol. 1982. Vol. 23. N 1. P. 75—84.
132. *Uheda E., Syono K.* // Plant Cell Physiol. 1982. Vol. 23. N 1. P. 85—90.
133. *Van Iersel A.A.J., Blaauboer B.J.* // Comp. Biochem. Physiol. 1985. Vol. 81B. P. 1027—1031.
134. *Vasudevan S.G., Armarego W.L.F., Shaw D.C., Lilley P.E., Dixon N.E., Poole R.K.* // Mol. Gen Genet. 1991. Vol. 226. N 1/2. P. 49—58.
135. *Vellai T., Vida G.* // Proc. R. Soc. Lond. B. 1999. Vol. 266. N 1428. P. 1571—1577.
136. *Verma D.P.S., Ball S.B., Guerin C., Wanamaker L.* // Biochemistry. 1979. Vol. 18. N 3. P. 476—483.
137. *Wakabayashi S., Matsubara H., Webster D.A.* // Nature. 1986. Vol. 332. N 6078. P. 481—483.
138. *Waxman L.* // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. P. 3790—3795.
139. *Wittenberg B.A., Wittenberg J.B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 7503—7507.

140. Yamaguchi T., Pang J., Reddy K.S., Witkowska H.E., Surrey S., Adachi K. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. N 43. P. 26677—26683.
141. Yamauchi K., Tada H., Uzuki I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. Vol. 1264. N 1. P. 53—62.
142. Yubisui T., Miyata T., Iwanaga S., Tamura M., Takeshita M. // *J. Biochem.* 1984. Vol. 96. P. 579—582.
143. Yubisui T., Takeshita M. // *J. Biochem.* 1982. Vol. 91. P. 1467—1477.
144. Zhao X.J., Raitt D., Burke P., Clewell A.S., Keast K.E., Poyton R.O. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 25131—25138.
145. Zhu H., Riggs A.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 5015—5019.