

РОЛЬ ГЕМОСОДЕРЖАЩИХ ГЛОБИНОВ В NO-СИГНАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКАХ ПОЗВОНОЧНЫХ ПРИ ГИПОКСИИ

© Н. В. Кулева,¹ И. Е. Красовская

Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034;

¹ электронный адрес: nadezhda.kuleva@gmail.com

Оксид азота является одной из наиболее важных сигнальных молекул в живых организмах. Он может образовываться двумя путями — из аргинина с помощью NO-синтаз и из нитрита с помощью нитрит-редуктаз. Второй способ имеет место главным образом при гипоксии в организме, когда гемосодержащие глобины позвоночных (гемоглобин, миоглобин, цитоглобин и нейроглобин) опосредуют трансформацию NO₂ в NO посредством нитрит-редуктазной активности. Гипоксическая NO-сигнализация зависит от концентрации кислорода и важна для осуществления физической работы, гипоксической вазодилатации сосудов, прекодиционирования миокарда и ангиогенеза. Данные литературы за последние 15 лет показывают, что нитрит-редуктазная активность гемосодержащих глобинов использовалась еще на ранних стадиях эволюции жизни как сенсор кислорода и механизм, защищающий от активных форм кислорода и азота.

Ключевые слова: гемоглобин, миоглобин, цитоглобин, нейроглобин, нитрит, NO-сигналинг, гипоксия, молекулярная эволюция.

Принятые сокращения: цГМФ — циклический гуанозинмонофосфат, NO — оксид азота.

Открытие в 80-х годах прошлого века биосинтеза оксида азота (NO) в организме млекопитающих и его значения для функционирования сердечно-сосудистой и нервной систем привело к возникновению новой парадигмы в истории механизмов клеточного сигналинга. До этого NO рассматривали как токсичный газ — загрязнитель воздуха, компонент сигаретного дыма, компонент смеси выхлопных газов автомобилей и реактивных самолетов, индуктор кислотных дождей и разрушитель озонового слоя атмосферы. Поэтому тот факт, что клетки могут производить его в нормальном физиологическом состоянии, казался совершенно невероятным. В настоящее время NO признан одной из наиболее важных сигнальных молекул в организме млекопитающих и эффектором редоксрегулируемой передачи сигнала в филогенетическом древе — от микроорганизмов до растений и животных (Соорет, 1999).

Регуляция, опосредованная NO, участвует как в клеточных процессах (промежуточном метаболизме, пролиферации и апоптозе), так и в системных, таких как регуляция просвета сосудов при гипоксии (гипоксическая вазодилатация). Образование NO в организме млекопитающих связано с энзиматической активностью NO-синтаз, нитрат- и нитрит-редуктаз, а также с неэнзиматическим восстановлением нитрита.

NO является растворимым в воде газом, молекула которого состоит из одного атома азота и одного атома кислорода и имеет неспаренный электрон, что превращает ее в высокореактивный радикал с периодом полураспада 2—30 с, свободно проникающий через биологические

мембраны и легко вступающий в реакции с другими соединениями. Характерной особенностью NO является его способность быстро диффундировать через мембрану синтезировавшей его клетки в межклеточное пространство и проникать в клетки-мишени. В этих клетках он выступает в качестве сигнальной молекулы и влияет на функции клетки, вызывая модификации белков-мишеней, например посредством нитрозилирования цистеиновых остатков белков или связываясь с гемом растворимой гуанилатциклазы.

В клетках млекопитающих NO синтезируется путем аэробного окисления аминокислоты L-аргинина до L-цитруллина и NO. Этот процесс зависит от NADPH и катализируется ферментом NO-синтазой. Идентифицированы 3 изоформы NO-синтазы — нейрональная (nNOS), индуцибельная (iNOS) и эндотелиальная (eNOS). Нейрональная и эндотелиальная изоформы постоянно экспрессируются в мозге и эндотелии сосудов соответственно, а экспрессия iNOS индуцируется в макрофагах и некоторых других клетках животных в ответ на инфекционные факторы (Mishel, Feron, 1997).

Эндотелиальная NO-синтаза была впервые обнаружена в эндотелии сосудов, а в дальнейшем — в миокарде, эндокарде и некоторых нейронах. Многочисленные исследования показали, что тонус сосудистой стенки в организме обеспечивается постоянным динамическим равновесием между процессами вазоконстрикции (сжатия стенки сосудов) и вазодилатации (расслабления стенки сосудов). Основная роль в вазоконстрикции принадлежит симпатической нервной регуляции и ренин-ангиотензив-

ной системе, а регулятором вазодилатации является NO, синтезируемый eNOS. Повышение концентрации NO в сыворотке крови является сигналом для уменьшения тонуса сосудов и соответствующего уменьшения артериального давления. Увеличение концентрации NO в миокарде может быть сигналом для уменьшения интенсивности дыхания митохондрий, так как NO обратимо блокирует определенные участки цепи транспорта электронов. При этом уменьшается количество свободных радикалов, образующихся при окислительном фосфорилировании (Ignarro, 1999; Shiva, 2010).

Пул NO, синтезированный eNOS, может частично превращаться церулоплазмином плазмы крови в пул нитрита, который представляет собой стабильный химический резервуар NO, который далее способен реагировать с оксигемоглобином (с образованием нитрата) или с дезоксигемоглобином (с образованием NO). В покое концентрация нитрата в плазме крови человека составляет 14—50 мкмоль/л, а концентрация нитрита 0.1—0.2 мкмоль/л, причем 70 % нитрита плазмы образуется из NO, синтезированного NO-синтазой эндотелия кровеносных сосудов.

Нитрат, поступивший в организм с пищей, подвергается действию нитрат-редуктаз и частично превращается в нитрит, а последний под действием нитрит-редуктазной активности таких белков, как дезоксигемоглобин, ксантиноксидаза, альдегидоксидаза или NO-синтаза, может превращаться в NO.

Особенностью системы генерации NO, независимой от NO-синтаз, является то, что NO генерируется наиболее интенсивно в условиях недостатка в организме кислорода, когда система NO-синтаз оказывается блокированной и ее функции не могут осуществляться (Shiva, 2010). В этих условиях нитрит может использоваться как источник NO и осуществлять соответствующий сигналинг. Зависящий от нитрита сигналинг играет важную роль в процессах, связанных с гипоксией, таких как выполнение физической работы, гипоксическая вазодилатация, preconditionирование миокарда и ангиогенез.

Превращение нитрита в NO и другие сигнальные продукты, т. е. катализ нитрит-редуктазной активности, может осуществляться в различных компартментах клетки и связан с гемовыми структурами, железо- и серосодержащими кластерами и молибденсодержащими ферментами (Feelish et al., 2008). Изучение метаболизма нитрита в различных тканях и в широком диапазоне парциального давления кислорода (Curtis et al., 2012) показало, что нитрит-редуктазная активность пропорциональна относительной экспрессии ферментативного белка в ткани и может по-разному изменяться для разных белков и у разных видов животных. Такого рода данные пока немногочисленны и зачастую противоречивы.

Поэтому в настоящем обзоре мы ограничимся данными, касающимися роли гемосодержащих белков в гипоксической сигнализации в клетках и тканях позвоночных животных, и попытаемся связать их нитрит-редуктазную активность с таковой их эволюционных предшественников. Это интересно еще и потому, что в последние годы были открыты новые гемосодержащие белки у организмов, стоящих на более низких уровнях развития, чем позвоночные (Vinogradov et al., 2006; Burmester, Hankeln, 2014).

Эволюция структуры и функций глобинов

Представители древнего семейства гемосодержащих белков (глобинов) начали эволюционировать в то время, когда атмосфера Земли была в значительной степени анаэробной, но кислород уже присутствовал (возможно, за счет хлорофильного фотосинтеза или фотолиза паров воды) и появились организмы, энергетика которых зависела от его использования, т. е. от дыхания. Они должны были развить сенсорные системы для детектирования кислорода в окружающей среде. В настоящее время такие системы, как правило, связаны с белками, содержащими в своем составе металлы с переменной валентностью, например цитохромами или другими гемопротеидами. Есть достаточно убедительные доказательства того, что предшественником гемоглобинов был цитохром типа b₅. В настоящее время представители этой группы белков обнаружены во всех царствах Древа жизни: Archea, Bacteria и Eukaryota (Hardison, 1998).

Доступность информации о геномах всех трех царств жизни в корне изменила наши представления о суперсемействе глобинов (Vinogradov et al., 2006). Сегодня очевидно, что гемоглобины, рассматриваемые как гемопротеины, содержащие 5—8 альфа-спиралей с инвариантным гистидином в позиции α-спирали F8, представляющим собой проксимальный лиганд гемового железа, существуют как три семейства, каждое из которых имеет два структурных класса — химерный и однодоменный. Только Bacteria имеют представителей обоих классов всех трех семейств белков. В царствах Archea и Eucaryota отсутствуют соответственно химерные флавогемоглобины и глобины, связанные с сенсорными молекулами (Vinogradov, Moens, 2008).

На основании данных сравнительных исследований разных семейств бактериальных глобинов и одноклеточных эукариот было сделано предположение о том, что все эукариотические глобины и все глобины беспозвоночных и растений произошли от предковых бактериальных однодоменных флавогемоглобинов (Vinogradov, Moens, 2008).

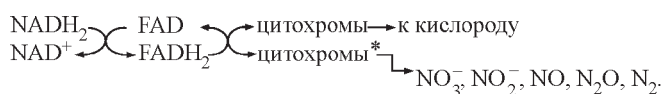
Модель эволюции глобинов базируется на двух предпосылках. Первая состоит в том, что три глобиновых семейства возникли и эволюционировали в составе бактерий, начиная от зарождения жизни (4100—3500 млн лет назад) до эндосимбиотического внедрения пластид и митохондрий в одноклеточные эукариотические организмы (1600—1000 млн лет назад). Вторая предпосылка состоит в том, что горизонтальный перенос соответствующих генов, либо совпадающий, либо отстоящий по времени от эндосимбиотического внедрения, но происходивший до появления многоклеточных животных (900—600 млн лет назад), породил предшественников всех глобиновых генов эукариот (Vinogradov, Moens, 2008).

Известно, что NO может продуцироваться многими бактериями, растениями и животными. Это продукт денитрификации, нитрификации и восстановления нитрата (Hochachka, Somero, 2002).

Выживание организма в условиях недостатка кислорода чаще всего связано с использованием «заместительных» функций (Hochachka, Somero, 2002). Лучше всего, по крайней мере в энергетическом отношении, с этой проблемой справились денитрифицирующие бактерии. Главная особенность их метаболизма состоит в том, что в отсутствие кислорода они способны переключаться на нитратное дыхание. При этом нитрат восстанавливается до N₂ — продукта, вполне аналогичного CO₂ и даже ме-

нее опасного для клетки. Группа денитрифицирующих бактерий довольно обширна и включает в себя разнообразные бациллы и псевдомонады. Некоторые бактерии способны к нитратному (нитритному) дыханию, при котором нитрат восстанавливается до нитрита.

При денитрификации, как и при дыхании кислородом, органический субстрат может полностью окисляться до CO_2 и H_2O в реакциях гликолиза и цикла Кребса. NADH_2 и FADH_2 по-прежнему используются в качестве доноров электронов для дыхательной цепи. Однако нитрит не просто заменяет кислород, в нитратном дыхании участвуют особые цитохромы* и мембранно-связанные ферментные системы, которые последовательно восстанавливают нитрат до нитрита и далее до N_2 . Этот процесс состоит по крайней мере из 4 этапов:



Разнообразие гемоглобинов в бактериях, существовавших в анаэробной среде, позволяет предположить, что характерная транспортная функция гемоглобинов позвоночных появилась относительно недавно при адаптации к увеличивающейся концентрации кислорода, а наиболее древними функциями гемоглобинов должны быть энзиматическая (утилизация NO и кислорода) и сенсорная (по отношению к кислороду) (Vinogradov, Moens, 2008).

Наиболее важной и хорошо изученной функцией флавоглобинов патогенных дрожжей и бактерий является защита от токсического действия NO. В отсутствие флавоглобинов мутанты имеют низкую патогенность и повышенную чувствительность к NO. Реакция на NO выражается увеличенной экспрессией 1 из 4 генов флавоглобина (Hromatka et al., 2005). У *Escherichia coli* при аэробных условиях флавоглобин диоксигенирует NO с высокой эффективностью и точностью. Эта активность превышает активность гемоглобина или миоглобина в 20 раз (Gardner, 2005). Известно, что флавоглобины, утилизируя NO, защищают патогенные организмы от иммунной системы хозяина. Подобного рода защита в виде утилизации NO, образующегося при восстановлении нитратов и нитритов, существует и у непатогенных организмов, например у *Bacillus subtilis*, обитающих в почве (Rogstam et al., 2007).

По имеющимся в настоящее время данным, почти все эукариотические глобины происходят от общего предка. Об этом свидетельствует эволюционное древо, построенное на основании экзон-интронной структуры их генов (Hardisson, 1998). В процессе эволюции наиболее консервативной оказалась третичная структура глобинов. Несмотря на то что при сравнении растительного глобина люпина и миоглобина кашалота инвариантными являются 17 % всех аминокислот, эти белки оказались очень близкими по третичной структуре, вплоть до расположения восьми α -спиральных участков.

Глобины позвоночных отделились от других глобинов примерно 650 млн лет назад. К настоящему времени описано восемь различных глобинов. Филогенетический анализ обнаружил, что они представляют собой две глобиновые ветви, которые возникли еще до разделения первичноротых и вторичноротых. Одна ветвь включает в себя специфические глобины позвоночных (гемоглобины альфа и бета, миоглобин, цитоглобин, глобин E и глобин Y), а другая — нейроглобин, глобин X, андроглобин

и некоторые нейроспецифические глобины беспозвоночных (Blank, Burmeister, 2012; Hoogewijs et al., 2012; Stotz et al., 2013). В то время как гемоглобин и миоглобин давно известны как дыхательные белки, в последние годы были обнаружены другие функции глобинов. Среди них участие в метаболизме NO, детоксикация активных форм кислорода (АФК), защита от апоптоза, передача сигнала и участие в метаболизме липидов (Burmeister, Hankeln, 2014).

Многие глобины позвоночных сохранили две основные функции глобинов бактерий — способность взаимодействовать с NO по диоксигеназной реакции оксигенированного гемоглобина (oxy-Hb) с образованием метгемоглобина (metHb) и нитрата:



и возможность в условиях гипоксии восстанавливать нитрит (транспортную форму NO) в биоактивную форму (NO) по нитрит-редуктазной реакции:



Эти реакции позволяют глобинам принимать участие в гипоксическом NO-сигналинге в крови, гладких мышцах сосудов, кардиомиоцитах и скелетных мышцах. При этом нитрит может храниться и свободно диффундировать. По мере понижения напряжения кислорода деоксигенированные глобины действуют как нитрит-редуктазы, поставляя NO для гипоксического сигналинга. При восстановлении нормального напряжения кислорода в клетках NO превращается в нитрат по диоксигеназной реакции. Далее рассмотрим роль в гипоксическом сигналинге каждого из изученных глобинов позвоночных.

Гемоглобин — аллостерический регулятор вазодилатации

Гемоглобин появился в эволюции позже, чем миоглобины и цитоглобины, и его эволюция связана с выходом позвоночных на сушу. При этом средняя скорость эволюции разных частей молекулы белка была непостоянной и имела максимум 400—500 лет назад. Этот максимум соответствует формированию четвертичной структуры. Большинство гемоглобинов представляют собой тетрамерные агрегаты, состоящие из двух α -субъединиц и двух β -субъединиц, имеющих участки контакта α_1 - β_1 , α_1 - β_2 и т. д. Максимум скорости эволюции четко выявляется для центра контакта α_1 - β_2 и регуляторного центра связывания дифосфоглицерата (Ратнер, 1998). Как и миоглобин, каждая из субъединиц гемоглобина способна связывать газобразные лиганды, такие как O_2 , NO и CO (Perutz, 1990). Известно, что гемоглобин экспрессируется исключительно в красных клетках крови, эритроцитах, хотя в последнее время появляются сообщения об экспрессии α -цепей гемоглобина в микроваскулярных эндотелиальных клетках (Rahaman, Straub, 2013). В сердечно-сосудистой системе эритроцитарный гемоглобин доставляет O_2 и удаляет CO_2 из периферических тканей. Он делает это посредством кооперативного связывания O_2 в легких и доставки его к капиллярам, где кислород входит в паренхимные клетки и обменивается на CO_2 (Perutz, 1990). Механически эти функции осуществляют гемовые группы, которые содержат один атом железа в восстановленном состоянии

(Fe²⁺), в котором 5 из 6 координационных центров в железе заняты: 4 — порфириновыми кольцами и 1 — проксимальным гистиридиновым остатком глобиновой полипептидной цепи, окружающей гем. Шестой координационный центр обратимо связывается с O₂ и CO₂. Во время кардиореспираторного цикла доставка O₂ и удаление CO₂ не индуцируют никаких ковалентных или окислительно-восстановительных изменений у железа гемовой группы.

Гемоглобин является первым глобином, для которого была открыта реакция с нитритом в отсутствие кислорода (Brooks, 1937). Было показано, что 1 моль протонированного нитрита и 2 моля деоксигенированного гемоглобина (HbFe²⁺) дают 1 моль метгемоглобина и 1 моль нитрозил-Hb (HbFe²⁺-NO). Далее было показано, что классическое свойство гемоглобина (кооперативность связывания кислорода) действительно и в отношении превращения нитрита в NO (Huang et al., 2005), т. е. нитрит-редуктазная активность гемоглобина аллостерически связана с парциальным давлением кислорода.

Одним из наиболее значительных возражений против возможности функционирования образованного гемоглобином NO как физиологического вазодиллятора является то, что скорость диоксигеназной реакции (1) больше скорости нитрит-редуктазы (2), поэтому образованный NO может метаболизировать в эритроцитах. Но оказалось, что в последней реакции образуется интермедиат, который может диффундировать из эритроцитов и затем превращаться в NO. Этим интермедиатом является N₂O₃, который превращается в NO и NO₂ в кровяном русле или прямо нитрозилирует тиолы (Jeffer et al., 2005; Basu et al., 2007).

Физиологические исследования показали, что в присутствии гемоглобина нитрит удовлетворяет основным критериям эффектора гипоксической вазодилляции: 1) имеет естественное происхождение, 2) метаболизируется в NO в ответ на клеточную гипоксию и 3) может в значительной степени расширять сосуды в ответ на гипоксию при парциальном давлении кислорода 20—40 мм рт. ст. Действительно, на кольцах аорты было показано, что вазодилляция в присутствии эритроцитов и нитрита инициируется при напряжении кислорода 40 мм рт. ст. для эритроцитов крыс и 30 мм для эритроцитов человека, что соответствует величине P₅₀ гемоглобина (Crawford et al., 2006).

Таким образом, благодаря быстрой деоксигенации гемоглобина при переходе из артерий в вены нитрит под действием гемоглобиновой нитрит-редуктазы превращается в NO, который может либо образовать легко диффундирующий N₂O₃, либо NO может находиться в составе нитрозил-гемоглобина (и освобождаться при окислительном денитрозилировании), либо может окисляться в нитрат (по диоксигеназной реакции). Как только напряжение кислорода в крови понижается, биоактивный пул нитрита в присутствии гемоглобина генерирует NO и регулирует сигналинг, приводящий к гипоксической вазодилляции по хорошо известной сигнальной последовательности: NO—растворимая гуанилатциклаза—цГМФ-вазодилляция (Gladwin, Kim-Shapiro, 2008).

Миоглобин — регулятор окислительного метаболизма сердца при гипоксии

Миоглобин является мономерным гемосодержащим глобином, хорошо известным хранителем кислорода внутри клетки. Подобно гемоглобину, он обладает спо-

собностью связывать газообразные лиганды O₂, NO и CO по 6-й координатной позиции железа. В сердечно-сосудистой системе миоглобин в значительной степени экспрессирован в цитоплазме кардиомиоцитов и в меньшей степени в гладких мышцах сосудов. Функционально миоглобин может выполнять множество ролей в клетках сосудов. Сначала было показано, что он обратимо связывает и диссоциирует O₂ в соответствии с гиперболической кривой. В сердечной мышце миоглобин имеет большое сродство к O₂ (P₅₀ равен 1 мм рт. ст.) и цитозольный пул O₂ составляет от 30 до 50 % насыщения. Согласно биохимическим данным, в работающей мышце миоглобин является идеальным кандидатом для кратковременного хранения кислорода и своевременной доставки в случае гипоксии. В настоящее время эта функция миоглобина принимается большинством исследователей. В меньшей степени миоглобин может опосредовать облегченную диффузию кислорода *in vivo* (Rahaman, Straub, 2013).

Исследование роли гемосодержащих глобинов как функциональных нитрит-редуктаз, которые регулируют реакцию клеток на гипоксию, оказалось очень продуктивным. Особенно это видно на примере миоглобина. В таких тканях, как сердце, печень, мозг и аорта, уровни нитрита (0.5—10 мкМ) значительно выше, чем в крови (0.12—0.13 мкМ) (Dejam et al., 2005).

Известно, что в этих тканях NO регулирует гипоксический сигналинг в отношении таких функций, как дыхание и биогенез митохондрий (Shiva et al., 2001; Nisoli et al., 2003), экспрессия фактора, чувствительного к гипоксии (HIF1) (Brune, Zhou, 2003), и ангиогенез (Kuwabara et al., 2006). В тканях в условиях гипоксии NO производится только из нитрита, так как NO-синтаза не работает в отсутствие O₂. И тогда вступают в действие нитрит-редуктазы гемо- и миоглобина. Когда концентрация кислорода понижается до величины P₅₀ миоглобина (3.1 мкМ), миоглобин деоксигенирует и восстанавливает присутствующий нитрит в биодоступный NO (Shiva et al., 2007). Миоглобин обеспечивает постоянную продукцию NO вдоль достаточно больших градиентов напряжения кислорода в тканях. При этом уменьшение pH ткани ускоряет эту реакцию.

Свойства миоглобина как нитрит-редуктазы отличаются от таковых гемоглобина. Хотя он восстанавливает нитрит при очень низких напряжениях кислорода, из-за высокого сродства к кислороду (низкого P₅₀) этот мономерный белок имеет очень низкий окислительно-восстановительный потенциал (Huang et al., 2005). Его потенциал соответствует таковому R-состояния тетрамера гемоглобина. В связи с низким потенциалом миоглобин восстанавливает нитрит в 60 раз быстрее, чем гемоглобин T-конформации. Так как миоглобин является мономерным белком и не обладает аллостерией, как гемоглобин, реакция нитрита с дезоксимиоглобином является реакцией второго порядка с константой скорости 12 M⁻¹S⁻¹ (при 37 °C и pH 7.4), в результате которой образуются метмиоглобин и нитрозил-миоглобин.

Основной физиологической мишенью активированного миоглобином нитрита во время гипоксии или ишемии являются митохондрии (Rassaf et al., 2007; Shiva et al., 2007, 2011). Непосредственная ассоциация миоглобина с митохондриями в сердечной ткани и скелетной мышце вызывает вопрос о существовании дополнительных механизмов взаимодействия между миоглобином и этими органеллами клетки (Brunori, 2001).

Медиаторы, мишени и ответ клеток и тканей позвоночных при гипоксической сигнализации

Сигналинг	Глобины как медиаторы гипоксической сигнализации			
	миоглобин сердца и скелетных мышц	нейроглобин нервных клеток	гемоглобин эритроцитов крови	миоглобин и цитоглобин гладких мышц
Молекулярные медиаторы Мишени сигнализации	NO ₂ ⁻ → NO → N ₂ O ₃		NO ₂ ⁻ → NO → pГЦ → цГМФ → ПКГ	
Ответ клетки (ткани)	ЭТЦ митохондрий Комплекс I (S—NO) Уменьшение генерации АФК, защита миокарда после ишемии—реперфузии	ЭТЦ митохондрий Комплекс IV (Fe ²⁺ —NO) Уменьшение поглощения O ₂ , расширение градиентов O ₂ в миокарде, увеличение толерантности к физической нагрузке	Кальциевые каналы [Ca ²⁺] ↓ Вазодилатация и увеличение транспорта O ₂ к органам в результате снижения концентрации кальция в гладких мышцах сосудов	

Примечание. ЭТЦ — электрон-транспортная цепь митохондрий, ПКГ — протеинкиназа G, pГЦ — растворимая гуанилатциклаза, S—NO — нитрозотиолы; Fe²⁺—NO — нитрозильные комплексы железа.

Хотя внутри митохондрий существуют различные белковые мишени, к настоящему времени лучше всего изучены зависящие от нитрита модификации двух сайтов дыхательной цепи и их влияние на функции митохондрий (см. таблицу).

Первый сайт, подвергающийся модификации, — это цитохром *c*-оксидаза (комплекс IV). Было показано, что у интактных мышечных во время гипоксии повышаются нитритзависимая генерация NO, степень нитрозилирования цитохром *c*-оксидазы и образование нитрозотиолов, а у мышечных с нокаутом по миоглобину при перфузии сердца нитритом этих изменений нет (Hendgen-Cotta et al., 2008). Полагают, что связывание NO с гемом комплекса IV, приводящее к ингибированию дыхания, вовлечено в физиологическую регуляцию градиентов кислорода в клетках во время гипоксии и увеличение толерантности к физической нагрузке (Larsen et al., 2007).

Второй сайт, подвергающийся зависимой от нитрита и связанной с ферментативной активностью миоглобина модификацией, — это комплекс I митохондрий (NADH-убихиноксидоредуктаза). Крупный белок, состоящий из 46 субъединиц, является местом входа электронов в дыхательную цепь и ключевым сайтом генерации АФК в митохондриях. Предполагают, что блокирование комплекса I может способствовать защите клеток от АФК посредством блокирования входа электронов в респираторную цепь и, таким образом, уменьшения «вспышки» генерации АТФ, связанной с реперфузией. В подтверждение этого механизма показано, что изолированные митохондрии в условиях аноксии *in vitro* (реперфузии) и обработанные при этом нитритом, генерировали значительно меньше перекиси водорода, чем те, к которым не добавляли нитрит (Shiva et al., 2007). Возможные механизмы регуляции функций митохондрий и участие в них миоглобина отражены в таблице.

Широко распространено представление о том, что миоглобин экспрессируется только в поперечнополосатых мышцах и сердце, однако теперь уже известно, что он есть и в других тканях, в том числе в гладких мышцах сосудов, где его функцией тоже является нитрит-редуктазная активность (Totzeck et al., 2012). Опосредованная миоглобином передача сигнала при гипоксии приводит к релаксации гладких мышц сосудов по известной последовательности событий: NO → растворимая гуанилатциклаза → цГМФ → физиологический ответ. Оказалось, что у мышечных, нокаутных по миоглобину, снижена способность

к вазодилатации до 54 % от контрольного значения, что указывает на специфическую роль миоглобина в этом процессе (Totzeck et al., 2012). При этом у контрольных мышечных был обнаружен более высокий уровень цГМФ. Таким образом, нитрит-редуктазная активность миоглобина участвует и в гипоксическом нитритном сигналинге в гладких мышцах сосудов.

Цитоглобин — регулятор растворимой гуанилатциклазы при гипоксии

Цитоглобин, открытый тремя независимыми группами исследователей (Kawada et al., 2001; Burmester et al., 2002; Trent, Hargrove, 2002), существует у всех изученных позвоночных, включая миног (Burmester, Hankeln, 2014). Рекombинантный цитоглобин представляет собой димер, у которого сродство к кислороду аналогично миоглобину Mb (порядка 1 мм рт. ст.). Большинство исследований показывает, что цитоглобин находится в фибробластах и в некоторых нейронах (ядре и цитоплазме) (Schmidt et al., 2004). Возможно, что его функции различны в клетках этих типов. Не обнаружено корреляции между содержанием цитоглобина и поглощением кислорода, поэтому функционирование его как дыхательного белка маловероятно (Hankeln et al., 2005). Есть предположение о том, что он может участвовать в синтезе коллагена (Schmidt et al., 2004), увеличении активности поглощающей кислород NO-синтазы (Hankeln, 2002), передаче сигнала, связанного с липидами (Reeder et al., 2011), и в защите от АФК (Singh et al., 2014). Колокализация цитоглобина и nNOS в нейронах мозга может свидетельствовать о его участии в метаболизме NO в этих клетках (см. обзор: Burmester, Hankeln, 2014).

Цитоглобин является гексакоординатным гемовым белком, в котором проксимальный и дистальный гистидины занимают соответственно 5-й и 6-й сайты координации с железом гема (De Sanctis et al., 2004). Поэтому цитоглобин должен находиться в переходной пятикоординатной форме, чтобы иметь сайт связывания нитрита. В цитоглобине экзогенные лиганды должны замещать дистальный гистидин, чтобы образовать новый комплекс. Поэтому изменение pH или окислительно-восстановительного состояния, которое влияет на диссоциацию дистального гистидина, может увеличить скорость связывания нитрита и дальнейшего окисления им цитоглобина.

Исследования редуктазной активности цитоглобина, проведенные в анаэробных условиях, с помощью EPR-спектроскопии, спектрофотометрии и хемилюминесценции показали, что связывание нитрита с цитоглобином (Fe^{2+}) приводит к образованию цитоглобина (Fe^{3+}) и NO. При этом количество NO увеличивается с повышением концентрации нитрита, а также при ацидозе и сильном снижении парциального давления кислорода (Li et al., 2012).

В культуре гладкомышечных клеток при добавлении нитрита активность растворимой гуанилатциклазы значительно выше — приблизительно на 40 % по сравнению с клетками, у которых отсутствовал цитоглобин, и на 60 % по сравнению с клетками, предварительно находившимися в условиях гипоксии в течение 48 ч (Li et al., 2012). Известно, что гипоксия увеличивает уровень цитоглобина до 10 раз (Schmidt et al., 2004).

Таким образом, восстановление нитрита, опосредованное цитоглобином, может играть важную роль в генерации NO и активации растворимой гуанилатциклазы при гипоксии. При этом процесс регулируется pH, напряжением кислорода, концентрацией нитрита и окислительно-восстановительным состоянием клеток (см. таблицу).

Нейроглобин — аллостерический регулятор нейропротективной сигнализации

Первоначально нейроглобин был идентифицирован как глобин, экспрессирующийся в нейронах (Burmester et al., 2000). Нейроглобин (Ngb) появился около 800 млн лет назад, еще до дивергенции генов позвоночных и беспозвоночных. Он экспрессируется также в кардиоваскулярной системе, в симпатических нервах. Однако его экспрессии не было обнаружено в системном эндотелии или гладких мышцах сосудов (Hankeln et al., 2005). Было показано, что гипоксия увеличивает экспрессию Ngb. Сродство Ngb к O_2 зависит от изменений pH и температуры, поэтому он может увеличивать снабжение нервной ткани кислородом. Ngb может также связывать активные формы кислорода и азота, выполняя нейропротекторную роль после ишемии и реперфузии в мозге (Li et al., 2010).

Подобно гемоглобину и миоглобину, Ngb способен участвовать в детоксикации NO (Brunori et al., 2005) или действовать как нитрит-редуктаза и генерировать NO, который может временно ингибировать комплексы электрон-транспортной цепи митохондрий и защищать их от повреждения активными формами кислорода. Было показано, что нитрит-редуктазная активность нейроглобина ингибирует клеточное дыхание за счет связывания NO с комплексом IV — оксидазой цитохрома *c* (Tiso et al., 2011).

Этой же группой исследователей (Tiso et al., 2011) было продемонстрировано, что нейроглобин, подобно цитоглобину, регулирует внутриклеточную NO-сигнализацию при гипоксии в зависимости от перехода его шестикоординатной конформации в пятикоординатную.

Эта функция нейроглобина регулируется редокс-чувствительными поверхностными тиоловыми группами цистеинов в положениях 55 и 46, состояние которых влияет на превращение шестикоординатного гема в пятикоординатный, связывание нитрита и образование NO (Tiso et al., 2011).

Замещение дистального гистидина лейцином или глутаматом приводит к стабильной пятикоординатной геометрии; такие мутанты нейроглобина восстанавливают нитрит до NO примерно в 2000 раз быстрее, чем диккий тип, в то время как замена Cys-55 или Cys-46 на аланин стабилизирует шестикоординатную структуру и замедляет реакцию (Tiso et al., 2011).

Эти исследования позволяют предположить, что нейроглобин может функционировать как физиологический сенсор окислительного стресса и пост-трансляционно регулируемая нитрит-редуктаза под контролем перехода гема от шести- к пятикоординатной структуре. Вышеупомянутые авторы предложили гипотезу, согласно которой семейство шестикоординатных гемосодержащих белков может выполнять функцию окислительного регулирования NO-сигнализации во время гипоксии. Это изменение конформации может участвовать в гипоксической нейропротективной сигнализации и контроле клеточного дыхания во время гипоксии. Идентификация других аллостерических регуляторов перехода от шести- к пятикоординатной структуре гемового «кармана» нейроглобина поможет обнаружить новые внутриклеточные механизмы, контролирующие NO-сигнализацию, осуществляемую при восстановлении нитрита.

Данные о гемосодержащих глобинах как медиаторах гипоксической сигнализации приведены в таблице.

Другие глобины позвоночных и их значение для эволюции

Как уже было сказано в разделе «Эволюция структуры и функций глобинов», в последние годы открыто еще несколько белков позвоночных, относящихся к группе гемосодержащих глобинов. Если следовать хронологии открытия глобинов позвоночных, то следующим после цитоглобина был открыт глобин E. Далее были открыты глобин X, глобин Y и андроглобины. Подробное рассмотрение функций и эволюции глобинов приведено в обзоре (Burmester, Hankeln, 2014).

Специфичный для глаз глобин GbE первоначально обнаружен у цыпленка (Kugelstadt et al., 2004), затем в геномах других птиц и у черепах (Burmester, Hankeln, 2014). GbE связывает кислород с чуть меньшим сродством, чем миоглобин, он филогенетически близок к миоглобину и может иметь аналогичную функцию снабжения кислородом метаболически активной сетчатки глаза (Blank et al., 2011).

Андроглобины представлены семейством химерных белков с N-терминальным кальпаин-подобным доменом, внутренним глобиновым доменом и IQ-кальмодулинсвязывающим мотивом (Hoogewijs et al., 2012). У человека и мыши этот белок экспрессируется главным образом в семенниках. По третичной структуре глобинового домена он соответствует другим глобинам, но данный домен разделен на две половины. Гены андроглобина найдены почти у всех многоклеточных животных.

Глобин X (GbX) — это мембранно-связанный белок нервной системы, идентифицированный у многих многоклеточных животных, беспозвоночных и низших позвоночных, но не у птиц и млекопитающих (Roesner et al., 2005; Blank, Burmester, 2012). Последовательности аминокислот у глобина X длиннее, чем у типичных глобинов (примерно 200 аминокислот). Еще он отличается наличием N-терминальных сайтов ацилирования (миристинили-

рования по Gly-2 и пальмитилирования по Cys-3), по которым он связывается с мембраной. Таким образом, он может участвовать в защите мембранных липидов или передаче сигнала через мембрану, хотя его точная функция неизвестна (Blank et al., 2011).

Глобин Y (GbY) имеет типичную для глобина структуру и сначала был идентифицирован у земноводных, сначала у *Xenopus* (Fuchs et al., 2006), а потом у других видов. У *Xenopus* обнаружена значительная экспрессия РНК этого белка в яичниках, почках, глазах и легких. Функция белка точно не установлена.

Подобно нейро- и цитоглобинам, три последние группы глобинов являются гексакоординированными, и это означает, что гексакоординированность была исходным состоянием для Fe²⁺ в гемовой группе дезоксиглобинов. Шестикоординированность, которая типична для большинства глобинов, участвующих в дыхании, подобно гемоглобину и миоглобину, является более поздним приобретением эволюции (Burmester, Hankeln, 2014).

Глобин X и глобин X-подобные белки широко распространены у многоклеточных, а также у растений, бурых водорослей и грибов (Blank, Burmester, 2012). На рыбах (*Zebrafish*) было показано, что ацилирование глобина GbX опосредует связывание его с мембраной, локализацию, которая предшествовала функционированию GbX как обычного дыхательного белка. Возможно, GbX, защищая мембранные липиды от окисления, участвует в передаче сигнала, который был опосредован через другие ацилированные, связанные с мембраной белки. Таким образом, дыхательные глобины животных могли реально происходить от связанного с мембраной предшественника, функцию которого сегодня мы наблюдаем у GbX (Burmester, Hankeln, 2014).

Еще 15 лет назад считали, что только гемоглобин и миоглобин являются единственными представителями глобинов и оба участвуют в снабжении тканей кислородом, но теперь эта точка зрения коренным образом изменилась. Наступление геномной эры привело к беспрецедентному открытию многочисленных дополнительных типов глобинов с не вполне понятной экспрессией в многочисленных тканях, отличных от крови и поперечнополосатых мышц. В то же время эта информация позволяет проследить эволюционное вовлечение глобинов в процесс дыхания.

Филогенетическая древность и широкое распространение глобинов в бактериях, грибах, протистах и животных показывают, что глобины позвоночных произошли от белка, который уже существовал более 1000 млн лет назад (Vinogradov, Moens, 2008). Функция этого первого глобина неизвестна. Однако многоклеточные животные и, следовательно, их глобины эволюционировали в оксигенированной атмосфере и, по-видимому, уже имели способность связывать кислород. Тем не менее маловероятно, чтобы эти белки имели реальные дыхательные функции, так как первые животные были очень небольшого размера и снабжались кислородом посредством диффузии. Таким образом, предшественник животных глобинов, вероятно, участвовал в осуществлении сенсорной функции в отношении O₂, в детоксикации активных форм кислорода и азота или был O₂-зависимым ферментом другого типа, например нитрит-редуктазой. Из данных, приведенных в настоящем обзоре, можно видеть, что способность осуществлять подобного рода функции в условиях гипоксии сохранилась у прошедших длительную эволюцию глобинов позвоночных животных.

Список литературы

- Ratner V. A. 1998. Молекулярная эволюция. Сорос образоват. журн. 3 : 41—47. (Ratner V. A. 1998. Molecular evolution. Soros Educational J. 3 : 41—47.)
- Basu S., Grubina R., Huang J., Conradie J., Huang Z., Jeffers A., Jiang A., He X., Azarov I., Seibert R., Mehta A., Patel R., King S. B., Hogg N., Ghosh A., Gladwin M. T., Kim-Shapiro D. B. 2007. Catalytic generation of N₂O₃ by the concerted nitrite reductase and anhydrase activity of hemoglobin. Nat. Chem. Biol. 3 : 785—794.
- Blank M., Burmester T. 2012. Widespread occurrence of N-terminal acylation in animal globins and possible origin of respiratory globins from membrane bound ancestor. Mol. Biol. Evol. 29 : 3553—3561.
- Blank M., Wollberg J., Gerlach F., Reimann K., Roesner A., Hankeln T., Fago A., Weber R. E., Burmester T. 2011. A membrane-bound vertebrate globin. PLoS one. 6 : e 25292.
- Brooks J. 1937. The action of nitrite on haemoglobin in the absence of oxygen. Proc. Royal. Soc. London Biol. Sci. 123 : 368—382.
- Brune B., Zhou J. 2003. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha). Curr. Med Chem. 10 : 845—855.
- Brunori M. 2001. Nitric oxide, cytochrome c oxidase and myoglobin. Trends Biochem. Sci. 26 : 21—30.
- Brunori M., Giuffrè A., Nienhaus K., Nienhaus G. U., Scancurlurra F. M., Vallone B. 2005. Neuroglobin, nitric oxide and oxygen: functional pathways and conformational changes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102 : 8483—8488.
- Burmester T., Ebner B., Weich B., Hankeln T. 2002. Cytoglobin: novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. Mol. Biol. Evol. 19 : 416—421.
- Burmester T., Hankeln T. 2014. Function and evolution of vertebrate globins. Acta Physiol. (Oxf.). 211 : 501—514.
- Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T. A. 2000. A vertebrate globin expressed in the brain. Nature. 407 : 520—523.
- Cooper C. E. 1999. Nitric oxide biochemistry. Biochim. biophys. acta. 1411 : 217—488.
- Crawford J. H., Isbell T. S., Huang Z., Shiva S., Chacko B K., Schechter A. N., Darley-Usmar V. M., Kerby J. D., Lang J. D., jr., Kraus D., Ho C., Gladwin M. T., Patel R. P. 2006. Hypoxia, red blood cells and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. Blood. 107 : 566—571.
- Curtis E., His L., Noguchi A., Geary L., Shiva S. 2012. Oxygen regulates tissue, nitrite metabolism. Antioxidants Redox Signaling. 17 : 551—961.
- Dejam A., Hunter C. J., Pelletier M. M., Hsu L. L., Machado R. F., Shiva S., Power G. G., Kelm M., Gladwin M. T., Schechter A. N. 2005. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. Blood. 106 : 734—739.
- De Sanctis D., Pesce A., Nardini M., Bolognesi M., Bocedi A., Asegni P. 2004. Structure-function relationships in the growing hexa-coordinate hemoglobin sub-family. IUBMB Life. 56 : 643—651.
- Felish M., Fernandez B. O., Bryan N. S., Garcia-Saura M. F., Bauer S., Whitlock D. R., Ford P. C., Janero D. R., Rodriguez J., Ashrafian H. 2008. Tissue processing of nitrite in hypoxia: an intricate interplay of nitric oxide-generating and -scavenging systems. J. Biol. Chem. 283 : 33 927—33 984.
- Fuchs C., Burmester T., Hankeln T. 2006. The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome. Cytogenet. Genome Res. 112 : 296—306.
- Gardner P. R. 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. J. Inorg. Biochem. 99 : 247—266.
- Gladwin M. D., Kim-Shapiro D. R. 2008. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. Blood. 112 : 2636—2647.
- Hankeln T. 2002. Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. Mol. Biol. Evol. 19 : 416—421.
- Hankeln T., Ebner B., Fuchs C., Gerlach F., Haberkamp M., Laufs T. L., Roesner A., Schmidt M., Weich B., Wystub S., Saaler-

- Reinhardt S., Reuss S., Bolognesi M., De Sanctis D., Marden M. C., Kiger L., Moens L., Dewilde S., Nevo E., Avivi A., Weber R. E., Fago A., Burmester T. 2005. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.* 99 : 110—119.
- Hardison R. 1998. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol.* 201 : 1099—1117.
- Hendgen-Cotta U. B., Kelm M., Rassaf T. 2014. Myoglobin's novel role in nitrite-induced hypoxic vasodilation. *Trends Cardiovasc. Med.* 24 : 69—74.
- Hendgen-Cotta U. B., Merx M. W., Shiva S., Schmitz J., Becher S., Klare J. P., Steinhoff H. J., Goedecke A., Schrader J., Gladwin M. T., Kelm M., Rassaf T. 2008. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105 : 10 256—10 261.
- Hochachka P. W., Somero G. N. 2002. *Biochemical Adaptation: mechanism and process in physiological evolution.* Oxford Univ. Press. 578 p.
- Hoogewijs D., Ebner B., Germani F., Hoffmann F. G., Fabrizio A., Moens L., Burmester T., Dewilde S., Storz J. F., Vinogradov S. N., Hankeln T. 2012. Androglobin: a chimeric globin in metazoans that is preferentially expressed in mammalian testes. *Mol. Biol. Evol.* 29 : 1105—1114.
- Hromatka B. S., Noble S. M., Johnson A. D. 2005. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 4814—4826.
- Huang K. T., Keszler A., Patel N., Patel R. P., Gladwin M. T., Kim-Shapiro D. B., Hogg N. 2005. The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin. Reassessment of reaction kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 280 : 31 126—31 131.
- Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D. B., Patel R. P., Ringwood L., Irby C. E., Huang K. T., Ho C., Hogg N., Schechter A. N., Gladwin M. T. 2005. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J. Clin. Invest.* 115 : 2099—2107.
- Ignarro L. J. 1999. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci. Reports.* 19 : 51—71.
- Jeffers A., Xu X. L., Huang K. T., Cho M., Hogg N., Patel R. P., Kim-Shapiro D. B. 2005. Hemoglobin mediated nitrite activation of soluble guanylyl cyclase. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 142 : 130—135.
- Kawada N., Kristensen D. B., Asahina K., Nakatani K., Minamiyama Y., Seki S., Yoshizaki K. 2001. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STPAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* 276 : 25 318—25 323.
- Kugelstadt D., Haberkamp M., Hankeln T., Burmester T. 2004. Neuroglobin, cytoglobin and a novel, eye-specific globin from chicken. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 : 719—725.
- Kuwabara M., Kakinuma Y., Ando M., Katare R. G., Yamasaki F., Doi Y., Sato T. 2006. Nitric oxide stimulates vascular endothelial growth factor production in cardiomyocytes involved in angiogenesis. *J. Physiol. Sci.* 56 : 95—101.
- Larsen F. J., Weitzberg E., Lungberg J. Q., Ekblom B. 2007. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta Physiol. (Oxf.)* 191 : 59—66.
- Li H., Hemann C., Abdelghany T. M., El-Mahdy M. A., Zweier J. L. 2012. Characterization of the mechanism and magnitude of cytoglobin-mediated nitrite reduction and nitric oxide generation under anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.* 287 : 36 623—36 633.
- Li R. C., Guo S. Z., Lee S. K., Gozal D. 2010. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30 : 1874—1882.
- Mishel T., Feron D. 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J. Clin. Invest.* 100 : 2146—2152.
- Nisoli E., Clementi E., Paolucci C., Cozzi V., Tonello C., Sciorati C., Bracale R., Valerio A., Francolini M., Moncada S., Carruba M. O. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science.* 299 : 896—899.
- Perutz M. F. 1990. Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Ann. Rev. Physiol.* 52 : 1—25.
- Rahaman M. M., Straub A. C. 2013. The emerging roles of somatic globins in cardiovascular redox biology and beyond. *Redox Biol.* 1 : 405—410.
- Rassaf T., Flogel U., Drexhage C., Hendgen-Cotta U. B., Kelm M., Schrader J. 2007. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin oxygen sensor and regulation of cardiac energetic and function. *Circ. Res.* 100 : 1749—1754.
- Reeder B. J., Svistunenko D. A., Wilson M. T. 2011. Lipid binding to cytoglobin leads to a change in haem co-ordination: a role for cytoglobin in lipid signaling of oxidative stress. *Biochem. J.* 434 : 483—492.
- Roesner A., Fuchs C., Hankeln T., Burmester T. 2005. A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals. *Mol. Biol. Evol.* 22 : 12—20.
- Rogstam A., Larsson J., Kjelgard P., von Wachelfeld L. F. 2007. Mechanisms of adaptation to nitrosative stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 189 : 3063—3071.
- Schmidt M., Gerlach F., Avivi A., Laufs T., Wystub S., Simpson J. C., Nevo E., Saaler-Reinhardt S., Reuss S., Hankeln T., Burmester T. 2004. Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 279 : 8063—8069.
- Shiva S. 2010. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide.* 22 : 64—74.
- Shiva S., Brookes P. S., Patel R. P., Anderson P. G., Darley-Usmar V. M. 2001. Nitric oxide partitioning in mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome *c* oxidase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 7212—7217.
- Shiva S., Huang Z., Grubina R., Sun J., Ringwood L. A., MacArthur P. H., Xu X., Murphy E., Darley-Usmar V. M., Gladwin M. T. 2007. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ. Res.* 100 : 654—661.
- Shiva S., Rassaf T., Patel R. P., Gladwin M. T. 2011. The detection of the nitrite reductase and NO-generating properties of hemoglobin by mitochondrial inhibition. *Cardiovasc. Res.* 89 : 566—573.
- Singh S., Canseco D. C., Manda S. M., Shelton J. M., Chirumamilla R. R., Goetsch S. C., Ye Q., Gerard R. D., Schneider J. W., Richardson J. A., Rothermel B. A., Mammen P. P. 2014. Cytoglobin modulates myogenic progenitor cell viability and muscle regeneration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 111 : E129—E138.
- Steinhoff H. J., Semmler D., Shiva S., Williams D., Kipar A., Gladwin M. T., Schrader J., Kelm M., Cossins A. R., Rassaf T. 2012. Nitrite regulate hypoxic vasodilation via myoglobin dependent nitric oxide generation. *Circulation.* 126 : 325—334.
- Storz J. F., Opazo J. C., Hoffmann F. G. 2013. Gene duplication, genome duplication and the functional diversification of vertebrate globins. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66 : 409—478.
- Tiso M., Tejero J., Basu S., Azarov I., Wang X., Simplaceanu V., Frizzell S., Jayaraman T., Geary L., Shapiro C., Ho C., Shiva S., Kim-Shapiro D. B., Gladwin M. T. 2011. Human neuroglobin functions as a redox-regulated nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 286 : 18 277—18 289.
- Totzeck M., Hendgen-Cotta U. B., Kelm M., Rassaf T. 2012. Crosstalk between nitrite myoglobin and reactive oxygen species to regulate vasodilatation under hypoxia. *PLoS ONE.* 9 : 1—10.
- Trent J. T., Hargrove M. S. 2002. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 277 : 19 538—19 545.
- Vinogradov S. N., Hoogewijs D., Bailly X., Arredondo-Peter R., Gough J., Dewilde S., Moens L., Vanfleteren J. R. 2006. A phylogenomic profile of globins. *BMC Evol. Biol.* 6 : 31—67.
- Vinogradov S. N., Moens L. 2008. Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage and sensing. *J. Biol. Chem.* 283 : 8773—8777.

THE ROLE OF HEME-CONTAINING GLOBINS IN HYPOXIC NO-SIGNALING
OF VERTEBRATE CELLS

N. V. Kuleva, I. E. Krasovskaya

Department of Biochemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034;
e-mail: nadezhda.kuleva@gmail.com

Nitric oxide is one of the most important signaling molecule of living organisms. It may be produced by two ways: from arginine by means of NO-syntases and from nitrite by means of nitrite reductases. The last way is realized mostly at hypoxic state of organisms and heme-containing globins of vertebrates (hemoglobin, myoglobin, cytoglobin, neuroglobin) mediate the transformation of NO₂ into NO by means of their nitrite reductase activities. Hypoxic NO-signaling depends on oxygen concentration and is important for exercise, vascular hypoxic vasodilation, myocardial preconditioning and angiogenesis. Data of scientific literature of last 15 years show that the nitrite-reductase activity of heme-containing globins was used for oxygen sensing and ROS/RNS defence at early stages of life evolution.

Key words: hemoglobin, myoglobin, cytoglobin, neuroglobin, nitrite, NO-signaling, molecular evolution.
