



УДК 577.112.088.52

© 1990 г.

Э. Г. Арутюнян, Т. Н. Сафонова, Г. В. Обморова,
А. В. Тепляков, А. Н. Попов, А. А. Русаков,
С. В. Рубинский, И. П. Куранова, Б. К. Вайнштейн

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ОКСИЛЕГГЕМОГЛОБИНА ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 1,7 Å

Институт кристаллографии АН СССР, Москва

Проведено рентгеноструктурное исследование комплекса леггемоглобина желтого люпина с кислородом (LbO₂). Эксперимент проводился при -20°С. Кристаллическая структура определена при разрешении 1,7 Å и уточнена до $R = 0,15$. Молекула кислорода образует с атомом Fe угол 81°. При этом расстояния от Fe до атомов лиганда составляют 2,00 и 2,17 Å, коэффициенты заселенности положений для атомов лиганда — 0,4 и 0,5. Низкие значения коэффициентов заселенностей, вероятно, обусловлены разупорядоченностью. При переходе Lb из дезокси- в оксиформу атом Fe смещается в сторону проксимального гистидина, в то время как в комплексах Lb с NO и CO атом Fe расположен практически в плоскости гема. Оксигенирование Lb также приводит к повороту имидазольного кольца проксимального гистидина относительно связи C^β-C^γ на 70°, вследствие чего разрывается водородная связь между N^{δ1} His F11 и атомом O Leu F7. Локализовано 254 молекулы воды. Обсуждается связь кинетических свойств Lb с его структурными характеристиками.

Гемоглобины, миоглобины и растительные гемоглобины осуществляют перенос и хранение молекулярного кислорода путем его связывания двухвалентным атомом железа гема — протетической группы этих белков. Миоглобин кашалота и гемоглобин человека были первыми белками, пространственная структура которых была определена в кристаллическом состоянии методом рентгеноструктурного анализа. Установленный в этих белках «миоглобиновый» тип свертывания полипептидной цепи и способ связывания ею молекулы гема оказался универсальным для более чем 10 гемоглобиновых белков, пространственная структура которых определена к настоящему времени.

Гемоглобиновые белки (B), выполняющие реакцию обратимого оксигенирования $B + O_2 \xrightleftharpoons[k']{k} BO_2$, функционируют в различных условиях. Поэтому кинетические параметры указанной реакции — константы скорости образования кислородного комплекса (k) и его диссоциации (k') — различны для разных гемоглобинов (табл. 1).

Естественно предположить, что строение каждого из гемоглобинов имеет особенности, обеспечивающие их различие в поведении при обратимом связывании молекулы кислорода, причем структура этих белков в дезоксисостоянии определяет скорость образования кислородного комплекса, а в оксисостоянии — скорость его диссоциации. Возможны два основных пути регулирования кинетики оксигенирования: 1) обеспечение большей или меньшей доступности гемового кармана при прохождении молекулы кислорода к атому железа гема и 2) формирование необходимой реакционной способности атома железа путем изменения электронной структуры активного центра.

Огромная разница в сродстве к молекулярному кислороду у гемоглобинов аскариды и морского червя (табл. 1) соответствует различию в энергии связывания кислорода всего лишь 7 ккал/моль. Следовательно, особенности строения различных гемоглобинов могут проявиться на весьма тонком уровне. Поэтому выводы о структурно-функциональных соотно-

Кинетика связывания молекулярного кислорода мономерными гемоглобинами [1]

Белок	k , $\text{мкМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	k' , с^{-1}	$K = k'/k$, нМ
Гемоглобин аскариды	1,5	0,004	2,7
Миоглобин кашалота	19	10	530
Леггемоглобин сои	118	4,4	37
Эритрокруорин	300	218	730
Гемоглобин морского червя	190	2800	14 700

Примечание: K — константа диссоциации, k — скорость образования кислородного комплекса, k' — скорость диссоциации комплекса.

Исследования в семействе гемоглобинов могут основываться на детальном изучении их строения при возможно высоком разрешении.

Имеющиеся в настоящее время структурные данные по мономерным гемоглобинам относятся к дезоксиэритрокруорину (дезоксигемоглобину) [2] и оксиэритрокруорину (EryO_2) [3], исследованным при разрешении 1,4 Å, дезоксимиоглобину (дезоксигемоглобину) [4] и оксимиоглобину (MbO_2) [5] — при разрешении 2,0 и 1,6 Å, дезоксигемоглобину (дезоксигемоглобину) [6] — при разрешении 2,0 Å. Эти исследования могут быть дополнены данными по модельным системам [7]. В настоящей статье приводятся результаты исследования оксигемоглобина (LbO_2) при разрешении 1,7 Å.

Молекула лиганда в комплексе LbO_2 была локализована по разностному синтезу электронной плотности с коэффициентами $(2F_o - F_c) \exp(i\alpha_c)$, где F_o и F_c — экспериментальные и рассчитанные значения структурных амплитуд, α_c — рассчитанные значения фаз. На рис. 1 показан фрагмент этого синтеза с максимумом электронной плотности удлиненной формы в области предполагаемого расположения молекулы кислорода. При расчете координат атомов кислорода и при последующем их уточнении расстояние O—O было принято равным 1,22 Å [3, 5]. Уточнение координат и температурных параметров атомов лиганда и растворителя чередовалось с уточнением коэффициентов заселенности положений. Величина этого коэффициента может принимать значения в интервале 0,0—1,0 и, как известно, коррелирует с величиной температурного фактора. Стартовые значения коэффициентов заселенности для атомов кислорода при уточнении были равны 1,0, что привело к значениям температурного фактора для них, равным 60 и 40 Å². Последующее чередующееся уточнение температурных факторов и коэффициентов заселенности привело к следующим значениям этих величин: 42 и 39 Å² для температурного фактора и 0,4 и 0,5 для коэффициентов заселенности — соответственно для атомов кислорода, связанного с атомом железа и удаленного от него.

Следует ли считать, исходя из имеющихся данных, что произошло лишь частичное связывание молекул кислорода молекулами белка в кристалле? Сравнение структур леггемоглобина в дезокси- и оксиформах показывает, что оксигенирование сопровождается весьма сильными конформационными перестройками в молекуле белка. Кроме того, условия получения оксикомплекса, а также данные спектрального контроля растворенного после съемки кристалла (см. «Экспериментальную часть») указывают на отсутствие дезокси- и мет-форм. На это же указывает низкое значение фактора расходимости между расчетными и экспериментальными структурными амплитудами ($R = \sum |F_c - F_o| / \sum |F_o| = 0,15$). Поэтому можно сделать вывод, что заселенность положений молекулой кислорода близка к полной, однако молекула характеризуется довольно высокой подвижностью, если судить по величине температурного фактора, близкой к 60 Å² для этого случая. Следует отметить, что и в модельных соединениях [7] отмечалась разупорядоченность лигандов (заселенности 0,6 и 0,4).

Стереохимические параметры связывания молекулы кислорода с атомом железа в Lb отличает ряд особенностей (табл. 2). Расстояния от

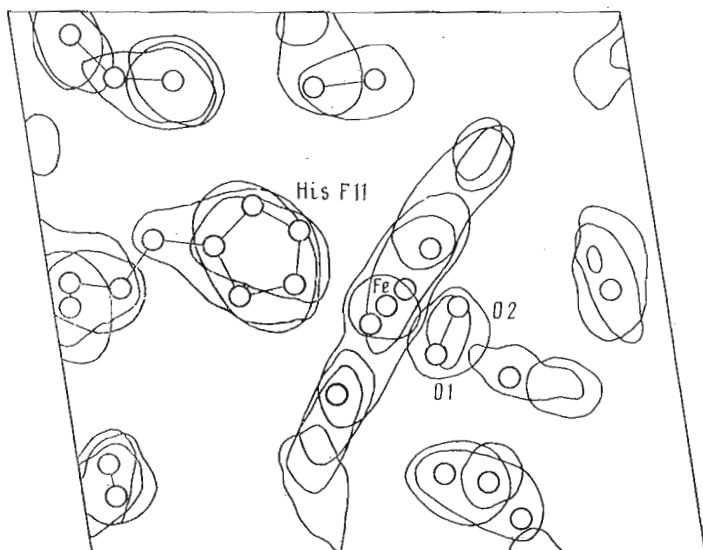


Рис. 1. Фрагмент разностного синтеза электронной плотности с коэффициентами $(2F_o - F_c)\exp(i\alpha_c)$. Кружками обозначены атомы лиганда, Fe, четыре окружающие его атома N гема, кислорода, а также атомы близлежащих аминокислотных остатков. Обозначения α -спиралей даны в соответствии с номенклатурой спиралей в структуре миоглобина [10]

атома Fe до атомов кислорода примерно одинаковы ($Fe-O1=2,00$ А, $Fe-O2=2,17$ А); угол $Fe-O1-O2=81^\circ$, а не 120° согласно теоретическому предсказанию Полинга [8]. В модельных системах значения этого угла оказались равными 129 и 131° [7, 9], в MbO_2 — 115° , а в $EryO_2$ координация молекулы кислорода близка к линейной (угол $Fe-O1-O2=170^\circ$). Торсионный угол $O2-O1-Fe-N1$ равен -16° .

Связывание молекулы кислорода в леггемоглобине сопровождается поворотом имидазольного кольца проксимального гистидина His F11* вокруг связи $C^{\beta}-C^{\gamma}$ на 70° , при этом разрывается водородная связь этого остатка с атомом O Leu F7 (см. табл. 3). В новой конформации угол между плоскостью этого кольца и плоскостью гема оказывается равным 71° , а не прямым, как в дезокси-Lb. Этим LbO₂ отличается от всех остальных ферропроизводных, в которых положение имидазольного кольца при связывании лигандов не изменялось [6, 11]. Поворот His F11 приводит к тому, что плоскость имидазола проксимального гистидина практически проходит через линию N3-Fe-N1, торсионный угол $C^{\epsilon 1}-N^{\epsilon 2}-Fe-N1^{**}$ равен 16° (в дезокси-Lb этот угол равен -55°). Угол между проекциями линий $C^{\epsilon 1} \dots C^{\epsilon 2}$ ($C^{\epsilon 1}$ и $C^{\epsilon 2}$ — атомы His F11) и $N1 \dots N3$ на плоскость гема составляет 8° в окси- и 55° в дезоксиформах. Длина связи $Fe-N^{\epsilon 2}=2,21$ А несколько меньше, чем в дезокси-Lb (2,27 А), однако это отличие меньше величины погрешности в определении атомных расстояний ($\sim 0,1$ А). Изменилось расположение His F11 относительно дистального гистидина (His E7), угол между плоскостями имидазольных колец этих остатков при переходе от дезокси- к оксиформе увеличился на 50° (с 74 до 124°).

Наиболее существенное отличие LbO₂ от других ферропроизводных проявляется в поведении атома железа гема. Находясь в дезокси-Lb на расстоянии $0,08$ А от средней плоскости гема с проксимальной стороны, в LbO₂ он удаляется далее в проксимальную сторону — расстояние от атома Fe до средней плоскости гема равно $0,30$ А. В других ферропроизводных Lb [6, 11], а также в оксигемоглобине (HbO₂) [13] и MbO₂ [5] связывание лигандов вызывает смещение атома железа в сторону лиганда.

* Здесь и далее обозначения даны в соответствии с номенклатурой спиралей в структуре миоглобина [10].

** Здесь и далее обозначения атомов даны согласно номенклатуре IUPAC — IUB от 1969 г. [12].

Основные стереохимические параметры активного центра в модельных соединениях, Mb, Ery и Lb

Соединение	Fe ²⁺ , Å		Fe-N ^{3*}	Fe-N ^{ε2*}	Fe-O	O-O	Fe-O-O, град	Ссылка
	а	б						
Fe(TrivPP) (2-MeIm) *	0,399	—	2,072	2,095	—	—	—	[9]
FeO ₂ (TrivPP) (2-MeIm)	0,086	—	1,996	2,107	1,898	1,22	129	[7]
FeO ₂ (TrivPP) (1-MeIm)	-0,03	—	1,98	2,07	1,75	1,16	131	[7]
Дезокси-Mb	0,42	0,46	2,03	2,22	—	—	—	[4]
MbO ₂	0,18	0,22	1,95	2,07	1,83	1,22	115	[5]
Дезокси-Ery	0,23	0,17	2,02	2,20	—	—	—	[2]
EryO ₂	0,38	0,30	2,04	2,10	1,80	1,25	170	[3]
Дезокси-Lb	0,09	0,06	2,07	2,27	—	—	—	[6]
LbO ₂	0,26	0,30	2,02	2,21	2,00	1,21	81	

* TrivPP — мезотетра (α,α,α,α-о-пиваламидофенил)порфиринато, 2-MeIm и 1-MeIm — 2- и 1-метилимидазол.

^{2*} Отклонение атома Fe от плоскости гема в сторону проксимального His: а — плоскость гема проходит через 4 атома N гема, б — плоскость проведена через 24 атома гема.

^{3*} Среднее значение длины связи Fe-N, где N — атомы гема; N^{ε2} — атом His F11.

Таблица 3

Различия в системе водородных связей и солевых мостиков в дезокси-Lb и LbO₂ (расстояния даны в Å)

Водородная связь или солевой мостик	Дезокси-Lb		LbO ₂		Водородная связь или солевой мостик	Дезокси-Lb		LbO ₂	
	Дезокси-Lb	LbO ₂	Дезокси-Lb	LbO ₂		Дезокси-Lb	LbO ₂	Дезокси-Lb	LbO ₂
(Glu A2)O ^{ε1} ...O ^{ε2} (Glu E23)	—	3,1	(Ser CD2)O ^γ ...O ² (III) (гем)	3,2	—	—	—	—	
(Ser A3)O ^γ ...O ^{ε1} (Glu H3)	—	3,6	(Lys E10)N ^ε ...O ¹ (IV) (гем)	2,9	—	—	—	—	
(Gln A4)N ^{ε2} ...O ^{ε2} (Glu H3)	3,6	—	(Lys E13)N ^ε ...O ^{ε1} (Glu E17)	3,6	—	—	—	—	
(Ala A6)O...O ^γ (Ser A10)	—	3,4	(Asp F1)O...N ^ε (Lys F5)	—	3,3	—	—	—	
(Lys A9)N ^ε ...O ^γ (Tyr E16)	2,8	—	(Asn F6)O ^{δ1} ...O ^γ (Ser F9)	—	2,9	—	—	—	
(His B7)N ^{ε2} ...O ^{ε1} (Gln CD12)	—	3,4	(Asn F6)O...O ^γ (Ser F9)	—	2,6	—	—	—	
(Lys C5)N ^ε ...O(Ser CD8)	—	3,5	(Leu F7)O...N ^{δ1} (His F11)	2,6	—	—	—	—	
(Lys C5)N ^ε ...O(Leu CD4)	2,7	—	(Glu G10)O ^{ε1} ...N ^ε (Lys G14)	—	3,5	—	—	—	
(Lys C5)N ^ε ...N(Gly CD6)	3,5	—	(Glu G10)O...N ^ε (Lys G14)	—	3,4	—	—	—	
(Ser CD2)N...N ^ε (Lys CD5)	—	3,6							

Лишь в EryO₂ [3] наблюдается такое же, как в LbO₂, поведение атома железа.

Среднее расстояние Fe—N для атомов азота пиррольных колец гема равно 2,02 Å. Взаимодействие атома железа с экваториальными лигандами вызывает увеличение степени гофрированности гема, связанное с поворотом пиррольных колец относительно связей N—N. При таком повороте в наибольшей степени из среднеквадратичной плоскости гема смещаются атомы углерода метиновых мостиков. По сравнению с дезокси-Lb, где среднее смещение метиновых мостиков между пиррольными кольцами составляет 0,14 Å, в LbO₂ оно равно 0,25 Å (рис. 2). Эти смещения определяют среднюю величину поворота пиррольных колец относительно средней плоскости гема, равную 6°.

При описании конформационных перестроек в молекулах карбокси- и нитрозолеггемоглобина была введена ортогональная система координат; соотношенная с проекциями атома железа (начало координат) и атомов азота гема N1 и N2 (положительные направления осей X и Y). Ось Z была направлена перпендикулярно осям X и Y в сторону проксимального гистидина. В этих комплексах был установлен одинаковый характер поворота гема вокруг линии, лежащей в его плоскости, параллельно оси

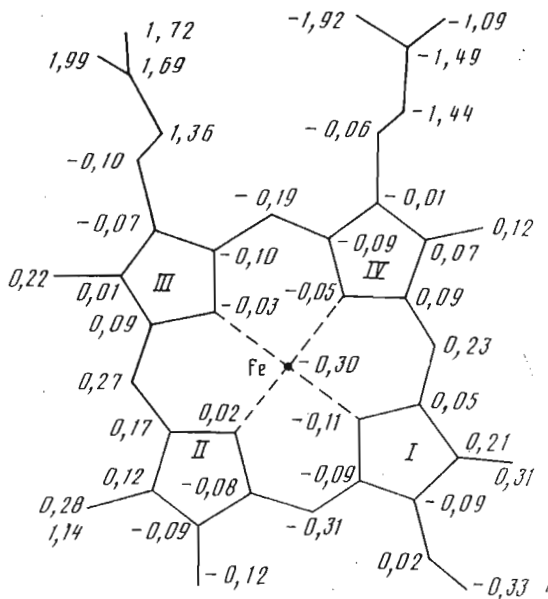


Рис. 2. Отклонения атомов гема LbO_2 (A) от средней плоскости, рассчитанной по 24 атомам порфиринового ядра

спирали В, причем в карбоксипроизводной величины поворота и смещения гема были существенно больше. По сравнению с нитрозоформой в LbO_2 изменения в ориентации гема совершенно другого характера, они могут быть описаны поворотом на 5° вокруг линии, имеющей уравнение $x-0,63y=0,59$ и лежащей параллельно плоскости гема на высоте 1,7 Å. Однако направление самого поворота противоположно наблюдаемому в других ферропроизводных [11].

Данные по среднеквадратичным отклонениям в координатах атомов сравниваемых структур после совмещения дезокси-Lb и LbO_2 друг с другом методом наименьших квадратов с использованием C^α -атомов (табл. 4) свидетельствуют, что наиболее подвижен в молекуле N-концевой участок, где различие в положении даже C^α -атомов превышает 1,0 Å. Высокая подвижность N-концевых остатков наблюдалась и в других комплексах Lb.

Анализ изменений в положении боковых групп показывает, что они затрагивают в основном группы, расположенные на поверхности белка. Однако заметные отклонения (больше 1,0 Å) установлены и для боковой группы дистального His E7, контактирующего с лигандом, и проксимального His F14, связанного с атомом железа.

Для характеристики вторичной структуры комплекса исследовалась возможность образования водородных связей. Рассматривались случаи, когда расстояния между атомами, которые могут образовывать водородные связи, находились в интервале 2,2–3,6 Å. Системы таких связей в дезокси-Lb и LbO_2 весьма близки. Различия (табл. 3) касаются в основном водородных связей и солевых мостиков между аминокислотными остатками, находящимися на поверхности белка. Однако есть изменения и в системе этих связей, образованных остатками, формирующими гемовый карман (Ser CD2, Lys E10, Asn F6, His F11). Наиболее существенно, вероятно, разрыв в LbO_2 водородной связи N^{61} (His F11)–O(Leu F7), установленной во всех остальных формах, а также N (Ser CD2), фиксирующего остаток пропионовой кислоты пиррольного кольца (III), и N^{62} (Lys E10), фиксирующего остаток кислоты кольца (IV).

По разностным синтезам, которые рассчитывались в ходе уточнения, были локализованы 254 молекулы растворителя. При локализации молекул использовалась программа поиска, учитывающая расстояния от молекул воды до атомов белка и других молекул воды (программа написана

Среднеквадратичные отклонения (\AA) в координатах S^z -атомов (1) и всех атомов молекулы (2) комплекса LbO_2 при совмещении его с дезокси-Lb

АТОМЫ	Спирали								Межспиральные переходы					Гем	Среднее по молекуле
	A	B	C	E	F	G	H	NA	CD	EF	FG	GH			
1	0,22	0,15	0,15	0,32	0,35	0,20	0,31	1,00	0,28	0,24	0,29	0,23	—	0,30	
2	0,41	0,36	0,35	0,40	0,70	0,36	0,48	1,07	0,59	0,46	0,32	0,36	1,08	0,51	

сотрудником нашей лаборатории Б. В. Строкопытовым). В расчет принимались лишь те пики электронной плотности, расстояние от которых до атомов молекулы белка было не менее $2,2 \text{ \AA}$. В процессе уточнения для молекул воды определялись коэффициенты заселенности положений. В тех случаях, когда величина этого коэффициента была менее 0,25 или значение теплового фактора больше 60 \AA^2 , молекулы воды исключались из последующего рассмотрения. Анализ расстояний от молекул воды до атомов молекулы белка показал, что 166 молекул воды находятся на расстояниях от белка, меньших $3,6 \text{ \AA}$. Таким образом, $\frac{2}{3}$ общего числа молекул воды образует первый гидратный слой, непосредственно контактирующий с молекулой белка. Аналогичная ситуация наблюдалась и в комплексах Lb с CO и NO [11]. Наибольшее число молекул воды образует по 2–4 водородные связи (61%). Некоторые молекулы воды объединяются в довольно крупные конгломераты, самый крупный из них содержит 41 молекулу воды.

Данные по структуре LbO_2 позволяют найти структурное объяснение кинетических свойств леггемоглобина: высокой скорости образования кислородного комплекса в сочетании с относительно невысокой скоростью его диссоциации. С другой стороны, чрезвычайно интересно сопоставление функциональных свойств изученных к настоящему времени мономерных гемоглобинов — миоглобина кашалота, эритрокруорина и леггемоглобина — с особенностями их строения.

Выше уже говорилось, что возможны два основных способа регуляции кислородсвязывающей активности гемоглобинов, причем кинетические параметры связывания молекулы кислорода могут найти объяснение с позиций структурных особенностей дезоксиформ, а таковые при расщеплении — с позиций структуры оксиформ. Первый способ регуляции заключается в обеспечении необходимой степени доступности гемового кармана, а точнее, атома железа гема, поскольку именно через атом железа происходит связывание молекулы кислорода. Данные по структуре эритрокруорина, обладающего высокими скоростями образования кислородного комплекса и его диссоциации, подтверждают возможность такого способа регуляции. В структуре этого белка в обоих функциональных состояниях боковая группа дистального гистидина выведена на поверхность молекулы, и вход в гемовый карман остается свободным. В отличие от эритрокруорина в миоглобине, имеющем средние значения кинетических констант, имидазольное кольцо находится внутри гемового кармана. В обеих формах Lb боковая группа гистидина находится внутри гемового кармана, однако леггемоглобин способен связывать такие крупные лиганды, как пикотиновая кислота, пнтрозобензол, изохинолин, что указывает на большую подвижность имидазольной группы, которая в соответствующих комплексах выведена на поверхность молекулы [14]. Кроме того, способность леггемоглобина связывать эти лиганды обеспечивается и большим объемом гемового кармана на функциональной стороне порфиринового металлоцикла [15].

Второй путь регуляции кислородсвязывающей активности гемоглобинов может осуществляться изменением реакционной способности атома железа по отношению к молекуле кислорода. Весьма существенные различия в строении активного центра гемоглобинов, включающего в себя

группу гема и остаток проксимального гистидина, указывают на возможность использования гемоглобина и этого способа регуляции.

Наиболее существенный фактор в этом отношении — расстояние от атома железа до плоскости гема. В дезокси-Mb так же, как и в соответствующих формах тетрамерных гемоглобинов и модельных системах, атом железа расположен на расстоянии приблизительно $0,4 \text{ \AA}$ от плоскости гема с проксимальной стороны. В дезоксиформах эритрокруорина и леггемоглобина атом железа располагается на значительно меньшем расстоянии от гема — $0,17$ и $0,08 \text{ \AA}$ соответственно. Эта сближенность, по-видимому, и обеспечивает значительно большую силу поля лигандов на дистальной стороне гема, где локализуется молекула кислорода, и определяет значительно большую, чем в миоглобине, скорость образования кислородного комплекса.

Расстояние от молекулы кислорода до плоскости гема в оксиформах определяется суммой ван-дер-ваальсовых радиусов атомов кислорода и азота. Следовательно, чем ближе будет расположен атом железа к плоскости гема, тем прочнее при прочих равных условиях будет связь Fe—O и тем меньше скорость диссоциации кислородного комплекса. Данные по структуре MbO₂ (расстояние от атома железа до плоскости гема равно $0,18 \text{ \AA}$), EryO₂ ($0,30 \text{ \AA}$) и LbO₂ ($0,30 \text{ \AA}$) находятся в согласии с указанным предположением. Удивительно, однако, то, что в миоглобине и тетрамерных гемоглобинах при связывании молекулы кислорода атом железа смещается в направлении к лиганду, а в эритрокруорине и леггемоглобине — в противоположном направлении. Эти особенности в расположении атома железа, по-видимому, обеспечивают выполнение гемоглобинами своей функции. Однако каков механизм, который обеспечивает индуцированное молекулой кислорода движение атома железа в пучном направлении?

Элементы активного центра гемоглобинов — гем и имидазольное кольцо проксимального гистидина, непосредственно связанные с атомом железа; они, как уже указывалось, универсальны в гемоглобинах. Поэтому причину различного направления смещения атома железа следует искать в белковом окружении гема и проксимального гистидина. Однако атом железа с другими элементами структуры не взаимодействует, и его пространственная локализация может проходить лишь опосредованно через указанные элементы активного центра. Анализ контактов между атомами боковых групп белка, взаимодействующих с элементами активного центра в дезокси- и оксисостояниях молекулы, не приводит к определенным выводам. С большей определенностью можно установить особенности в строении активного центра, которые могут обеспечить необходимое пространственное расположение атома железа.

Структурные данные по гемоглобинам показывают, что тонкое строение гема различно — в миоглобине и тетрамерных гемоглобинах гем имеет пирамидальную структуру, а в эритрокруорине и леггемоглобине — гофрированную. Подобные структуры в металлопорфинах могут возникнуть как из-за особенностей центрального атома металла, так и вследствие специфических невалентных взаимодействий между порфириновым циклом и другими группами, контактирующими с ним. Неясно, однако, является ли тонкая структура гема тем инструментом, который используется белковой частью молекулы для локализации атома железа.

Следует подчеркнуть, что сама молекула кислорода является необходимым элементом этого механизма, поскольку только при связывании кислорода атом железа смещается от лиганда, а при связывании всех других лигандов и эритрокруорином, и леггемоглобином атом железа смещается в направлении к лиганду.

Тот или иной тип искажения плоской структуры гема может иметь значение и в другом отношении. Как принято считать, между центральным атомом железа и его лигандами — атомами азота пиррольных колец и проксимального гистидина — образуются кратные связи, включающие донорно-акцепторные (σ) и дативные (π). В формировании последних участвуют преимущественно атомные орбитали железа d_{z^2} , d_{zx} и d_{yz} . Эти

же орбитали участвуют в π -взаимодействиях с молекулой кислорода. Поэтому при изменении степени перекрывания этих орбиталей с π -орбиталями атомов азота могут измениться и π -связывающие возможности атома железа по отношению к молекуле кислорода. При образовании пирамидальной структуры степень перекрывания указанных орбиталей атомов азота и железа увеличивается, а в гофрированной структуре уменьшается [16]. В обратном соотношении, вероятно, находится кислородсвязывающая активность атома железа.

При переходе от дезокси- к оксисостоянию меняется не характер искажения гема, а его степень, поэтому, вероятно, следует сопоставлять с типом искажения общую функциональную характеристику гемоглобинов — их сродство к молекулярному кислороду. Действительно, в леггемоглобине, обладающем высоким сродством, гем имеет гофрированную структуру, в миоглобине она пирамидальная. Исключение составляет эритрокруорин, обладающий наименьшим сродством, но, как уже говорилось, формирование гофрированной структуры гема в этом белке, вероятно, необходимо для обеспечения «обратного» смещения атома железа при оксигенировании.

Роль проксимального гистидина, являющегося *транс*-партнером молекулярного кислорода, может быть весьма велика при обратимом оксигенировании. Во всех гемоглобинах плоскость имидазола проходит вблизи линии N-Fe-N, что обеспечивает наиболее полное перекрывание орбиталей атомов N^{e2} имидазола и железа, участвующих в π -взаимодействиях. Исключение составлял леггемоглобин. Во всех изученных формах этого белка плоскость имидазольного кольца проходит между связями Fe-N. Однако в оксиформе происходит поворот, приводящий имидазол в положение, общее с остальными гемоглобинами. Поскольку при этом происходит разрыв водородной связи между N⁶¹ (His F11) и O (Leu F7), можно думать, что это приводит к увеличению электронной плотности последовательно на имидазольном атоме N^{e2}, Fe и O₂.

Главной особенностью связывания молекулы кислорода в Lb является значительная ее разупорядоченность. Это может быть обусловлено либо различной геометрией связывания лиганда в разных молекулах Lb в кристалле, либо значительным тепловым движением молекулы кислорода. Не исключено, что именно эта способность Lb связывать O₂ в произвольной, а не жестко фиксированной геометрии обеспечивает высокое сродство Lb к кислороду.

Экспериментальная часть

Кристаллы нативного леггемоглобина выращены как описано в работе [17]. Восстановление акваметкомплекса цитратом железа проводилось при комнатной температуре в атмосфере Ar без применения специальных поглотителей O₂. Затем кристаллы запаковывали в стеклянные капилляры и охлаждали до -20° С. В этих условиях контрольные кристаллы, растворенные в буфере, не содержащем O₂, в атмосфере Ar имели в видимой области и в области полосы Core спектр, соответствующий комплексу LbO₂. По окончании дифракционного эксперимента спектрометрический контроль использованного кристалла подтвердил наличие комплекса с O₂.

Набор дифракционных отражений в зоне 8,0–1,7 Å получен с одного кристалла на дифрактометре КАРД-4 с двумерным детектором [18]. Использовалась отпаянная трубка БСВ-23 с медным анодом и графитовый монохроматор. Съемка проведена в течение суток при -20° С. Измерены две независимые области обратного пространства, что составило 26 300 отражений с $I > \sigma$. Изменение интенсивностей контрольных отражений не превышало 5%. При расчете структурных амплитуд внесены поправки на факторы Лоренца, поляризации и поглощения по методу Норта — Филлипса [19]. Основные результаты дифракционного эксперимента представлены в табл. 5.

Результаты дифракционного эксперимента

Характеристики наборов дифракционных данных	Значение
Число измеренных отражений с $I > \sigma$	26 297
Число независимых отражений	14 436
Количество отражений (%) с $F > 3\sigma$	93,6
$R_{\text{сим}} = \sum I - I_i / \sum I_i$	0,054
Полнота набора (%) по зонам разрешения, Å	
5,0–2,0	85,9
2,0–1,8	64,0
1,8–1,7	39,2

Таблица 6

Среднеквадратичные отклонения от идеальной геометрии
в уточненной структуре LbO_2

Параметры	Число параметров	Среднеквадратичные отклонения
Расстояния *, Å		
1–2	1248	0,026
1–3	1700	0,056
1–4	453	0,064
Плоские группы, Å	1058	0,021
Хиральные объемы, Å ³	561	0,103
Двугранные углы, град		
Пептидные, ω	154	3,3
Алифатические, χ_1	208	18,4
Ароматические, χ_2	17	28,3

* 1–2 — ковалентно связанные атомы, 1–3 — пары атомов, разделенных двумя ковалентными связями, 1–4 — пары атомов, разделенных тремя ковалентными связями.

Уточнение структуры проводилось методом Хедриксона — Коннерта [20]. В качестве исходной использовалась атомная модель комплекса Lb с NO [11]. Всего сделано 95 циклов уточнения (в расчет привнимались 13 063 отражения с $F > 3\sigma(F)$). В результате уточнения выявлены 254 молекулы воды. Величины среднеквадратичных отклонений от идеальной геометрии, полученные в результате уточнения, приведены в табл. 6. При проведении уточнения на первом этапе, включившем 24 цикла, вклад молекул растворителя и лиганда атома железа не учитывался.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Appleby C. A., Blumberg W. E., Bradbury J. H., Fuchsman W. H., Piesach J., Wittenberg B. A., Wittenberg J. B., Wright P. E. // Interaction between iron and protein in oxygen and electron transport. Symposium Proceedings/Ed. Ho C. Elsevier/North-Holland, N. Y., 1980. P. 434–435.
2. Steigemann W., Weber E. // J. Mol. Biol. 1979. V. 127. № 3. P. 309–338.
3. Weber E., Steigemann W., Jones T. A., Huber R. // J. Mol. Biol. 1978. V. 120. № 2. P. 327–336.
4. Takano T. // J. Mol. Biol. 1977. V. 110. № 4. P. 569–584.
5. Phillips S. E. V. // J. Mol. Biol. 1980. V. 142. № 4. P. 531–554.
6. Арутюнян Э. Г., Дайзенхофер И., Тепляков А. В., Куранова И. П., Обмолова Г. В., Вайнштейн Б. К. // Докл. АН СССР. Сер. Биохимия. 1983. Т. 270. № 3. С. 732–736.
7. Jameson G. B., Molinaro F. S., Ibers J. A., Collman J. P., Brauman J. I., Rose E., Suslick K. S. // J. Amer. Chem. Soc. 1978. V. 100. № 21. P. 6769–6770.
8. Pauling L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 2612–2613.
9. Jameson G. B., Rodley G. A., Robinson W. T., Gagne R. R., Reed C. A., Collman J. P. // Inorg. Chem. 1978. V. 17. P. 850–857.
10. Kendrew J. C., Dickerson R. E., Strandberg B. E., Hart R. G., Davies D. R., Phillips D. C., Shore V. C. // Nature. 1960. V. 185. P. 422–427.
11. Обмолова Г. В., Сафонова Т. Н., Тепляков А. В., Попов А. Н., Куранова И. П., Арутюнян Э. Г., Вайнштейн Б. К. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1509–1519.
12. Biochemistry. 1970. V. 9. P. 3471–3503.

13. Shaapap B. // J. Mol. Biol. 1983. V. 171. № 1. P. 31–59.
14. Куранова И. П., Тепляков А. В., Обмолова Г. В., Воронова А. А., Попов А. Н., Хейкер Д. М., Арутюнян Э. Г. // Биоорганич. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1625–1636.
15. Вайнштейн Б. К., Куранова И. П., Арутюнян Э. Г., Егоров Ц. А. // Биоорганич. химия. 1980. Т. 6. № 5. С. 684–699.
16. Арутюнян Э. Г. // Молекуляр. биология. 1981. Т. 15. № 1. С. 27–44.
17. Вайнштейн Б. К., Арутюнян Э. Г., Куранова И. П., Борисов В. В., Сосфенов Н. П., Павловский А. Г., Гребенко А. И., Конарева Н. В. // Кристаллография. 1974. Т. 19. № 5. С. 964–970.
18. Andrianova M. E., Kheiker D. M., Popov A. N., Simonov V. I., Anisimov Yu. S., Chernenko S. P., Ivanov A. V., Movchan S. A., Peshekhonov V. D., Zanevsky Yu. V. // J. Appl. Cryst. 1982. V. 15. P. 626–631.
19. North A. G., Phillips D. C., Matthews F. S. // Acta crystallogr. 1968. V. A24. P. 351–353.
20. Hendrickson W. A., Konnert S. H. // Biomolecular structure, conformation, function and evolution. V. 1/Ed. Srinivasan R. Oxford: Pergamon Press, 1979. P. 47–51.

Поступила в редакцию
21.VI.1989

E. G. ARUTYUNYAN, T. N. SAFONOVA, G. V. OBMOLOVA, A. V. TEPLYAKOV,
A. N. POPOV, A. A. RUSAKOV, S. V. RUBINSKY, I. P. KURANOVA,
B. K. VAINSHTEIN

CRYSTAL STRUCTURE OF OXYLEGHEMOGLOBIN AT 1,7 Å RESOLUTION

*A. V. Shubnikov Institute of Crystallography, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The structure of oxyleghemoglobin (LbO₂) from yellow lupin has been determined by X-ray diffraction at 1,7 Å resolution in the atmosphere of argon at –20° C. The atomic model was refined by a restrained parameter least-square procedure to *R*-factor of 0,15. The O–O–Fe angle is 81°, distances from Fe to ligand atoms are 2,00 and 2,17 Å, occupancies of the ligand atoms are 0,4 and 0,5 (the low occupancies are probably due to the disorder of the oxygen molecules). Transition of Lb from deoxy- to oxy-form causes the shift of Fe in the direction of the proximal histidine His F11 (the distance between Fe and the heme plane is 0,30 Å). The observed shift is opposite to that found in complexes of Lb with CO and NO. Oxygenation leads to the 70° rotation of the His F11 imidazole ring, thus breaking the hydrogen bond between N^{δ1} His F11 and O Leu F7. The model includes 254 water molecules. The structure-function relations in Lb are discussed.