



УДК 577.323

## РОЛЬ ГИСТИДИНА В ЛИГАНДСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ГЕМА ГЕМОГЛОБИНА

© 2004 г. Т. А. Романова\*.,\*\*.,\*\*\*, П. О. Краснов\*\*, А. А. Кузубов\*\*, П. В. Аврамов\*\*

\*Институт вычислительного моделирования СО РАН,  
660036, Красноярск, Академгородок;

\*\*Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, Красноярск  
Поступила в редакцию 11.09.2002 г. Принята к печати 19.02.2003 г.

Полуэмпирическим квантово-химическим методом РМЗ проведено исследование атомной и электронной структур комплексов гема (Heme) с гистидином (His), глицином (Gly) и цистеином (Cys) в пятом координационном положении железа и молекулами кислорода и оксида азота в шестом. Сравнительный анализ межъядерного расстояния показал, что комплекс гема с His (Heme-His), и еще в большей степени с Gly, удерживают молекулу лиганда ( $O_2$ , NO) слабее, чем Heme-Cys. Усиление химической связи молекулы  $O_2$  (NO) с комплексом Heme-Cys, как следствие, приводит к существенному ослаблению химической связи в самой молекуле лиганда. Эти выводы подтверждают расчеты энергии связи. В процессе присоединения лиганда (как  $O_2$ , так и NO) по донорно-акцепторному механизму к железу гема электронная плотность с  $p$ -орбиталей лиганда перемещается на вакантные  $d$ -орбитали железа, заряд которого, рассчитанный по Малликену, становится формально отрицательным. В комплексе Heme-His с  $O_2$  этот заряд существенно выше, чем в комплексе с NO. При этом молекула кислорода поляризуется. В комплексе Heme-Cys поляризации  $O_2$  не происходит, а электронная плотность, судя по изменению заряда железа, смещается на координируемый атом серы. Это характерно и для комплексов Heme-Cys с оксидом азота. Анализ зарядов на атомах показывает, что характер химического связывания молекулы кислорода в комплексах с Cys и Gly аналогичен и принципиально отличается от такового в случае с His.

*Ключевые слова:* гемоглобин; гем; проксимальные аминокислоты; лиганды; электронная структура; РМЗ-метод.

### ВВЕДЕНИЕ

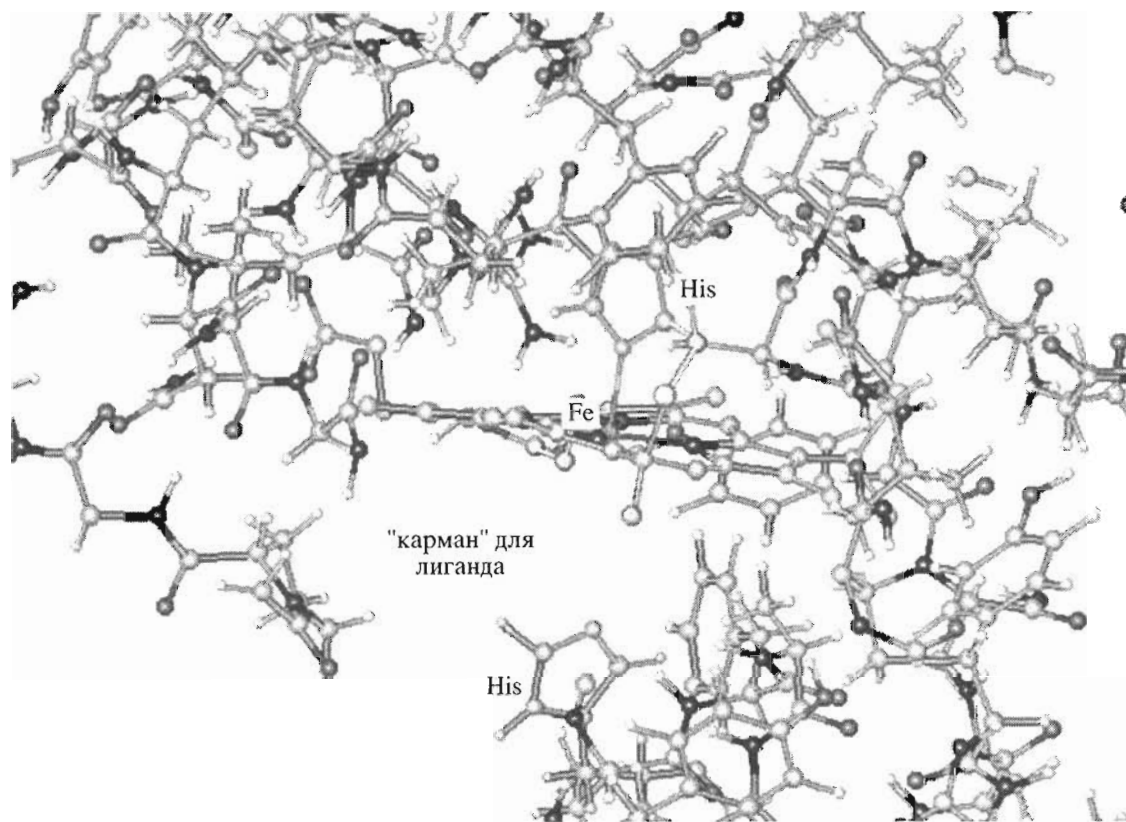
Основной функциональной структурой клеточных гемопroteинов (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза и пероксидаза) является гем, который представляет собой хелатный комплекс протопорфирина с Fe(II), где с железом связаны четыре атома азота, а оставшиеся пятая и шестая координационные связи расположены перпендикулярно плоскости порфиринового кольца [1]. В молекулах гемоглобина и миоглобина с обеих сторон плоскости гема располагаются имидазольные кольца двух остатков двухосновной аминокислоты гистидина (His). Атом азота проксимального остатка His образует ковалентную связь с железом гема в пятом координационном положении. Дистальный остаток His находится на некотором расстоянии от железа гема, образуя таким образом “карман”, в который заходят лиганды ( $O_2$ , NO, CO) (рис. 1).

Координированный в пятом координационном положении к железу гема остаток гистидина играет ведущую роль в функционировании ге-

мо(мио)глобина, и замена его на другую аминокислоту оказывает значимое влияние на лигандсвязывающую и каталитическую активность молекулы гемопroteина. Так, при замене в результате направленного мутагенеза остатка проксимального His на Cys значительно повышается способность к гетеролитическому расщеплению O–O связи в гидропероксиде кумола [2]. В работах [3, 4] приводятся результаты исследования влияния замены аминокислотных остатков в структуре миоглобина на кинетику присоединения молекулы оксида углерода (II). Замена аминокислот может проходить в любой части белка, включая проксимальный остаток гистидина. При этом в качестве лигандов могут выступать как аминокислоты (глицин [5, 6]), так и гетероциклические молекулы (пиридин, фуран, тиофен [7], метилзамещенные имидазолы [8]). В результате наблюдаются существенные изменения в адсорбционном и ЯМР-спектрах белков.

Исследование свойств мутантных форм гемопroteинов ведется как экспериментальными [9–11], так и теоретическими методами [12–15], которые основаны на квантово-химических расчетах модельных систем различными вариантами метода

# Автор для переписки (факс: (3912) 432756); эл. почта: romanova@iph.krasn.ru).



**Рис. 1.** Гем гемоглобина и его ближайшее аминокислотное окружение. Экспериментальная структура, полученная нами из базы данных PDB. Между железом и гистидином, расположенным дистально относительно плоскости гема, имеется "карман", в котором размещается лиганд.

Хартри-Фока и теории функционала плотности, что, на наш взгляд, является вполне оправданным для прогнозирования свойств вновь получаемых соединений.

Цель настоящей работы – сравнительное теоретическое квантово-химическое исследование электронной и атомной структур комплексов, мутантных по гистидину в пятом координационном положении форм гема с кислородом и оксидом азота.

### МЕТОДИКА РАСЧЕТА

Учет ближайшего аминокислотного окружения гема при расчетах электронной структуры не проводился, поскольку целью работы являлось исследование роли координированной в пятом положении к атому железа аминокислоты на связывание NO и O<sub>2</sub>. Функциональная активность биологических молекул обусловлена в основном структурой молекулярных орбиталей потолка валентной зоны. В гемопротейнах природа химической связи определяется вкладами атомов порфиринового кольца и лиганда в пятом координационном положении, тогда как ближайшие к гему аминокислоты не дают вклада в эту энергетичес-

кую область [15]. В связи с этим мы использовали упрощенные модельные системы из минимального числа атомов. Предварительные сравнительные расчеты гема полуэмпирическими методами и неэмпирическим методом Хартри-Фока с использованием стандартного атомного базиса 6-31G показали, судя по геометрии, по конфигурации плотностей состояний орбиталей и по уровням энергии верхней заполненной и нижней вакантной молекулярных орбиталей, хорошую согласованность и адекватность применения полуэмпирических методов в описании атомной электронной структуры [15, 16].

В данной работе атомную и электронную структуры комплексов гема с лигандами исследовали полуэмпирическим квантово-химическим методом PM3 [17, 18]. Стартовые геометрии модельных систем брались из коллекции PDB (Protein Data Bank; [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)). В рамках метода PM3 с точностью 1 кал/моль оптимизировали структуры с использованием метода сопряженных градиентов (Polak-Ribiere).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## 1. Геометрия комплексов

В работе были рассчитаны комплексы гема с аминокислотами His, Gly или Cys в пятом координационном положении и молекулами кислорода и оксида азота в шестом. Показано, что молекула кислорода координируется комплексом гема с His под углом к плоскости гема, тогда как комплексом Heme-Cys – параллельно. Расстояние от атома железа до ближайшего атома кислорода молекулы O<sub>2</sub> в комплексе с His составляет 1.815 Å, а в комплексе с Cys фактическое расстояние до молекулы кислорода существенно меньше – 1.706 Å – из-за способа ее координации (рис. 2). Известно, что при образовании химической связи по донорно-акцепторному механизму решающим является кратчайшее расстояние до молекулы лиганда. Следовательно, комплекс гема с His слабее удерживает молекулу кислорода, чем Heme-Cys (табл. 1). Косвенно этот вывод подтверждается и существенным увеличением межъядерного расстояния аминокислота–комплексобразователь при замене His на Cys (1.881 и 2.451 Å соответственно).

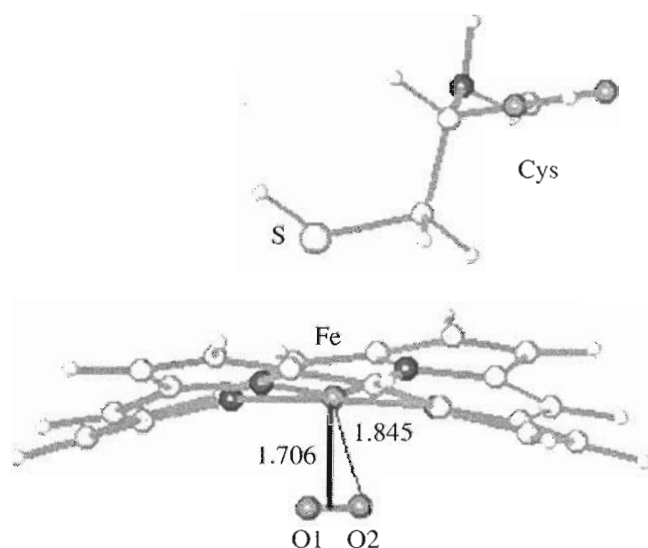


Рис. 2. Способ координации молекулы O<sub>2</sub> в комплексе Heme-Cys. Расстояние (Å) между железом гема и серединой связи кислород–кислород молекулы кислорода меньше, чем до любого из ее атомов.

Расчеты энергии связи лигандов подтверждают выводы, сделанные по анализу межъядерных расстояний (табл. 2).

Молекула NO координирована атомом азота под углом к плоскости гема. Судя по межъядерному расстоянию (табл. 1), наиболее устойчивый комплекс формируется между NO и железом гема при замене His на Cys, но сама аминокислота связана слабо (как и в случае с кислородом) и межъядерное расстояние в молекуле лиганда больше, т.е. NO становится несколько менее устойчивым. Замена His на Gly понижает, как и в случае с кислородом, степень связывания молекулы NO с гемом.

Таблица 1. Геометрическая структура комплексов гема с аминокислотами и лигандами в шестом координационном положении

| Комплекс                    | Межъядерное расстояние, Å |               |       |                       |
|-----------------------------|---------------------------|---------------|-------|-----------------------|
|                             | Fe–O1                     | Fe–O2         | O1–O2 | Fe–N(S) <sub>ак</sub> |
| Heme + His + O <sub>2</sub> | 1.815                     | 2.265         | 1.215 | 1.881                 |
| Heme + Cys + O <sub>2</sub> | 1.845 (1.706)             | 1.845(1.706)  | 1.406 | 2.451                 |
| Heme + Gly + O <sub>2</sub> | 1.832 (1.722)             | 1.896 (1.722) | 1.441 | 1.973                 |
| O <sub>2</sub>              | –                         | –             | 1.169 | –                     |
|                             | Fe–N                      | Fe–O          | N–O   | Fe–N(S) <sub>ак</sub> |
| Heme + His + NO             | 1.848                     | 1.971         | 1.193 | 1.882                 |
| Heme + Cys + NO             | 1.836                     | 1.949         | 1.199 | 2.386                 |
| Heme + Gly + NO             | 1.855                     | 1.984         | 1.192 | 1.951                 |
| NO                          | –                         | –             | 1.129 | –                     |

Примечание: N(S)<sub>ак</sub> – атом азота (серы) соответствующей аминокислоты, координированный к железу гема; в комплексах Heme-Cys, Heme-Gly с кислородом в скобках указаны фактические расстояния до молекулы O<sub>2</sub>, а не до ее атомов.

**Таблица 2.** Энергия связи в комплексе Неме-аминокислота с кислородом

| Тройной комплекс            | Энергия связи, ккал/моль |
|-----------------------------|--------------------------|
| Heme + His + O <sub>2</sub> | 79.797                   |
| Heme + Cys + O <sub>2</sub> | 197.577                  |
| Heme + Gly + O <sub>2</sub> | 200.624                  |

**Таблица 3.** Эффективные малликеновские атомные заряды

| Комплекс                    | Fe     | O1     | O2     | N(S) <sub>ак</sub> |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------------------|
| Heme + His                  | -0.524 | -      | -      | 0.028              |
| Heme + His + O <sub>2</sub> | -0.604 | 0.233  | -0.220 | 0.450              |
| Heme + Cys                  | -0.597 | -      | -      | 0.526              |
| Heme + Cys + O <sub>2</sub> | -0.455 | -0.160 | -0.165 | 0.299              |
| Heme + Gly                  | -0.624 | -      | -      | 0.684              |
| Heme + Gly + O <sub>2</sub> | -0.474 | -0.197 | -0.178 | 0.447              |
|                             | Fe     | N      | O      | N(S) <sub>ак</sub> |
| Heme + His + NO             | -0.524 | 0.331  | -0.027 | 0.466              |
| Heme + Cys + NO             | -0.503 | 0.392  | -0.029 | 0.396              |
| Heme + Gly + NO             | -0.541 | 0.326  | -0.030 | 0.554              |

N(S)<sub>ак</sub> – атом азота (серы) соответствующей аминокислоты, координированный к железу гема, O1 и O2 – атомы молекулы кислорода.

## 2. Малликеновские атомные заряды комплексов гема с лигандами

Присоединение лиганда как O<sub>2</sub>, так и NO по донорно-акцепторному механизму к железу гема приводит к изменению эффективного заряда атома Fe, рассчитанному по Малликену. При этом электронная плотность с *p*-орбиталей лиганда перемещается на вакантные *d*-орбитали железа, заряд которого становится отрицательным. Этот артефакт, по-видимому, связан с тем, что у кислорода (как, впрочем, и у NO) на несвязывающих орбиталях находится существенный электронный заряд (орбитали заполнены), которые в комплексе формально начинают относиться к *d*-орбиталям железа.

В комплексе Неме-His с O<sub>2</sub> этот малликеновский отрицательный заряд железа существенно выше, чем в комплексе с NO (табл. 3). Атом кислорода, координированный с железом гема, имеет положительный заряд, как и заряд атома азота в комплексе с NO, а второй атом кислорода – отрицательный. Исходя из значений суммарного заряда молекулы лиганда можно сделать вывод, что молекула кислорода поляризуется, так как ее суммарный заряд близок к нулю, в то же время в молекуле NO он приблизительно равен +0.3, что указывает на значительное перераспределение заряда с NO на порфириновую плоскость. Следо-

вательно, молекула NO связана с железом гема ковалентно, а между кислородом и Fe формируются лишь слабые ион-дипольные взаимодействия [19]. При этом независимо от лиганда (O<sub>2</sub>, NO), электронная плотность на азоте имидазольного кольца His значительно понижается.

В комплексе Неме-Cys молекула кислорода практически не поляризуется, а электронная плотность, судя по изменению заряда железа, смещается на координируемый атом серы. Такой же характер носит смещение электронной плотности с железа и в комплексах Неме-Cys с оксидом азота. Анализ зарядов на атомах показывает, что характер химического связывания молекулы кислорода в комплексах с Cys и Gly аналогичны и принципиально отличаются от такового в случае с His.

В формировании координационной связи аминокислоты с железом гема принимают участие *p*-орбитали атома азота или серы. Природа верхней заполненной молекулярной орбитали (ВЗМО) определяет, в частности, прочность этой химической связи. Сравнение парциальной электронной плотности *p*-состояний в ВЗМО атома лиганда (либо одного из атомов азота, либо атома серы) позволило выяснить, что для гистидина она максимальна в сравнении с этой величиной для всех аминокислот, принимающих участие в формировании белковой цепи [20]. Так, если у гистидина парциальная плотность *p*-состояний азота имидазольного кольца, с которым и происходит координация, равна 0.93 (относительные единицы), то у аргинина, также двухосновной аминокислоты, все атомы азота практически эквивалентны и относительная плотность любого из атомов в среднем равна 0.60, у глицина – 0.68, у серы цистеина – 0.84. За счет высокой электронной плотности *p*-состояний в ВЗМО, гистидин может формировать более прочную донорно-акцепторную связь с комплексообразователем, которым, в данном случае, выступает атом железа порфиринового кольца [20].

Таким образом, при совместном анализе экспериментальных данных [2] и квантово-химических расчетов видно, что гистидин играет ключевую и уникальную роль в лигандсвязывающих свойствах гема, что проявляется в минимальной прочности связи с лигандом в шестом координационном положении и ряде особенностей связывания простых лигандов в шестом координационном положении.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке 6-го конкурса-экспертизы 1999 г. научных проектов Российской академии по фундаментальным и прикладным исследованиям (грант № 218) и

Лаврентьевского конкурса молодежных проектов СО РАН 2002 г. (проект № 4).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Коттон Ф., Уилксон Дж.* Основы неорганической химии. М.: Мир, 1979. 677 с.
2. *Watanabe Y.* // 11<sup>th</sup> Int. Symp. Microsomes and Drug Oxid., Los Angeles, Calif., 1996. P. 84.
3. *Balasubramanian S., Lambright D.G., Marden M.C., Boxer S.G.* // *Biochem.* 1993. V. 32. P. 2202–2208.
4. *Lambright D.G., Balasubramanian S., Decatur S.M., Boxer S.G.* // *Biochem.* 1994. V. 33. P. 5518–5524.
5. *Barrick D.* // *Biochem.* 1994. V. 33. P. 6546–6552.
6. *DePillis G.D., Decatur S.M., Barrick D., Boxer S.G.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. P. 6981–6985.
7. *Decatur S.M., Boxer G.S.* // *Biochem.* 1995. V. 34. P. 2122–2127.
8. *Антина Е.В., Лебедева Н.Ш., Вьюгин А.И.* // Журн. координ. химии. 2001. Т. 27. С. 784–789.
9. *Mink L.M., Polam J.R., Christensen K.A., Bruck M.A., Walker F.A.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 9329–9336.
10. *Miller L.M., Chance M.R.* // *Biochem.* 1995. V. 34. P. 10170–10174.
11. *Jewsbury P., Yamamoto S., Minato T., Saito M., Kitagawa T.* // *J. Phys. Chem.* 1995. V. 99. P. 12677–12682.
12. *Tokita Y., Nakatsuji H.* // *J. Phys. Chem.* 1997. V. 101. P. 3281–3286.
13. *Ghosh A., Gonzales E., Vangberg T.* // *J. Phys. Chem.* 1999. V. 103. P. 1363–1370.
14. *Rovira C., Kunc K., Hutter J., Ballone P., Parrinello M.* // *J. Phys. Chem.* 1997. V. 101. P. 8914–8923.
15. *Romanova T., Krasnov P., Avramov P.* // Abstract XVIth Internat. Winterschool on Electronic Properties of Novel Materials. Molecular Nanoclusters, 2–9 Marth 2002, Kirchberg, Tirol, Austria. P. 74.
16. *Романова Т.А., Краснов П.О., Качин С.В., Аврамов П.В.* Теория и практика компьютерного моделирования нанообъектов: Справочное электронное пособие. Зарегистрировано в ФГУП НТЦ “Информрегистр” 25.09.2002 г. № 0320200885.
17. *Stewart J.J.P.* // *J. Comput. Chem.* 1989. V. 10. P. 209–215.
18. *Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S.J., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A.* // *J. Comp. Chem.* 1993. V. 14. P. 1347–1363.
19. *Романова Т.А., Краснов П.О., Аврамов П.В.* // Вопросы мед. химии. 2001. Т. 47. С. 308–315.
20. *Романова Т.А., Аврамов П.В.* // Докл. АН. 2002. Т. 383. С. 116–119.

## The Role of Histidine in the Ligand-Bonding Capacity of the Hemoglobin Gene

T. A. Romanova<sup>1,2#</sup>, P. O. Krasnov<sup>2</sup>, A. A. Kuzubov<sup>2</sup>, and P. B. Avramov<sup>2</sup>

<sup>#</sup> Fax: (3912) 43-2756; e-mail: romanova@iph.krasn.ru

<sup>1</sup> Institute of Computational Modeling, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

<sup>2</sup> Kirenskii Institute of Physics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia

The atomic and electronic structures of heme complexes with His, Gly, and Cys residues (Heme–His, Heme–Gly, and Heme–Cys) in the fifth coordination position of the Fe atom and with oxygen and nitrogen oxide molecules in the sixth Fe position were studied by the semiempirical quantum-chemical method PM3. A comparative analysis of internuclear distances showed that the strength of chemical bonding between the ligand molecules (oxygen and nitrogen oxide) is greater for Heme–Cys than for Heme–His and Heme–Gly complexes. Consequently, the strengthening of the chemical bond of the oxygen (or nitrogen oxide) molecule with Heme–Cys substantially weakens the chemical bond in the ligand molecule. The Mulliken population analysis showed that the electronic density of ligand (oxygen or nitrogen oxide) *p*-orbitals is transferred to the *d*-orbitals of the Fe atom, whose charge, calculated according to the Mulliken analysis, formally becomes negative. In the Heme–His complex with oxygen, this charge is substantially greater than in the complex with NO, and the oxygen molecule becomes polarized. No oxygen polarization is observed in the Heme–Cys complex, and the electron density (judging from the change in the Fe charge) is transferred to the coordinated sulfur atom. This is also characteristic of Heme–Cys complexes with nitrogen oxide. An analysis of charges on the atoms indicates that the character of chemical bonding of the oxygen molecule in Heme–Cys and Heme–Gly complexes is similar and basically differs from that in the case of the Heme–His complex. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* electronic structure, hemoglobin, heme, ligands, PM3 method, proximal amino acid residues