



УДК 548.737

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕГГЕМОГЛОБИНА  
В КОМПЛЕКСАХ С НИТРОЗОБЕНЗОЛОМ,  
НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ И ИОНАМИ АЦЕТАТА, ФТОРИДА  
И ЦИАНИДА

Куранова И. П., Тепляков А. В., Обмолова Г. В.,  
Воронцова А. А., Попов А. Н., Хейкер Д. М.,  
Арутюнян Э. Г.

Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова Академии наук СССР, Москва

Методом разностных синтезов Фурье при разрешении 2 Å сравнивали структуры комплексов леггемоглобина люпина с нитрозобензолом, никотиновой кислотой и ионами ацетата, фторида и цианида относительно акваметгемоглобина. При связывании лигандов обнаружены значительные конформационные перестройки в молекуле леггемоглобина. Показано, что вследствие удаленности остатков, расположенных на дистальной стороне гема, прямые контакты гемогрупушки с ними ослаблены; возмущения в центре гема передаются на молекулу белка через ковалентную связь гема с проксимальным остатком гистидина F11\* и нековалентные контакты с белковым окружением на проксимальной стороне. При связывании объемных лигандов необходимо увеличение дистальной полости гемового кармана обеспечивается смещением аминокислотных остатков CD-области леггемоглобина и выходом на поверхность молекулы дистального остатка гистидина E7.

Леггемоглобины являются единственными представителями гемоглобинов, которые обнаружены в тканях высших растений. Они содержатся в корневых клубеньках бобовых растений, инокулированных бактериями *Rizobium*, и принимают участие в фиксации атмосферного азота. Их биологическая роль — транспорт кислорода к азотфиксирующим бактериям. Поддерживая дыхание бактериоидов, леггемоглобин обеспечивает тот уровень свободного кислорода, который достаточно высок для протекания окислительного фосфорилирования и достаточно низок, чтобы не вызвать инактивацию нитрогеназного комплекса, работающего только в анаэробных условиях. Высокое сродство к кислороду позволяет ему выполнять эту функцию.

Кроме кислорода леггемоглобин в ферро- и ферриформе присоединяет ряд других лигандов, причем круг соединений, взаимодействующих с леггемоглобином, шире, чем для других гемоглобинов. Это делает леггемоглобин особенно подходящим объектом для изучения механизмов связывания, знание которых необходимо для понимания причин, определяющих наиболее важное свойство гемоглобинов — величину сродства к лигандам. Пространственная структура леггемоглобина в форме комплекса с ацетатом была определена при разрешении 2,8 Å [2] и уточнена при разрешении 2,0 Å [3]. При этом было выявлено сходство леггемоглобина с гемоглобинами животного происхождения, а также обнаружен ряд особенностей, присущих лишь леггемоглобину [4]. Оказалось, в частности, что дистальная полость гемового кармана, в которой размещается лиганд, в леггемоглобине имеет большие размеры, чем в других гемоглобинах. Наряду с лигандной в леггемоглобине найдены еще две полости, роль которых неясна.

Поскольку размер дистальной полости влияет на геометрию образующегося комплекса белок — лиганд (и следовательно, на прочность связи), морфологические особенности леггемоглобина отражаются и на его функциональном поведении. С большими размерами лигандной полости связа-

\* Система обозначений элементов структуры в молекуле леггемоглобина здесь и далее по Кендрью [4].

на, но крайней мере частично, способность леггемоглобинов взаимодействовать с широким кругом лигандов. Леггемоглобин связывает уксусную и другие алифатические кислоты, вплоть до валериановой [5]. Прочный комплекс леггемоглобина образует и с таким объемным лигандом, как никотиновая кислота. Никотиновая кислота участвует в метаболизме корневых клубеньков, поэтому высказывалось предположение, что она является естественным регулятором сродства леггемоглобина к кислороду [6]. Пространственная структура комплекса леггемоглобина с никотиновой кислотой при разрешении 2,8 Å была изучена ранее методом изоморфных замещений [7].

В настоящей работе методом разностных синтезов Фурье при разрешении 2 Å проводили сравнение структур нескольких комплексов леггемоглобина, среди них акваметлеггемоглобин и метлеггемоглобин в комплексе с ионом фторида — высокоспиновые, а комплексы леггемоглобина с цианидом и пикотином — низкоспиновые с трехвалентным железом. Комплекс леггемоглобина с никотиновой кислотой, так же как и комплекс с ацетатом, характерен только для группы растительных гемоглобинов, в то время как комплексы белка с цианидом и фторидом можно отнести к эталонным, известным для многих гемоглобинов. Представителем феррокомплексов леггемоглобина (комплексов с двухвалентным железом) является пирозобензоллеггемоглобин. Структура гемоглобина с лигандом данного класса (арилпирозо-) получена впервые.

Выбранные соединения дают возможность проследить влияние химической природы лиганда и его геометрических характеристик на конформацию глобина и функционального центра молекулы — гема.

#### *Разностный синтез комплекса леггемоглобина с ацетатом относительно акваметлеггемоглобина*

Картинки электронной плотности показали почти полную тождественность этих структур. Наиболее высокий пик локализован в районе связывания лиганда, причем на месте атома кислорода ацетата, связанного с атомом железа, значение электронной плотности равно нулю. Таким образом, положение молекулы воды и атома кислорода ацетата, координированного с атомом железа, совпадают. Форма и положение пика на синтезе определяются другими атомами ацетата.

Небольшой максимум электронной плотности в районе дистального остатка гистидина E7 указывает на смещение его имидазольного кольца в сторону лиганда при замене иона ацетата водой. Трудно сказать, сохраняется ли при этом водородная связь остатка His E7 с лигандом, которая осуществлялась через атомы кислорода ацетата [3].

В оставшемся разностный синтез очень чистый, что указывает на идентичность третичной структуры ацетат- и акваметформы леггемоглобина.

#### *Разностный синтез комплекса леггемоглобина с ионом фторида относительно акваметлеггемоглобина*

Наряду с аквамет- и ацетатным комплексам леггемоглобина нами был изучен высокоспиновый комплекс с фторид-ионом в качестве лиганда. Из-за малых размеров фторид-иона стерические препятствия при его введении в гемовый карман должны быть минимальными или полностью отсутствовать. Поэтому изменения конформации, вызываемые присоединением фторида, отражают лишь влияние химической природы лиганда на электронную систему гема.

При связывании иона F<sup>-</sup> в третичной структуре леггемоглобина наблюдаются заметные изменения. Нельзя исключить возможность некоторого поворота молекулы как целого внутри элементарной ячейки, однако на этом фоне четко просматриваются следующие характерные особенности. Ожидаемое место связывания лиганда не содержит разностных максимумов. Следовательно, ион F<sup>-</sup> занимает то же положение в дистальном кармане, что и молекула воды в акваметлеггемоглобине. Взаимное расположение отрицательных и положительных максимумов говорит о том, что

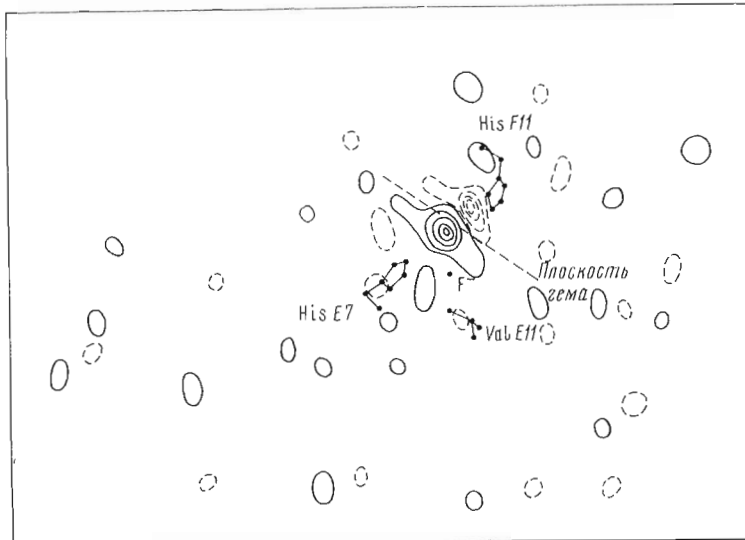


Рис. 1. Сечение разностного синтеза Фурье комплекса леггемоглобина с фторидом относительно акваметлеггемоглобина, перпендикулярное оси второго порядка и проходящее через гем;  $z=0,56$ . Положительная электронная плотность показана сплошными линиями, отрицательная — прерывистыми. Изолинии проведены через  $0,04 \text{ e}/\text{Å}^3$ . Нулевой контур опущен. Положения боковых групп и гема соответствуют акваметлеггемоглобину

изменение положения гема при связывании фторида имеет характер наклона в дистальную сторону вокруг линии, проходящей через пиррольные кольца I и II, легкого сдвига к выходу из гемового кармана.

Возмущение электронной системы гема передается на белок в основном по *транс*-механизму через пятый лиганд — проксимальный остаток гистидина. Однако перераспределение электронной плотности в порфириновой системе отражается и на ван-дер-ваальсовых контактах экваториальных заместителей с глобином, что может способствовать наблюдаемому изменению ориентации гема. Наибольший максимум на разностном синтезе соответствует атому Fe (рис. 1). Сдвиг и поворот гема в дистальную сторону сопровождается, вероятно, некоторым выходом железа из плоскости порфирина по направлению к лиганду. Тенденция к сдвигу железа в сторону фторида наблюдалась и во фторидных комплексах гемоглобинов млекопитающих [8]. Атом железа в ацетатном комплексе леггемоглобина несколько смещен в сторону лиганда [3]. По-видимому, ион фторида ослабляет связь железа с проксимальным остатком гистидина F11 белка. Ослабление этой связи может в свою очередь облегчить поворот гема. Проксимальный остаток гистидина во фторидном комплексе меняет свою ориентацию, поворачиваясь вокруг связи  $C_\alpha - C_\beta$ . Этот поворот нарушает ван-дер-ваальсов контакт между остатком гистидина F11 и атомом серы S<sub>7</sub> метионина H23 и тем самым увеличивает подвижность H-спирали. В результате конформационные изменения, возникающие в функциональном центре молекулы, передаются на ее C-концевой участок. Интересно, что в систему конформационных изменений в F<sup>-</sup>-метлеггемоглобине включается тот же кластер молекулы, перестройка которого приводит к кооперативному взаимодействию субъединиц в тетрамерных гемоглобинах.

Дистальный остаток гистидина E7, имеющий водородную связь с лигандом в акваметлеггемоглобине, сохраняет свое положение у входа в гемовый карман, однако большая часть E-спирали отходит от гема в сторону растворителя, главным образом в сторону A-спирали. Разностные максимумы около остатка Thr A12 и других остатков, имеющих тесные контакты с E-спиралью, указывают на то, что спираль A также удаляется от центра молекулы в сторону растворителя.

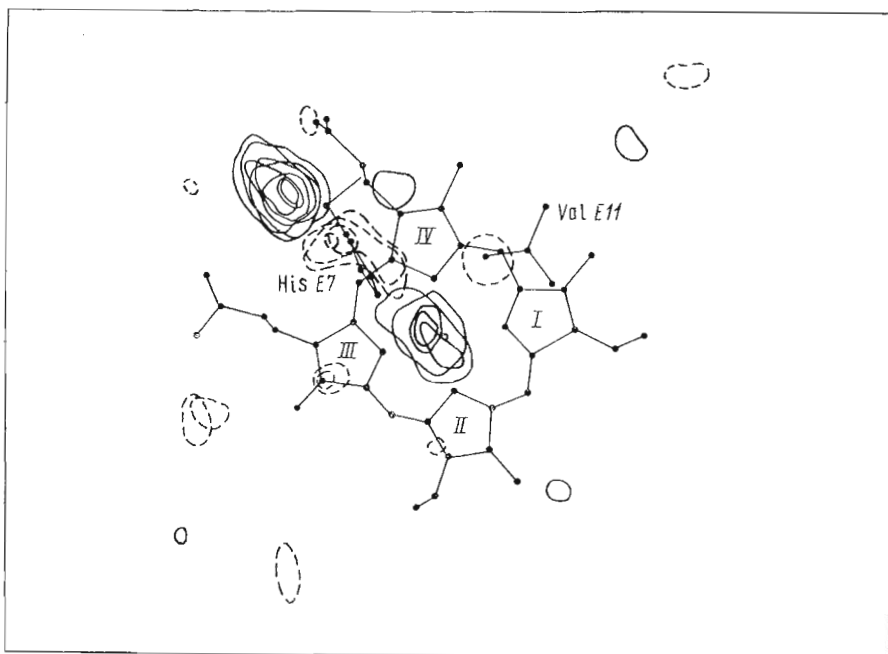


Рис. 2. Сечения с 5-го по 7-е разности синтеза Фурье никотинатного комплекса леггемоглобина относительно акваметлеггемоглобина. Сечения рассчитаны через 0,67 Å. Нулевое сечение соответствует положению гема в акваметлеггемоглобине. Интервал между изолиниями 0,07 е/Å<sup>3</sup>. Нулевой и первые контуры опущены

Еще один узел, где сосредоточены конформационные изменения, — это район *CD*-перехода. Движение гема в дистальную сторону вызывает некоторое перемещение остатков в *CD*-области.

Наиболее значительные максимумы сосредоточены возле остатка Phe *CD1*, указывая на его смещение в противоположную от гема сторону. Между *CD*-переходом и спиралью *B* в леггемоглобине находится полость диаметром 6 Å. Остатки *CD*-перехода сдвигаются именно в направлении этой полости, тем самым увеличивая объем дистальной части гемового кармана.

Глубоко в гемовом кармане, примерно на расстоянии 3,5 Å от плоскости порфирина, имеется небольшой положительный максимум, происхождение которого пока неясно.

*Разностный синтез комплекса леггемоглобина с никотиновой кислотой относительно акваметлеггемоглобина*

С дистальной стороны гема над атомом железа локализован большой положительный максимум (0,30 е/Å<sup>3</sup>), соответствующий никотинату. Форма пика позволяет однозначно установить ориентацию его пиридинового кольца. Максимум карбоксильной группы никотината отсутствует на синтезе, так как она расположена на месте остатка His *E7* в акваметформе леггемоглобина. Вследствие этого перекрывания отрицательный максимум для остатка His *E7* (0,23 е/Å<sup>3</sup>) значительно меньше положительного максимума, соответствующего положению этого остатка в никотинатном комплексе (рис. 2). Ближе к поверхности молекулы имеется пик электронной плотности высотой 0,29 е/Å<sup>3</sup>, определяющий новое положение боковой группы остатка His *E7*.

Лиганд связывается с Fe через атом азота пиридинового кольца так, что плоскость кольца практически перпендикулярна плоскости гема и

составляет небольшой угол с направлением, проходящим через метановые атомы углерода, а группа  $\text{COO}^-$  направлена в сторону дистального остатка гистидина  $E7$ . При этом имидазольный радикал остатка His  $E7$  поворачивается примерно на  $90^\circ$  вокруг  $\text{C}_\alpha\text{—C}_\beta$  связи и занимает положение у входа в гемовый карман на поверхности молекулы.

Положение карбоксильной группы никотината нельзя однозначно установить по разностному синтезу. Скорее всего, как это предполагалось ранее [7], она образует через один или оба атома кислорода водородную связь с атомом азота  $\text{N}_\delta$  His  $E7$ .

На синтезе явно выражено смещение гема в проксимальную сторону. Положительный и отрицательный разностные максимумы отстоят друг от друга примерно на  $2 \text{ \AA}$  (рис. 3). Оценить величину смещения гема затруднительно, так как расстояние между разностными максимумами увеличивается по мере перекрытия пиков (рис. 4). Гем сдвигается параллельно своей плоскости внутрь гемового кармана и при этом немного поворачивается вокруг линии  $\beta\text{—}\delta$  так, что остатки пропиевой кислоты движутся в проксимальную сторону. Отрицательные и положительные пики около остатка пропиевой кислоты IV можно интерпретировать как поворот вокруг связи  $47\text{C3—}47\text{CA}$  (см. номенклатуру гема в работе [1]) примерно на  $180^\circ$ . В целом гем смещается к спирали  $F$ .

Смещение гема в проксимальную область вызывает некоторый сдвиг  $F$ -спирали, которая удаляется от гема и, кроме того, смещается вдоль своей оси в сторону  $\text{C}$ -конца. Перемещение спирали быстро затухает в нерегулярных переходах  $EF$  и  $FG$  и практически не передается на спирали  $E$  и  $G$ . Только в начале  $G$ -спирали есть небольшие сдвиги от центра молекулы.

$E$ -спираль в целом не претерпевает заметных изменений при переходе от акваметлеггемоглобина к никотинатному комплексу. Исключение может составить лишь район остатков Val  $E11$  — Val  $E15$ , имеющих контакты с гемом.

Остатки Phe  $CD1$  и Phe  $CD3$ , составляющие часть стенки дистального кластера [4], следуют за движением гема в проксимальную сторону. Другие же остатки  $CD$ -перехода сохраняют свои положения.

Пара пиков электронной плотности возле остатка Met  $H23$  указывает на его удаление от  $F$ -спирали. Соседние остатки  $H$ -спирали также немного отходят от активного центра.

#### *Разностный синтез комплекса леггемоглобина с цианидом относительно акваметлеггемоглобина*

Из двух низкоспиновых комплексов комплекс леггемоглобина с цианидом является эталонным, изученным для многих гемоглобинов, в то время как комплекс с никотиновой кислотой известен лишь для группы растительных глобинов. Атому углерода цианидной группы соответствует положительный максимум величиной  $0,13 \text{ e/\AA}^3$  в сечениях  $-4$ ,  $-5$ ,  $-6$  вблизи места расположения молекулы воды. Нулевое сечение проходит через атом железа. Совпадению положений атома углерода и молекулы воды, однако, неполное, поэтому в тех же сечениях имеется небольшой отрицательный

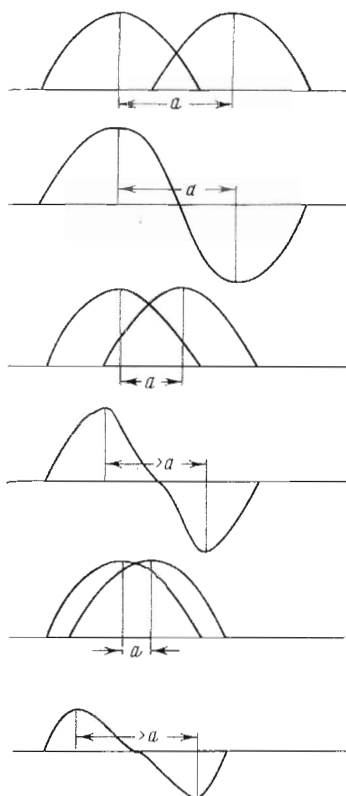


Рис. 3. Зависимость расстояния между разностными максимумами на синтезах Фурье от степени перекрытия пиков электронной плотности

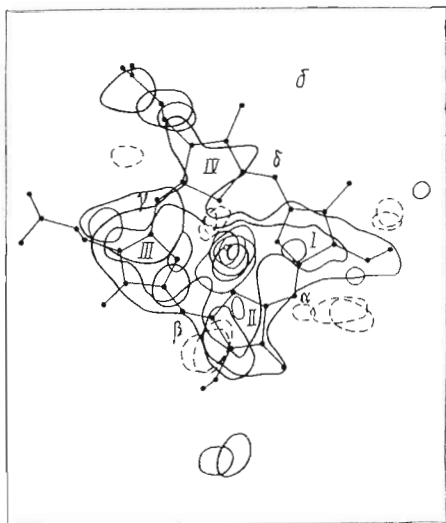
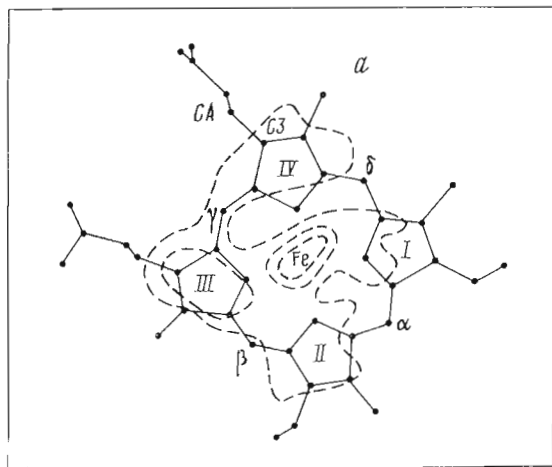


Рис. 4. Сечения разностного синтеза Фурье никотинатного комплекса леггемоглобина относительно акваметлеггемоглобина, параллельные плоскости гема (см. подпись к рис. 2). *a* — сечение 1 (с дистальной стороны гема); *b* — сечения с 1-го по 5-е (с проксимальной стороны гема)

пик, возникающий из-за неполного перекрытия их электронных плотностей при переходе от акваметлеггемоглобина к цианидному комплексу. Разностный синтез не дает возможности определить точное расположение  $CN^-$ -иона.

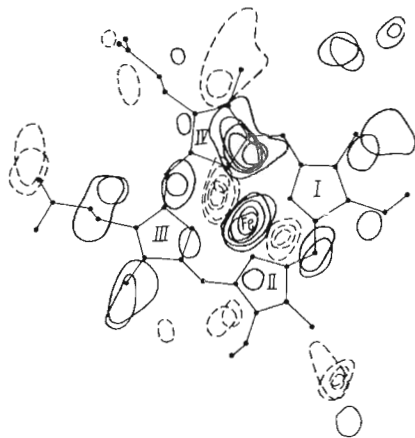
При связывании цианида гем сдвигается в своей плоскости в глубь гемового кармана (рис. 5). Разностные пики около остатков пропионовых кислот указывают на их смещение в дистальную сторону.

Максимумы в области *E*-спирали расположены главным образом около остатков аминокислот, имеющих контакты с гемом (His *E7*, Val *E11* — Val *E15*), и указывают на удаление спирали в противоположную от гема сторону, в перпендикулярном к нему направлении. Аминокислотные остатки *CD*-области, входящие в дистальный кластер, сохраняют свое положение, за исключением остатка Phe *CD1*, боковая цепь которого слегка смещается в направлении остатка Phe *CD3*. Небольшие конформационные перестройки возможны в районе остатков Phe *CD3* — Ser *CD4*. В целом *CD*-переход не претерпел значительных изменений.

Проксимальный остаток гистидина *F11*, связанный с атомом Fe, обнаруживает небольшое смещение вдоль *F*-спирали к ее С-концу. В районе витка спирали Leu *F4* — Asn *F6*, предшествующего остатку His *F11*, группа максимумов показывает, что спираль *F* движется к гему. В то же время на остатках His *F11* — Val *FG1* расположение максимумов противоположное, т. е. С-конец *F*-спирали и *FG*-переход удаляются от гема. Таким образом, спираль *F* подобно коромыслу наклоняется, опираясь на остаток His *F11*, и следует за поворотом гема. Очевидно, что это должно вызывать изменения в *G*-спирали. Действительно, положительные и отрицательные пики в начале *G*-спирали указывают на смещение остатка Ala *G1* — Val *G7* в ту же сторону, что и конец *F*-спирали.

Рассмотренная для цианидного комплекса система разностных пиков позволяет предположить, что молекула несколько поворачивается в элементарной ячейке. Направление сдвига отдельных частей молекулы (противоположные смещения *E*- и *G*-спиралей, наклон гема к *F*-спирали) согласуется с этим предположением и указывает на то, что ось вращения перпендикулярна оси второго порядка и проходит под углом  $60^\circ$  к ребру *a* элементарной ячейки. На фоне поворота молекулы как целого видны сдвиги отдельных групп атомов, сопровождающие связывание иона  $CN^-$ . К ним отнесены смещения в направлении, противоположном повороту молекулы, и максимумы аномально большой величины.

Рис. 5. Сечения  $-2$ ,  $-1,0$ ,  $+1$  разностного синтеза Фурье дванидного комплекса леггемоглобина относительно акваметлеггемоглобина. Интервал между изолиниями  $0,04 \text{ e}/\text{Å}^3$ . Нулевой и первые контуры опущены



Таким образом, как и во фторидном комплексе, связывание цианида и никотината вызывает сдвиг гема. Однако направление сдвига — противоположное. Гем сдвигается в глубь кармана, в проксимальную сторону. В результате увеличивается пространство для лиганда. В никотинатном комплексе сдвиг выражен сильнее, чем в цианидном. В обоих комплексах изменения, происходящие в кластере проксимального остатка гистидина, нарушают его контакт с боковой группой остатка Met H23. При этом в цианидном комплексе исчезает положительный максимум, соответствующий остатку Met H23; вероятно, боковая группа остатка Met H23 не имеет фиксированного положения. В никотинатном комплексе остаток Met H23 удаляется от *H*-спирали. Можно было ожидать, что этот остаток выйдет на поверхность молекулы и станет доступным растворителю. Однако по попытки модифицировать эту группу иодацетамидом в цианидном комплексе леггемоглобина оказались безуспешными. По-видимому, доступность метионинового остатка увеличилась недостаточно.

Изменения, происходящие на дистальной стороне гема, в обоих низкоспиновых комплексах различны. Как известно, цианидные комплексы порфиринов должны иметь линейное строение. Это подтверждается на модельных соединениях. Однако до сих пор во всех исследованных комплексах гемоглобинов угол  $\text{Fe}-\text{C}-\text{N}$  отличается от  $180^\circ$ . Например, для гемоглобина миогли он равен  $140^\circ$ , для эритрохромурина —  $164^\circ$ ; и в том и в другом случае атом углерода, связанный с Fe, смещен от оси гема [9, 10]. В гемоглобине лошади предполагается линейная связь лиганда с железом за счет деформации порфирина, так что плоскость пиррольных атомов азота остается перпендикулярной направлению связи  $\text{Fe}-\text{C}-\text{N}$  при отклонении лиганда на  $20^\circ$  от оси гема [11].

В леггемоглобине угол  $\text{Fe}-\text{C}-\text{N}$  может быть близок к  $180^\circ$ , так как размер гемового кармана обеспечивает такую возможность. Об отсутствии стерических напряжений при связывании говорит сохранение положения остальных остатков на дистальной стороне гема.

При связывании никотиновой кислоты кроме сдвига гема в глубь кармана происходит поворот остатков пропионовой кислоты в проксимальную сторону, благодаря чему открывается вход в гемовый карман. Возможно, что остаток пропионовой кислоты при пиррольном кольце III образует водородную связь с остатком Gln E5. Никотиновая кислота связывается через азот пиридинового цикла, плоскость которого почти перпендикулярна плоскости гема. При этом карбоксильная группа, направленная в сторону дистального остатка гистидина, заставляет его повернуться на  $90^\circ$  вокруг связи  $\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta$ , что выводит его на поверхность молекулы. Водородная связь между карбоксильной группой никотиновой кислоты и атомом азота  $\text{N}_\delta$  дистального остатка гистидина стабилизирует образовавшийся комплекс.  $\text{N}_\delta$ -атом дистального остатка гистидина, вероятно, образует еще одну связь с  $\text{COOH}$ -группой остатка Gln E3. Возникающая цепочка водородных связей объясняет рН-зависимость связывания никотиновой кис-

лоты, наблюдавшуюся Эпплеби для леггемоглобина сои и Атанасовым и Краснобаевой для леггемоглобина люпина [6, 12].

*Разностный синтез комплекса леггемоглобина с нитрозобензолом относительно акваметлеггемоглобина*

Среди всех лигандов гемоглобинов наибольшее внимание привлекают те, которые аналогичны природному субстрату — кислороду. В известной мере таковыми являются окись углерода и окись азота, которые отличаются от кислорода соответственно на два и один электрона в молекуле. Комплексам NO и в особенности CO с гемоглобинами посвящена большая литература. Однако имеется еще один класс молекул, которые геометрически отличаются от молекулы кислорода, но изoeлектронны ей. Это замещенные нитрозосоединения, которые могут связываться с металлом как через азот, так и через кислород. Способность нитрозосоединений связываться с гемоглобином известна давно, с нею связана, в частности, их токсичность.

Трудности в получении комплексов замещенных нитрозосоединений состоят в том, что в свободном виде существуют только нитрозосоединения, не содержащие  $\alpha$ -водородного атома. Кейлином и Хартри была показана возможность получения арилнитрозокомплексов гемоглобина через производные гидроксилamina [13]. Эта методика была успешно применена Манской для получения алкил- и арилнитрозокомплексов ряда металлопорфиринов и гемобелков [14].

Метформа леггемоглобина, содержащая  $Fe^{3+}$ , выступает как окислитель по отношению к гидроксиламину, переводя его в нитрозосоединение, которое тут же дает комплекс с ферроформой:  $Fe^{3+} + RNHOH \rightarrow Fe^{2+} \cdot RNO$ . Именно таким способом, обрабатывая кристаллы леггемоглобина в метформе фенилгидроксилamiном, мы получили комплекс леггемоглобина с нитрозобензолом.

На рис. 6 совмещены сечения разностного синтеза, параллельные плоскости гема на расстоянии 3–5 Å от атома железа. Положительный максимум нитрозобензола, имеющий форму сплюсненного эллипсоида с провалом в месте расположения молекулы воды в акваметлеггемоглобине, и примыкающий к нему максимум, соответствующий атому кислорода, показывают, что нитрозобензол связывается через NO-группу, а бензольное кольцо направлено в глубь гемового кармана. При этом плоскость бензольного кольца наклонена к плоскости гема, а NO-группа выходит из плоскости, перпендикулярной первым двум. Поскольку положительный пик атома кислорода расположен довольно глубоко в кармане, можно предположить, что связь лиганда с железом осуществляется через атом азота, хотя полностью нельзя исключить дополнительной связи Fe—O.

Отрицательный и положительный максимумы остатка His E7 говорят о повороте имидазола дистального остатка гистидина вокруг связи  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  и выходе его из гемового кармана, как и в никотинатном комплексе леггемоглобина. Разностные пики возле гема свидетельствуют, что гем наклоняется в дистальную сторону вокруг осей, проходящей через пиррольные кольца I и II.

Связывание нитрозобензола вызывает очень большие изменения в CD-переходе. Остаток Phe CD1 уходит от гема в направлении CD-области и тянет за собой связи остатков Phe CD1—Leu C7 и Phe CD1—Ser CD2. Значительные максимумы около главной цепи в районе остатков Phe CD3—Ala CD5 показывают, что она смещается в ту же сторону, что влечет за собой удаление боковой группы остатка Phe CD3 от лиганда.

В отличие от всех предыдущих комплексов в нитрозобензоллеггемоглобине наблюдается сдвиг остатка Phe B10 в сторону CD-перехода. Значительные изменения при связывании лиганда произошли в области E-спирали. Разностные максимумы особенно велики около остатков Lys E10—Gln E17 и указывают на движение E-спирали от центра молекулы подобно тому, как это наблюдалось во фторидном комплексе леггемоглобина.

С проксимальной стороны гема также обнаруживаются существенные



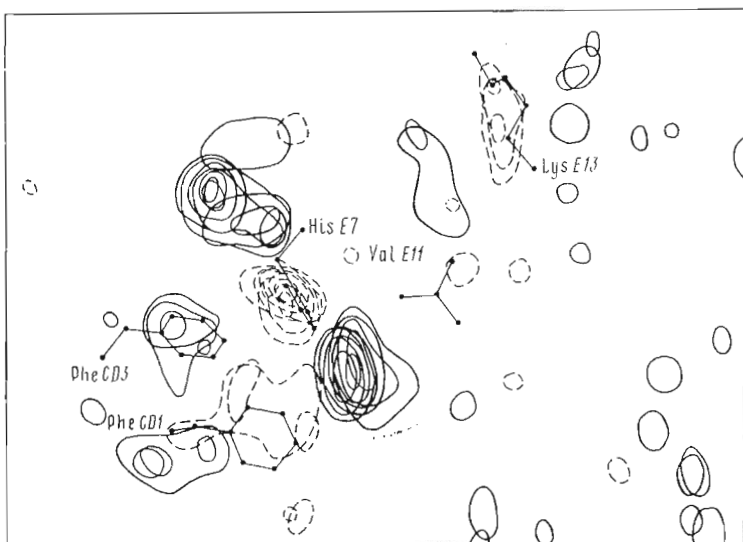


Рис. 6. Сечения с 5-го по 7-е разностного синтеза Фурье комплекса леггемоглобина с нитробензолом относительно аквамеллсгемоглобина. Интервал между изолиниями  $0,035 \text{ e}/\text{Å}^3$ . Нулевой и первые контуры опущены

перестройки третичной структуры. Остаток His F11, атом азота которого ковалентно связан с Fe, смещается к началу F-спирали и в дистальную сторону вслед за движением гема. В большей или меньшей степени изменяют свое положение и другие остатки спирали. В целом можно говорить о сдвиге спирали вдоль своей оси к N-концу и некоторому сближению с гемом. Группа максимумов в районе остатков Glu H13—His H20 показывает, что H-спираль смещается к активному центру молекулы.

Замечательно, что, несмотря на связывание объемного лиганда, наблюдается сдвиг гема к лиганду, т. е. в дистальную сторону, хотя такой сдвиг уменьшает объем функциональной полости. Частично этот эффект компенсируется существенным изменением конформации CD-перехода. Кроме того, необходимое увеличение объема полости достигается в этом случае за счет выхода дистального остатка гистидина на поверхность молекулы, как описано для никотинатного комплекса.

Суммарные изменения в структуре леггемоглобина при связывании лигандов приведены в табл. 1.

Сопоставляя рассмотренные случаи, можно заключить, что связывание лигандов сопровождается перестройкой как самого гемового кармана, так и удаленного от него участка молекулы — C-конца H-спирали. Характер изменений в этом участке молекулы сходен с изменениями в третичной структуре, запускающими механизм кооперативного взаимодействия субъединиц в тетрамерных гемоглобинах, однако триггером является скорее поворот гема, чем выход железа из плоскости порфирина. Тем не менее очевидно, что элементы конформационной подвижности, потенциально способные привести к изменению четвертичной структуры, проявляются в мономерных молекулах леггемоглобина. По-видимому, это свойство связано с одинаковым во всех гемоглобинах простирающимся рисунком молекулы. Сдвиг в дистальную сторону показан как в высокоспиновом фторидном феррикомплесе, так и в низкоспиновом феррокомплесе нитробензола. Как фторид и ацетат, замещенная нитрогруппа, возможно, ослабляет связь железа с проксимальным остатком гистидина. Такая способность незамененной нитрогруппы проявлялась в модельных комплексах порфиринов, а также в NO-комплексах тетрамерных гемоглобинов, когда введение дифосфоглицерата разрывало связь Fe с проксимальным остатком гистидина в  $\alpha$ -субъединицах [15, 16].

## Изменения в структуре комплексов леггемоглобина относительно акваметформы

Наблюдаемое изменение в структуре	Лиганд				
	ацетат	фторид	цианид	никотинат	нитрозобензол
Движение дистального остатка гистидина	+	0	0	+	+
Движение спиралей E, F, H от гема	0	+	+	+	+
Поворот и движение гема	0	+	+	+	+
		(дист.)	(прокс.)	(прокс.)	(дист.)
Движение остатка Met H23	0	+	+	+	+
Изменение конформации в CD-области	0	+	+	+	++
Движение остатков пропионовой кислоты	0	+	++	++	+

Хотя характер конформационных изменений в первую очередь определяется взаимодействием электронных систем гема и лиганда, в случае объемных лигандов большую роль играют и стерические факторы. Наиболее яркий пример — уникальная подвижность дистального остатка гистидина в никотинатном и нитрозобензольном комплексах. До сих пор поверхностное положение дистального остатка гистидина наблюдалось лишь в эритрокрурине, где гистидиновый остаток выдвинут на поверхность из-за пространственных препятствий [17]. Подвижность дистального остатка гистидина была отмечена Эпплеби при исследовании методом ЯМР леггемоглобина сои [18]. Возможно, что подвижность остатка His E7 — общее свойство всех растительных гемоглобинов. Она определяет легкость вхождения кислорода в гемовый карман и его быстрое схватывание. Как известно, именно высокое значение константы скорости присоединения определяет повышенное сродство леггемоглобинов к кислороду [19].

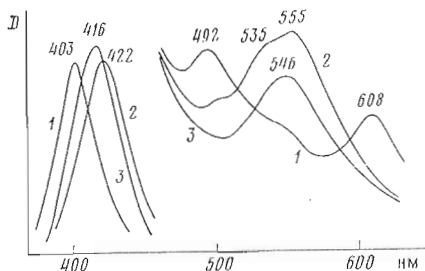
Роль дополнительных полостей, присутствующих в молекуле леггемоглобина, может заключаться в увеличении его конформационной подвижности. Это особенно очевидно для полости в районе CD-перехода.

## Экспериментальная часть

Кристаллы леггемоглобина в комплексе с ионом ацетата выращивали как описано ранее [20] и переводили в акваметформу, выдерживая 1 сут в 0,2 М фосфатном буфере, содержащем  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60%-ного насыщения. Цианидный и фторидный комплексы леггемоглобина были получены настаиванием кристаллов комплекса леггемоглобина с ацетатом в растворах 0,1 М NaF и 0,01 М KCN, содержащих  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  указанной концентрации. Для получения цианидного комплекса был использован аммоний-ацетатный буфер, pH 7, для получения фторидного — 0,2 М фосфатный буфер, pH 7. Оптимальные условия приготовления комплексов ионов с белком были предварительно подобраны на растворах леггемоглобина. Полнота образования комплексов показана спектрофотометрически. Спектры в диапазоне 350—630 нм записывали на спектрофотометре Unicam SP1800 (Англия). Кристаллы цианидного комплекса леггемоглобина после съемки на дифрактометре растворяли и записывали спектр.

Кристаллы никотинатного комплекса леггемоглобина выращивали как описано в работе [7]. Комплекс леггемоглобина с нитрозобензолом получали по методу Мансон [14]. Восстановление леггемоглобина фенолгидроксиламином проводили непосредственно с препаратами кристаллов, помещая их в рентгеновский капилляр, заполненный 1 мМ раствором фенолгидроксиламина в  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60%-ного насыщения. Фенолгидроксиламин растворяли в спирте, концентрация спирта в конечном растворе не превышала 1%. Восстановление проводили при pH 6. Чтобы предотвратить окисление образовавшегося комплекса, работу проводили в боксе, запол-

Рис. 7. Спектры растворов комплексов леггемоглобина с фторидом (1), нитрозобензолом (2) и цианидом (3)



ненном аргоном. За ходом реакции следили по изменению окраски кристаллов от красно-коричневой до темно-фиолетовой. Общее время восстановления 22 ч. Полноту реакции проверяли, растворяя контрольные кристаллы и записывая их спектр. Спектры записывали после растворения одного кристалла, используя для этого микрокюветы. Максимум полосы Соре комплекса леггемоглобина с нитрозобензолом — 422 нм. Капилляры с восстановленными кристаллами запаивали в атмосфере аргона. Работу вели при 4° С. Спектры всех приготовленных комплексов даны на рис. 7.

Параметры полученных монокристаллов производных леггемоглобина приведены в табл. 2. Для измерения интенсивностей рентгеновских отражений в зоне разрешения 2,0 Å использовали 512-канальный дифрактометр ДАРК-2,0, в котором возможна одновременная регистрация отражений в четырех слоевых плоскостях обратной решетки [21]. Это позволило получить полный набор экспериментальных данных для каждого комплекса (около 25 000 отражений) с одного кристалла в течение 2 сут. Интенсивности отражений от ряда слоевых линий измеряли дважды в разных секциях дифрактометра. Факторы расходимости для этих измерений (5—7%) соответствовали факторам расходимости для эквивалентных отражений, измеренных в одной секции. При измерении интенсивностей отражений дальних слоевых линий (с 16-й по 24-ю) схему плоского конуса заменяли эквинаклонной, что позволило уменьшить число нерегистрируемых отражений, попадающих в слепую область, в 5—8 раз. Окончательный массив экспериментальных данных, полученный после усреднения интенсивности эквивалентных отражений содержал 12 000 интенсивностей.

Разностные синтезы Фурье, рассчитанные с использованием экспериментальных величин структурных амплитуд двух форм белка, позволяют определить изменения в структуре одной из форм по сравнению с другой. При построении разностных синтезов Фурье использовались коэффициенты  $(|F_L| - |F_M|) \exp i\alpha_c$ , где  $|F_L|$  — структурные амплитуды комплексов леггемоглобина с различными лигандами,  $|F_M|$  — структурные амплитуды акваметлеггемоглобина,  $\alpha_c$  — фазы, рассчитанные по уточненной атомной модели комплекса леггемоглобина с ацетатом [3].

Первоначально был рассчитан разностный синтез комплекса леггемоглобина с ацетатом относительно акваметлеггемоглобина. Анализ карт электронной плотности показал, что замена ацетат-нона молекулой воды не сопровождается заметными конформационными перестройками в молекуле леггемоглобина. Это позволило использовать фазы комплекса лег-

Таблица 2

Параметры кристаллов леггемоглобина

Форма комплекса	a, Å	b, Å	c, Å	γ, град
Аквамет-	93,22	38,26	52,01	98,8
Ацетатмет-	93,33	38,40	52,40	99,0
Цианомет-	93,19	38,41	52,07	98,9
Пикотинатмет-	92,92	38,64	52,36	99,6
Фтормет-	93,34	38,24	51,91	98,8
Нитрозобензоат-	93,23	38,25	51,88	98,7

гемоглобина с ацетатом при расчете разностных синтезов различных комплексов относительно акваметлеггемоглобина.

Авторы выражают искреннюю благодарность акад. Б. К. Вайнштейну за постоянный интерес и помощь в выполнении данной работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Kendrew J. C., Watson H. C., Strandberg B. E., Dickerson R. E., Phillips D. C., Shore V. C.* Nature, 1961, v. 190, № 4777, p. 666-670.
2. *Вайнштейн Б. К., Арутюнян Э. Г., Куранова И. П., Борисов В. В., Сосфенов Н. И., Павловский А. Г., Гребенко А. И., Некрасов Ю. В.* Кристаллография, 1978, т. 23, № 3, с. 517-527.
3. *Арутюнян Э. Г., Куранова И. П., Вайнштейн Б. К., Штайгеманн В. Р.* Кристаллографии, 1980, т. 25, № 1, с. 80-103.
4. *Вайнштейн Б. К., Куранова И. П., Арутюнян Э. Г., Егоров Ц. А.* Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 684-699.
5. *Ellfolk N.* Acta chim. scand., 1961, v. 15, № 5, p. 975-984.
6. *Appleby C. A., Wittenberg B. A., Wittenberg J. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, № 2, p. 564-568.
7. *Арутюнян Э. Г., Куранова И. П., Товбус А. Б., Гребенко А. И., Воронова А. А., Некрасов Ю. В., Вайнштейн Б. К.* Кристаллография, 1980, т. 25, № 3, с. 526-534.
8. *Petri G., Perutz M. F.* J. Mol. Biol., 1977, v. 114, № 3, p. 421-434.
9. *Hendrickson W. A., Love W. E.* Nature New Biol., 1971, v. 232, № 33, p. 197-203.
10. *Steigemann W., Weber E. J.* Mol. Biol., 1979, v. 127, № 3, p. 309-338.
11. *Deatherage J. F., Loe R. S., Anderson C. M., Moffat K. J.* Mol. Biol., 1976, v. 104, № 4, p. 687-706.
12. *Краснобаева Н. Н., Атанасов Б. П.* Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 6, с. 1239-1246.
13. *Keilin D., Hartree E. F.* Nature, 1943, v. 151, № 4, p. 390-391.
14. *Mansuy D., Battioni P., Chottard J. C., Lange M.* J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 19, p. 6441-6443.
15. *Scheidt W. R., Piccolo P. L.* J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 7, p. 1913-1919.
16. *Pertuz M. F., Kilmartin J. V., Nagai K., Szabo A., Simon S. R.* Biochemistry, 1976, v. 15, № 2, p. 378-387.
17. *Huber R., Epp O., Formanek H. J.* Mol. Biol., 1970, v. 52, № 2, p. 349-354.
18. *Johnson R. N., Bradbury J. H., Appleby C. A.* J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 7, p. 2148-2154.
19. *Appleby C. A.* In: Proc. 11th Intern. Symp. on the Chem. of the Nature Products/Ed. Vlanov R., Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 1978, pt. 2, p. 30.
20. *Вайнштейн Б. К., Арутюнян Э. Г., Куранова И. П., Борисов В. В., Сосфенов Н. И., Гребенко А. И., Кошарева Н. В.* Кристаллография, 1974, т. 19, № 5, с. 971-980.
21. *Агеев О. И., Арутюнян Э. Г., Гаганов Д. А., Попов А. И., Хейкер Д. М., Шульмейстер В. М.* Кристаллография, 1981, т. 26, № 3, с. 451-457.

Поступила в редакцию  
21.V.1982

#### X-RAY STUDY OF LEGHEMOGLOBIN IN THE COMPLEXES WITH NITROSOBENZENE, NICOTINIC ACID, AND ACETATE, FLUORIDE AND CYANIDE IONS

KURANOVA I. P., TEPLYAKOV A. V., OBMOLOVA G. V.,  
VORONOVA A. A., POPOV A. N., KHEIKER D. M.,  
ARUTYUNYAN E. G.

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

Difference Fourier syntheses at 2 Å resolution were used to compare the three-dimensional structures of the lupin leghemoglobin complexes with nitrosobenzene, nicotinic acid, as well as acetate, fluoride and cyanide ions relatively to aquometlegghe-moglobin. Ligand binding was shown to lead to considerable conformational rearrangements of the leghemoglobin molecule. The contacts between heme and remote residues at its distal side are weakened; disturbances in the heme center are related to the protein via covalent bond with proximal histidine F11 and non-bonding interactions with the protein moiety on the proximal side. For binding bulky ligands, a required expansion of the distal cavity is provided by the shift of the residues in the CD region and transfer of the distal histidine E7 to the surface of the molecule.