



УДК 577.322.6

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ ФЕРРОЛЕГГЕМОГЛОБИНА ЖЕЛТОГО ЛЮПИНА С СО И NO ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 1,8 Å

*Обморова Г. В., Сафонова Т. Н., Тепляков А. В.,
Попов А. Н., Куранова И. И., Арутюнян Э. Г.,
Вайнштейн Б. К.*

*Институт кристаллографии Академии наук СССР,
Москва*

Проведено рентгеноструктурное исследование комплексов ферролеггемоглобина (Lb) желтого люпина с двухатомными лигандами СО и NO. Кристаллические структуры определены при разрешении 1,8 Å и уточнены до $R = 0,18$ Å. Молекула лиганда образует с атомом Fe угол 151° в Lb-CO и 154° в Lb-NO. При этом расстояние от Fe до ближайшего атома лиганда составляет 1,96 Å в Lb-CO и 1,79 Å в Lb-NO. Аналогичные результаты были получены для СО- и NO-комплексов других гемоглобинов. Большой объем гемовой полости в Lb указывает на то, что наклонную геометрию связывания двухатомных молекул в гемоглобинах определяет в первую очередь прямое взаимодействие с гемом, а не с белковым окружением. Связывание СО и NO сопровождается смещением атома Fe в сторону лиганда. В исследованных комплексах атом Fe находится в плоскости гема, что, по-видимому, характерно для низкоспинового состояния ферро-Lb. По сравнению со свободной (дезоксигем) формой Lb в комплексах наблюдается поворот гема относительно белковой части молекулы. Конформационные изменения в глубине в целом незначительны. Локализовано 139 молекул H_2O в Lb-CO и 150 молекул H_2O в Lb-NO. 44 молекулы занимают одинаковые положения в комплексах и, по-видимому, функционально необходимы.

Леггемоглобины — растительные мономерные гемоглобины — осуществляют связывание и перенос молекулярного кислорода в азотфиксирующих клубеньках бобовых растений. Главная отличительная особенность этих белков — высокая скорость образования комплексов с различными лигандами, в том числе с молекулярным кислородом. Кроме того, леггемоглобины способны связывать при физиологических условиях никотиновую кислоту, являющуюся природным регулятором их активности, а также и другие крупные лиганды (насыщенные карбоновые кислоты, нитрозобензол). Указанные функциональные особенности леггемоглобинов определяют интерес к изучению строения этих белков. В настоящее время определены кристаллические структуры двух представителей леггемоглобинов — из клубеньков желтого люпина [1] и сои [2] — соответственно при разрешении 2,0 и 3,5 Å. Последующее изучение методом рентгеноструктурного анализа различных комплексов феррилеггемоглобина (Fe^{3+}) желтого люпина — высокоспинового (с F^-), низкоспиновых (с CN^- и никотинатом) и среднеспиновых (с H_2O и ацетатом), а также дезокси-леггемоглобина (Fe^{2+}) и его низкоспинового комплекса с нитрозобензолом — выявило существенные особенности их структуры [3].

В настоящей статье приводятся результаты структурного исследования комплексов ферролеггемоглобина с карбонилем (Lb-CO) и нитрозидом (Lb-NO).

**Методика уточнения и точность определения
координат атомов**

Структуры Lb-CO и Lb-NO уточнялись по методу Хендриксона — Коннерта [4], включающему минимизацию методом наименьших квадратов разницы между экспериментальными значениями структурных амплитуд, рассчитываемых из интенсивностей рентгеновских отражений, и их теоретическими значениями, рассчитываемыми по координатам атомов мо-

Среднеквадратичные отклонения от идеальной геометрии
в уточненных комплексах Lb-CO и Lb-NO

Расстояния, Å	Число параметров	Lb-CO	Lb-NO
1-2	1248	0,021	0,020
1-3	1700	0,039	0,045
1-4	453	0,047	0,056
Отклонение от плоского строения	1058	0,017	0,021

Примечание: 1-2 — ковалентно связанные атомы; 1-3 — пары атомов, разделенные двумя ковалентными связями; 1-4 — пары атомов, разделенные тремя ковалентными связями.

лекулы белка. В процессе уточнения допускаются такие изменения в координатах атомов, при которых значения межатомных расстояний, валентных и двугранных углов аминокислотных остатков отличаются от их стандартных значений лишь в установленных пределах. Величины среднеквадратичных отклонений от идеальной геометрии, полученные при уточнении комплексов леггемоглобина, приведены в табл. 1. Так как при уточнении кристаллических структур белков учитывается геометрия аминокислотных остатков, погрешность в определении координат атомов не поддается точной оценке и при определении ее величины используются косвенные соображения. Однако на примере многих структур было показано, что погрешность в определении межатомных расстояний при разрешении 1,5–2,0 Å не превышает 0,1 Å, при этом точность определения координат атомов железа равна 0,03–0,04 Å (см., например, [5]).

При уточнении обоих комплексов в качестве исходных использованы координаты дианидной формы феррилеггемоглобина, уточненные при разрешении 2,0 Å [3]. На начальной стадии уточнялись позиционные и тепловые параметры только белковых атомов — вклад лиганда и молекул растворителя не учитывался. В процессе уточнения дважды рассчитывались разностные синтезы электронной плотности с коэффициентами $(2F_o - F_c) \times \exp(i\alpha_c)$, где F_o и F_c — экспериментальные и рассчитанные значения структурных амплитуд, а α_c — рассчитанное значение фазы. По этим синтезам определены координаты атомов лиганда (CO или NO) и молекулы воды. При локализации молекул воды использовалась программа поиска, учитывающая расстояния от молекул воды до атомов белка и других молекул воды (программа написана сотрудником нашей лаборатории Б. В. Строкоцытовым). В процессе уточнения для молекул воды определялись коэффициенты заполнения позиции (их максимальное значение равно 1). В тех случаях, когда значение этого коэффициента было менее 0,25, молекулы воды исключались из последующего рассмотрения. Было локализовано 139 и 150 молекул воды соответственно для Lb-CO и Lb-NO.

Коэффициенты заполнения уточнялись также для лигандов, чтобы установить их возможную пространственную разупорядоченность или возможный переход комплексов в окисленную форму. На заключительной стадии уточнения значения коэффициентов заполнения оказались равными 1,00 для атомов C и N, связанных с атомом Fe, и 1,00 и 0,97 для атомов O соответственно в Lb-CO и Lb-NO (пробное уточнение коэффициентов заполнения для атомов молекулы белка после окончательного уточнения их температурных факторов привело к среднеквадратичному отклонению, равному 0,05, от действительного значения, равного 1 для этих атомов).

Окончательные значения факторов недоверности равны 0,18 для обоих комплексов. Число использованных в уточнении независимых отражений при разрешении 1,8 Å с $I > \sigma$ — около 11 500.

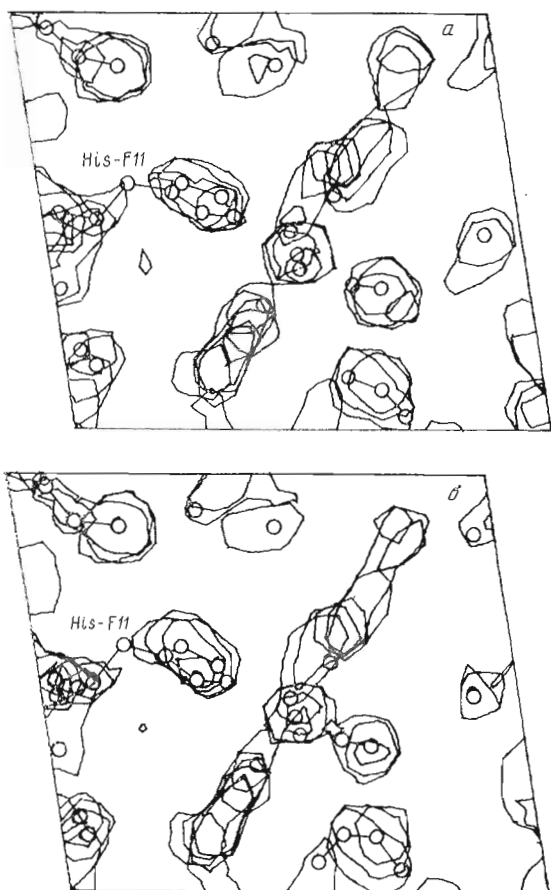


Рис. 1. Фрагменты разностных синтезов электронной плотности с коэффициентами $(2F_o - F_c) \times \exp(i\alpha_c)$ для Lb-CO (а) и Lb-NO (б). Кружками обозначены атомы лиганда, Fe, четыре окружающие его атома N гема, а также атомы близлежащих аминокислотных остатков. Обозначения α -спиралей даны в соответствии с номенклатурой спиралей в структуре миоглобина [6]

Обсуждение результатов

Исходное расположение лиганда, как уже говорилось, определено из разностных синтезов Фурье (рис. 1). При этом предполагалось, что ближайшими к атому Fe и связанными с ним соответственно в комплексах Lb-CO и Lb-NO являются атомы C и N. При уточнении не накладывались ограничения на длину связи Fe-L₁ (L₁-C или N) и на величину угла Fe-L₁-L₂ (L₂ - атом O для обоих лигандов). Стандартное значение длины связи L₁-L₂ принято равным 1,15 (CO) и 1,13 Å (NO).

Параметры связывания лигандов приведены в табл. 2, стереоизображение активного центра обоих комплексов представлено на рис. 2. Значение расстояния Fe-C (1,96 Å) заметно меньше значения, установленного методом рентгеноструктурного анализа в комплексах миоглобина (2,27 Å [7]) и эритрокурурина с CO (2,40 Å [5]). Однако для этих же комплексов получены более точные значения: 1,97 Å для миоглобина (EXAFS-спектроскопия [8]) и 1,8 Å для эритрокурурина (резонансная рамановская спектроскопия [9]). Эти данные хорошо согласуются с нашими. Угол между связью Fe-L₁ и нормалью к плоскости гема, которая рассчитывалась по 24 атомам порфиринового ядра без учета атомов боковых групп, составил 0,6° (Lb-CO) и 8,6° (Lb-NO), а угол Fe-L₁-L₂ - 151 и 154° соответственно. Поскольку оба атома лигандов расположены с одной и той же стороны нормали к гему, проведенной через атом Fe,

Стереохимические параметры активного центра комплексов ферро-Лб

Параметры	Дезокси-Лб	Лб с нитрозо-бензолом	Лб-СО	Лб-NO
Расстояния, Å				
Fe-L ₁	—	2,22	1,95	1,79
Fe-N ^{e2}	2,25	2,30	2,27	2,20
(Fe-N) *	2,05	2,05	2,02	2,02
Fe-N ⁴	1,94	1,93	1,79	1,87
ΔFe ^{2*}	0,08	0	0,02	0,03
ΔC _{MI} ^{3*}	0,13	0,18	0,27	0,20
Углы, град				
Fe-L ₁ -L ₂	—	—	151	154
L ₂ -L ₁ -Fe-N ⁴	—	—	-65	-77
C ^{e1} -N ^{e2} -Fe-N ¹	-55	-60	-60	-60

* Среднее расстояние от атома Fe до всех атомов N гема.

^{2*} Смещение атома Fe из средней плоскости гема, определенной по 24 атомам порфиринового ядра, в сторону проксимального His.

^{3*} Среднее смещение атомов C метиновых групп гема из той же плоскости.

можно сделать вывод, что двухатомные лиганды СО и NO связываются с атомом Fe в соответствии с моделью Полинга [10].

В карбонилсодержащих соединениях железа наблюдается линейная координация СО-группы. В противоположность этому в карбонильных комплексах гемоглобинов угол Fe-C-O составляет 150° [5, 7]. В этих комплексах молекула лиганда окружена боковыми группами аминокис-

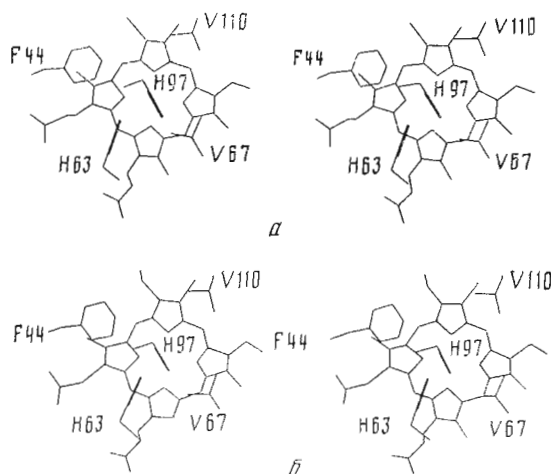


Рис. 2. Стереоизображение активного центра в Лб-СО (а) и Лб-NO (б). Номера остатков соответствуют сплошной нумерации всех остатков белка, начиная с N-конца

лотных остатков, которые, по-видимому, вынуждают формирование не свойственной карбонильным комплексам наклонной координации. Аналогичная картина наблюдается и в изученных комплексах леггемоглобина с группами СО и NO, где лиганды очень плотно окружены боковыми группами белка. Однако такое объяснение в отношении леггемоглобинов является недостаточным. Относительная подвижность элементов структуры молекулы белка допускает возможность образования комплексов и в ферро-, и в ферриостояниях с такими крупными лигандами, как никотиновая кислота и нитрозобензол, при этом плоскости ароматических колец лигандов располагаются перпендикулярно к плоскости гема. Поэтому

линейная координация двухатомных лигандов могла бы быть вполне приемлемой. По-видимому, наклонная геометрия характерна вообще для всех двухатомных лигандов, комплексующихся с атомом Fe. Исключение в этом отношении составляет, вероятно, структура оксидэритрохруора, в которой угол Fe-O-O составляет 171° .

Наиболее короткие контакты с атомами O лигандов установлены для N² дистального гистидина (3,4 и 3,3 Å) и C¹⁴ дистального валина (3,4 и 3,8 Å) — соответственно в Lb-CO и Lb-NO*. Некоторое различие в пространственном положении лигандов проявляется в отношении к связям Fe-N четырех пиррольных колец порфирина. Если в Lb-NO плоскость Fe-L₁-L₂ практически совпадает с линией Fe-N², составляя с ней угол 12° , то в Lb-CO этот угол равен 30° .

Плоскость имидазольного кольца проксимального гистидина в обоих комплексах не изменила положения по сравнению с дезокси-Lb. Нормаль к этой плоскости образует угол 11° с биссектрисой угла N¹-Fe-N⁴ (в табл. 2 приведены значения торсионных углов C³¹-N²-Fe-N¹). Значения длины связи Fe-N² равны 2,3 и 2,2 Å соответственно в Lb-CO и Lb-NO.

Связывание лигандов сопровождается движением атома Fe в сторону порфиринового ядра. Если в дезокси-Lb атом Fe расположен с проксимальной стороны на расстоянии 0,08 Å [3] от плоскости гема, то в исследуемых комплексах эта величина равна 0,02 и 0,03 Å соответственно в Lb-CO и Lb-NO. Поскольку величина смещения атома Fe меньше экспериментальной погрешности, то можно считать, что он находится в плоскости гема — так же, как и в ферропроизводном Lb с нитрозобензолом [3] (табл. 2). По-видимому, вхождение атома Fe в плоскость гема характеризует переход ферро-Lb из высокоспинового в низкоспиновое состояние. Необходимо отметить несимметричное положение атома Fe относительно атомов N гема. В обоих комплексах длина связи Fe-N⁴ (1,79 и 1,87 Å в Lb-CO и Lb-NO соответственно) значительно меньше среднего значения длин связи Fe-N — 2,03 и 2,02 Å.

При исследовании кристаллической структуры Lb [3] было установлено неплоское строение гема, свидетельствующее о нарушениях в системе сопряженных π -взаимодействий между атомами порфиринового кольца. Как оказалось, степень гофрированности гема — поворота пиррольных колец вокруг линий, проходящих через противоположные атомы азота (N¹-N³ или N²-N⁴), зависит только от валентного и спинового состояния атома Fe и не зависит от геометрических размеров лиганда [3]. О величине этого поворота можно судить по смещению мостиковых атомов C пиррольных колец — смещение в 0,3 Å соответствует наклону пиррольных колец к «средней» плоскости гема на 6° [12]. В исследуемых ферропроизводных Lb средняя величина смещения метиновых атомов C оказалась равной 0,27 Å в Lb-CO и 0,20 Å в Lb-NO (рис. 3). В дезокси-Lb и его нитрозобензольном комплексе эти значения равны 0,13 и 0,18 Å соответственно. Можно считать по аналогии с феррипроизводными Lb, что наибольшее возмущение в электронную систему гема вносит связывание группы CO.

В молекуле дезокси-Lb остатки пропионовых кислот гема обращены в одну и ту же дистальную сторону, прикрывая полость гемового кармана. При этом карбоксильная группа остатка пропионовой кислоты пиррольного кольца IV сближена с атомом N⁶ Lys-E10**. В комплексах Lb-CO и Lb-NO этот остаток разворачивается в проксимальную сторону и ионная пара с остатком лизина формируется лишь одним из атомов O.

При связывании лигандов в молекулах гемоглобинов происходят конформационные изменения, причем они затрагивают как боковые группы отдельных аминокислотных остатков, так и элементы вторичной структуры и гем в целом. Чтобы установить относительные перемещения элементов структуры Lb в исследуемых комплексах, была проведена сле-

* Здесь и далее обозначения атомов даны согласно номенклатуре IUPAC-IUB от 1969 г. [11].

** Здесь и далее обозначения даны в соответствии с номенклатурой спиралей в структуре миоглобина [6].

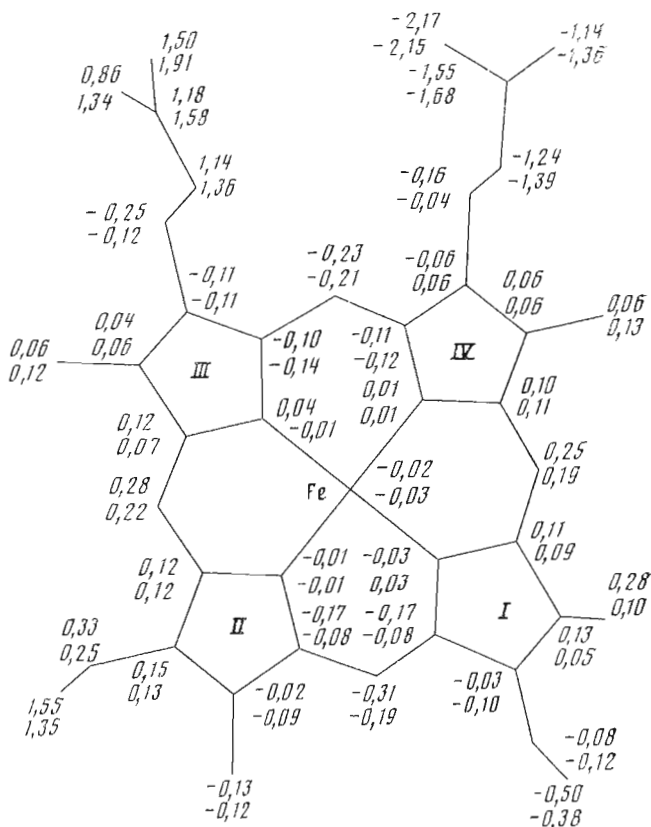


Рис. 3. Отклонения атомов гема (Å) от средней плоскости, рассчитанной по 24 атомам порфиринового ядра, в Lb-Co (верхние цифры) и Lb-NO (нижние цифры)

дующая расчетная процедура. Вводилась новая ортогональная система координат, увязанная с группой гема. Чтобы исключить изменения в самой группе гема и относительно положении атома Fe, рассчитывалось положение средней плоскости гема по атомам порфиринового кольца в кристаллографической системе координат. Проекция атома Fe на эту плоскость выбрана в качестве начала координат, ось X направлена в сторону атома N первого пиррольного кольца гема, а ось Y — перпендикулярно оси X в сторону атома N второго пиррольного кольца, ось Z — перпендикулярно осям X и Y в сторону атома N^{ε2} проксимального гистидина. Далее с использованием координат атомов C^α аминокислотных остатков методом наименьших квадратов рассчитывались уравнения осей α-спиралей. Отрезки, соответствующие спиральям, определялись проекциями первого и последнего C^α-атомов данной спирали на эту ось (рис. 4). Смещение α-спиралей относительно гема по вертикали характеризуется z-координатами середины таких отрезков (табл. 3). Из рисунка и данных таблицы, видно, что изменения в структуре дезокси-Lb при связывании обоих лигандов имеют сходный характер. Эти изменения можно определить поворотом белковой части молекулы вокруг линии, проходящей через атом Fe параллельно проекции оси спирали B, причем величина поворота больше в Lb-Co. Очевидно, относительные перемещения гема и белковой части молекулы можно охарактеризовать поворотом самого гема в противоположном направлении. Следует отметить, что сама возможность общего описания изменений в относительном положении белковой части молекулы Lb и гема указывает на относительную жесткость белковой части молекулы.

Анализ изменений в строении молекулы дезокси-Lb при образовании комплексов Lb-Co и Lb-NO проводился после совмещения сравниваемых

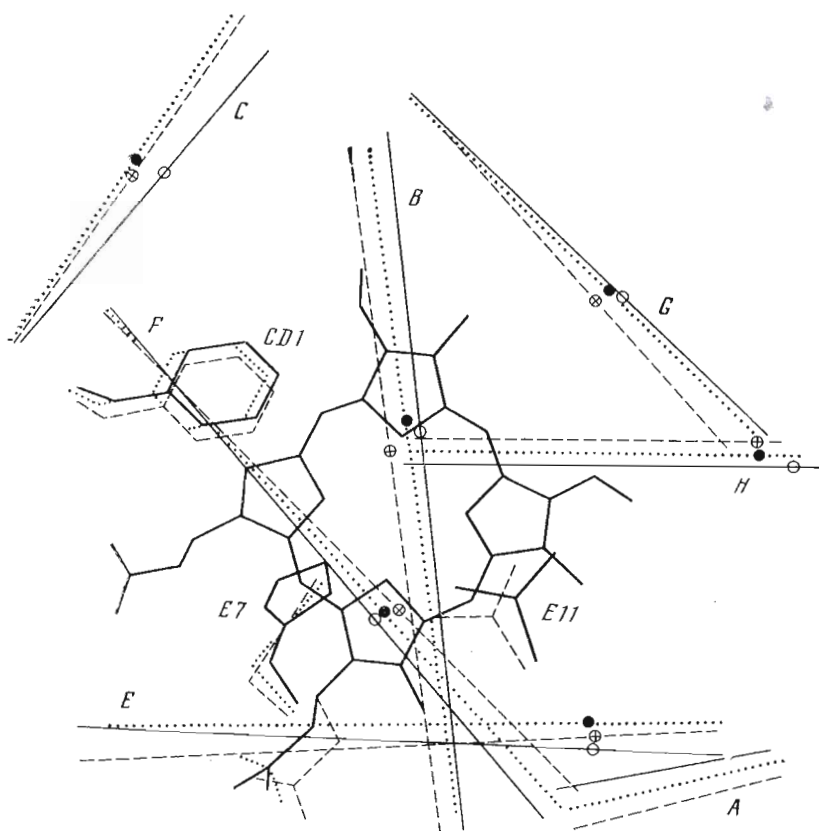


Рис. 4. Расположение осей α -спиралей (середины спиралей обозначены кружками) в структурах дезокси-Lb (сплошные линии, незаполненные кружочки), в комплексах Lb-CO (штриховые линии, перечеркнутые кружочки) и Lb-NO (пунктирные линии, закрашенные кружочки) при совмещении групп гема

молекул друг с другом методом наименьших квадратов с использованием координат C^α -атомов.

В табл. 4 представлены данные по среднеквадратичным отклонениям в координатах атомов сравниваемых структур после такого совмещения. Из этих данных следует, что наиболее подвижным в молекуле является N-концевой участок, где различие в положении даже C^α -атомов превышает 0,6 Å. Это связано с тем, что все три остатка, образующих этот участок, находятся на поверхности и подвижны. Различия в координатах C^α -атомов для спирали F, переходного участка CD и группы гема, превышающие среднюю величину отклонений по всей молекуле белка (0,21 Å для обоих комплексов), могут быть связаны непосредственно с присоединением лигандов. При изучении феррикомплексов Lb было установлено, что в них по сравнению с дезокси-Lb группа гема смещается в сторону F-спирали [3]. Причем при переходе от высокоспиновых соединений к низкоспиновым степень этого смещения увеличивалась, достигая для низкоспиновых никотинатного и цианидного комплексов величины 0,41 и 0,22 Å [3] соответственно. Данные табл. 3 не выявляют столь сильных смещений при переходе к низкоспиновому состоянию двухвалентного атома Fe. Изменения в расстояниях от центров спиралей E и F до плоскости гема не превышают 0,1 Å.

На рис. 4 указаны положения наиболее важных в функциональном отношении боковых групп белка: проксимального и дистального гистидинов, а также дистальных Phe-CD1 и Val-E11. Изменения в положении двух последних групп при связывании лигандов можно описать тем же поворотом, что и для молекулы в целом. Однако имидазольное кольцо дистального His-E7 в комплексах дополнительно к этому повернуто вокруг связи $C^\beta-C^\gamma$ на угол 30° таким образом, что его плоскость распо-

Расстояния от середин α -спиралей комплексов до плоскости гема, определенной по 24 атомам порфиринового кольца (Å)

Спираль	Дезокси-Lb	Lb-CO	Lb-NO	Спираль	Дезокси-Lb	Lb-CO	Lb-NO
A	-10,9	-11,4	-11,2	F	8,1	8,2	8,0
B	-13,9	-14,0	-13,8	G	-7,4	-8,0	-7,6
C	-5,0	-5,0	-4,8	H	2,0	1,5	1,8
E	-4,4	-4,3	-4,4				

Таблица 4

Среднеквадратичные отклонения (Å) в координатах C^α -атомов (1) и всех атомов молекулы белка (2) в структурах комплексов Lb-CO и Lb-NO при совмещении их с дезокси-Lb

Комплекс		Спирали							Межспиральные переходы					Гем	Среднее по молекуле
		A	B	C	E	F	G	H	NA *	CD	EF	FG	GH		
Lb-CO	1	0,17	0,16	0,17	0,19	0,22	0,18	0,21	0,63	0,26	0,19	0,14	0,10	0,30	0,21
	2	0,31	0,28	0,32	0,35	0,51	0,38	0,47	0,87	0,50	0,33	0,26	0,26	—	—
Lb-NO	1	0,19	0,18	0,17	0,18	0,23	0,16	0,17	0,61	0,26	0,12	0,17	0,21	0,19	0,21
	2	0,34	0,30	0,38	0,39	0,44	0,44	0,42	0,70	0,59	0,30	0,25	0,26	—	—

* Участок полипептидной цепи от N-конца до начала спирали A.

лагается перпендикулярно плоскости гема. С другой стороны, положение имидазольного кольца проксимального His-F11 по отношению к атому Fe и связям Fe-N металлоцикла, как и следовало ожидать, изменяется незначительно.

Анализ изменений в положении боковых групп белка при переходе от структуры дезокси-Lb к структурам комплексов показывает, что они в наибольшей степени затрагивают группы, расположенные на поверхности молекулы. При этом довольно часто происходит разрыв одних водородных связей и солевых мостиков и формирование других (табл. 5). Этот вывод справедлив также в отношении аминокислотных остатков, контактирующих с гемом, у которого остаток пропионовой кислоты обращен уже не в дистальную, а в проксимальную сторону. Вместе с тем большие отклонения установлены и для групп, контактирующих с молекулой лиганда (Phe-CD4, Val-E11).

Для характеристики вторичной структуры комплексов исследовалась возможность образования водородных связей. Рассматривались случаи, когда расстояния между атомами, которые могут образовывать водородную связь, находились в интервале 2,2–3,6 Å. Системы таких контактов в дезокси-Lb и комплексах Lb-CO и Lb-NO весьма близки. Основные различия представлены в табл. 5.

По разностным синтезам, которые рассчитывались в ходе уточнения, в Lb-CO и Lb-NO было локализовано соответственно 139 и 150 молекул растворителя. В расчет принимались лишь те пики электронной плотности, расстояние от которых до атомов молекулы белка было не менее 2,2 Å. Анализ расстояний от молекул воды до атомов белка показал, что в этих комплексах находится соответственно 93 и 102 молекулы воды, расположенные на расстояниях, меньших 3,6 Å. Таким образом, около $\frac{2}{3}$ общего числа молекул воды образуют первый гидратный слой, непосредственно контактирующий с молекулой белка. В это число могут быть включены еще 26 и 24 молекулы воды, находящиеся на расстояниях, меньших 5,0 Å. Как видно из табл. 6, характеризующей гидратные оболочки обоих комплексов, наибольшее число молекул воды образует по 2–4 водородные связи (57 и 55% в Lb-CO и Lb-NO). 44 молекулы

Основные различия в системе водородных связей в дезокси-Lb, Lb-CO и Lb-NO (расстояния даны в Å)

Контакт	Дезокси-Lb	Lb-CO	Lb-NO
(Gly-NA1)O...N ^{ε2} (Gln-A4)	—	3,4	3,6
(Glu-A2)O ^{ε1} ...O ^{ε2} (Glu-E23)	—	—	3,3
(Lys-A9)N ^ε ...O ^{ε2} (Glu-A13)	3,4	—	—
(Glu-A14)O ^{ε2} ...O(Val-G19)	—	—	3,4
(Arg-B8)N ^{η1} ...O ^{ε2} (Glu-G18)	—	3,0	3,1
(Lys-C5)N ^ε ...N(Gly-CD6)	3,5	—	—
(Lys-C5)N ^ε ...O(Leu-CD4)	2,7	—	2,9
(Val-CD10)O...N ^{ε2} (Gln-CD12)	—	3,4	2,9
(Lys-E10)N ^ε ...O1(IV) (rem)	2,9	—	—
(Asp-F1)O...N ^ε (Lys-F5)	—	—	3,1
(Lys-F5)N ^ε ...O ^{ε1} (Glu-H22)	—	3,5	—
(Asn-F6)O ^{δ1} ...O ^γ (Ser-F9)	—	2,8	3,2
(Asn-F6)O...O ^γ (Ser-F9)	—	2,2	2,7
(Glu-G10)O ^{ε1} ...N ^ε (Lys-G14)	—	3,6	3,1
(Glu-G10)O...N ^ε (Lys-G14)	—	3,1	3,4
(Val-H18)O...O ^{ε2} (Glu-H22)	—	3,5	—

Таблица 6

Распределение молекул воды по группам в зависимости от числа образованных ими водородных связей

Число H-связей	Lb-CO		Lb-NO	
	число молекул H ₂ O	(V) * (Å ³)	число молекул H ₂ O	(V) * (Å ³)
0	26	41,2	16	37,5
1	28	34,8	44	38,5
2	34	33,5	28	32,7
3	34	28,3	43	30,8
4	11	27,9	11	31,4
5	3	26,9	4	21,8
6	3	17,8	3	17,3
7	—	—	1	15,3

* Среднее значение теплового фактора молекул.

воды (что составляет соответственно 32 и 29%) являются общими в структурах обоих комплексов — при совмещении молекул комплексов по C^α-атомам расстояния между этими молекулами меньше 1 Å. При этом 42 из них находятся в первом гидратном слое.

Экспериментальная часть

Исходным материалом для получения комплексов Lb-CO и Lb-NO служили кристаллы комплекса леггемоглобина с ацетатом. Выращенные по методу, описанному ранее [13], кристаллы ацетат-Lb переводили в H₂O-Lb выдерживанием в течение 2 сут в 0,2 М фосфатном буфере, содержащем 60% (NH₄)₂SO₄.

Всю дальнейшую работу проводили в атмосфере аргона. Растворы готовили на воде, перегнанной в токе аргона. Для поглощения следов кислорода аргон пропускали через щелочной раствор пирогаллола.

Оксид углерода получали нагреванием смеси щавелевой и серной кислот по методике [14]. Оксид азота получали по методике Тиле [15]. Кристаллы H₂O-Lb переводили в дезоксиформу выдерживанием в 0,01 М растворе цитрата железа [3] в течение 20 ч.

Для получения кристаллического комплекса Lb-CO кристаллы дезокси-Lb переносили в рентгеновский капилляр, который помещали в ток СО на 20 мин. Для получения комплекса Lb-NO кристаллы дезокси-Lb помещали на 2 ч в 0,2 М фосфатный буфер, pH 6,0, содержащий 60% раствор (NH₄)₂SO₄. Буфер предварительно насыщали оксидом азота в течение 40 мин при 0°С. Кристаллы запаковывали в рентгеновский капилляр над этим раствором. Чтобы избежать закисления раствора при насыщении NO, контролировали pH конечного раствора и при необходимости добавляли 0,1 М раствор NaOH. Спектры растворов после съемки на дифрактометре

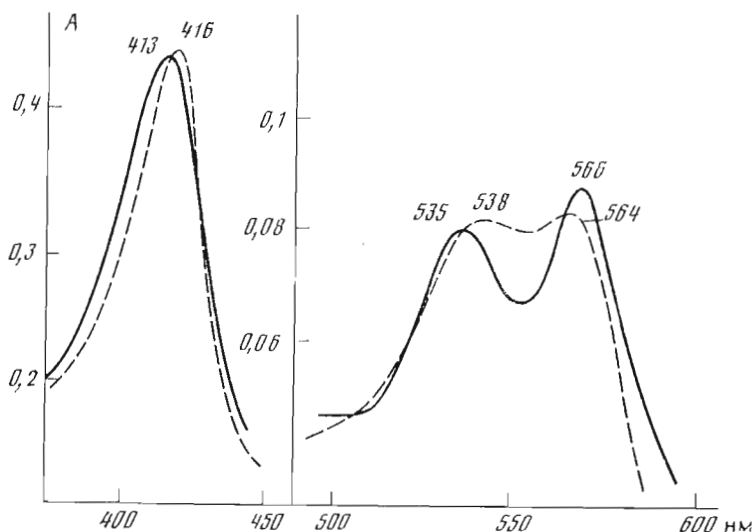


Рис. 5. Спектры поглощения комплексов Lb-CO (штриховая линия) и Lb-NO (сплошная линия), полученные после растворения использованных в дифракционных измерениях кристаллов

кристаллов комплексов Lb (рис. 5) не выявили сколько-нибудь заметного их разрушения, так как практические не отличаются от таких же спектров, снятых до проведения рентгеновского эксперимента.

Получение экспериментальных наборов рентгеновских отражений. Наборы дифракционных данных для кристаллов комплексов Lb-CO и Lb-NO были получены на дифрактометре КАРД-3 с двумерной многокитевой пропорциональной камерой [16]. Детектор был установлен на расстоянии 330 мм от кристалла, что обеспечило необходимое угловое разрешение. При этом разрешение съемки составило 1,8 Å. Во время съемки детектор и источник излучения оставались неподвижными, интегральные интенсивности измерялись при непрерывном сканировании кристалла вокруг оси ω со скоростью 0,6 град/мин. Полный оборот кристалла занимал 10 ч и позволял регистрировать две независимые области обратного пространства исследуемого кристалла, что составляет около 27 000 отражений. Использовалась отпаивная трубка БСВ-23 с медным анодом и графитовый монохроматор. Каждый набор был получен с одного кристалла. Полнота набора определялась размерами слепой зоны и количеством отбракovaných отражений при больших углах падения на детектор. В зоне разрешения до 1,8 Å собрано 77% от теоретического количества отражений, при этом в зоне до 2,0 Å — 88% отражений, а в зоне от 2,0 до 1,8 Å — 45%. Основные характеристики дифракционного эксперимента представлены в табл. 7. При расчете струк-

Таблица 7

Результаты дифракционного эксперимента

Характеристики наборов дифракционных данных	Lb-CO	Lb-NO
Количество отражений, %		
с $I > \sigma$	71	69
с $I > 3\sigma$	44	42
$R_{\text{стат}} = \sum \sigma / \sum I$	7,0	8,8
$R_{\text{сим}} = \sum I - \langle I \rangle / \sum I$	7,1	9,9

турных амплитуд вносились поправки на факторы Лорентца, поляризации и поглощение по методу Норта — Филлипса [17]. Расчеты выполнены на ЭВМ NORD-500 в Институте кристаллографии АН СССР по программам комплекса БЛАНК А. А. Вагина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аругюнян Э. Г., Куранова И. П., Вайнштейн Б. К., Штайгеманн В. Р. // Кристаллография. 1980. Т. 25. № 1. С. 80–103.
2. Guss M., Freemann H. // Austral. J. Chem. 1983. V. 36. № 3. P. 451–468.
3. Аругюнян Э. Г., Дайзенхофер Й., Тепляков А. В., Куранова И. П., Обмолова Г. В., Вайнштейн Б. К. // Докл. АН СССР. Сер. Биохимия. 1983. Т. 270. № 3. С. 732–736.

4. Hendrickson W. A., Konnert S. H. // Biomolecular structure, conformation, function and evolution. V. 1/Ed. Srinivasan R. Oxford: Pergamon Press, 1979. P. 47-51.
5. Steigemann W., Weber E. // J. Mol. Biol. 1979. V. 127. P. 309-338.
6. 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.
7. Kuriyan J., Wilz S., Karplus M., Petsko G. A. // J. Mol. Biol. 1986. V. 192. № 1. P. 133-154.
8. Powers L., Sessler J. L., Woolery G. L., Chance B. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 5519-5523.
9. Ju N.-T., Benko B., Kerr E. A., Gersonde K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 1. P. 5106-5110.
10. Pauling L. // Nature. 1964. V. 203. P. 182-183.
11. Biochemistry. 1970. V. 9. P. 3471-3503.
12. Арутюнян Э. Г. // Докл. АН СССР. Сер. Биохимия. 1980. Т. 252. С. 1264-1268.
13. 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.
14. Карякин Ю. В. Чистые химические реактивы. М.: Наука, 1947. С. 522.
15. Карякин Ю. В. Чистые химические реактивы. М.: Наука, 1947. С. 18.
16. Андрианова М. Е., Попов А. Н., Хейкер Д. М., Заневский Ю. В., Иванов А. Б., Пешехонов В. Д., Черненко С. П. // Докл. АН СССР. Сер. Физика. 1986. Т. 288. № 1. С. 122-125.
17. North A. G., Phillips D. C., Matthews F. S. // Acta crystallogr. 1968. V. A24. P. 351-353.

Поступила в редакцию
1.III.1988

После доработки
30.V.1988

X-RAY STRUCTURE OF FERROUS COMPLEXES OF THE YELLOW LUPIN LEGHEMOGLOBIN WITH CO AND NO AT 1.8 Å RESOLUTION

OBMOLOVA G. V., SAFONOVA T. N., TEPLYAKOV A. V., POPOV A. N.,
KURANOVA I. P., HARUTYUNYAN E. G., VAINSHTEIN B. K.

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

Structures of CO and NO complexes of [Fe(II)] leghemoglobin from yellow lupin have been solved by X-ray diffraction at 1.8 Å resolution. Both models were refined by a restrained parameter least-squares procedure to a *R* factor of 0.18. The CO and NO ligands are distorted from the linear conformation seen in model compounds; Fe-C-O and Fe-N-O angles are 151 and 154°, respectively. Similar results were obtained for CO and NO complexes of other hemoglobins. The large volume of the heme pocket in leghemoglobin suggests that the ligand's bent binding geometry is largely determined by its direct interaction with the heme rather than with the protein environment. The binding of the ligands causes a shift of the iron towards the ligand into the plane of the heme and the rotation of the heme relative to the globin. No significant structural changes in the globin are observed.