



УДК 547.963.4-162.3

© 1991 г.

*Т. Н. Сафонова, А. В. Тепляков, Г. Б. Обмолова,
А. Н. Попов, И. П. Куранова, Э. Г. Арутюнян*

**КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА
ФЕРРИЛЕГГЕМОГЛОБИНА
ЖЕЛТОГО ЛЮПИНА С ИЗОХИНОЛИНОМ ПРИ РАЗРЕШЕНИИ 1,8Å**

Институт кристаллографии АН СССР, Москва

Комплекс леггемоглобина (Lb) с изохинолином (Lb-IQ) представлял интерес с точки зрения возможности размещения крупного лиганда в гемовом кармане. Проведено уточнение комплекса (разрешение 1,8 Å) до R 0,18. Наблюдается наклонное расположение лиганда, угол между плоскостями лиганда и гема 104°. По-видимому, наклонное расположение лиганда обусловлено размерами полости гемового кармана. Ближайшим к атому Fe гема оказался не атом N лиганда, как это предполагалось, а атом C (расстояние Fe-C 1,7 Å). Имидазольное кольцо проксимального гистидина не изменило свое положение по сравнению с дезоксилеггемоглобином. Как в дезокси-Lb, так и в Lb-IQ атом Fe расположен с проксимальной стороны гема на расстоянии 0,08 Å от плоскости гема. Конформационные изменения, возникающие в результате присоединения лиганда, приводят к некоторым изменениям в системе водородных связей. Локализовано 166 молекул воды.

Настоящая работа — продолжение исследований комплекса леггемоглобина (Lb) желтого люпина с различными лигандами. Ранее методом рентгеноструктурного анализа был изучен ряд комплексов [1–3] ферро- и феррилеггемоглобина. Феррикомплекс леггемоглобина с изохинолином представляет интерес главным образом из-за крупного размера лиганда.

При уточнении структуры комплекса леггемоглобина с изохинолином (Lb-IQ) в качестве исходной была использована атомная модель комплекса феррилеггемоглобина с никотинаминовой кислотой, ранее уточненная при разрешении 2,0 Å [1]. В расчет включались структурные амплитуды отражений, интенсивности которых превышали 3σ (всего 9048 отражений). Попытка начать уточнение по методу Хендриксона — Коннерта [4] не привела к положительному результату. Поэтому было проведено по 3 цикла уточнения молекулы белка как жесткого тела по данным с разрешением 6,0–4,0 и 5,0–3,0 Å по программе Corels [5]. Последующее уточнение выполнено по методу Хендриксона — Коннерта (табл. 1).

На начальной стадии, которая включала 39 циклов, уточнялись позиционные и тепловые параметры только белковых атомов. Координаты атомов молекулы изохинолина, координированной с атомом Fe, и молекул воды определялись по разностным синтесам 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, α_c — рассчитанное значение фазы. При локализации молекул воды использовалась программа их поиска по максимумам электронной плотности. Максимумы интерпретируются как молекулы воды, если расстояния до атомов белка и других молекул воды не меньше 2,2 Å (программа написана сотрудником нашей лаборатории Б. В. Строкопытовым). В процессе уточнения для молекул лиганда и воды уточнялись как температурные факторы, так и коэффициенты заполнения. В тех случаях, когда значение коэффициента было менее 0,25 или значение температурного фактора было более 60 Å²,

Ход уточнения для комплекса Lb с изохинолином

Таблица 1

Ход уточнения	Число циклов	Разрешение, Å	Количество отражений	Количество уточняемых параметров	R-фактор
Исходные значения	—	5,0–3,5	1317	3661	0,31
Уточнение общего температурного фактора	27	5,0–2,0	8562	3661	0,26
Уточнение индивидуальных температурных параметров	12	5,0–2,0	8562	4880	0,21
Введение H ₂ O и лиганда	70	5,0–1,8	9048	5612	0,18

Таблица 2

Среднеквадратичные отклонения (Δ) от идеальной геометрии в уточненном комплексе

Расстояния *	Число параметров	Δ , Å
Расстояния 1–2	1257	0,026
Расстояния 1–3	1712	0,061
Расстояния 1–4	465	0,068
Отклонение от плоского строения	1059	0,021

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

молекулы воды исключались из последующего рассмотрения. В результате было локализовано 166 молекул воды.

Пространственное расположение молекулы изохинолина (см. ниже) не дает указаний на месторасположение атома N, поэтому при уточнении все атомы молекулы лиганда были приняты за атомы C. Уточнение их коэффициентов заполнения и температурных поправок (их окончательные значения приведены на рис. 1) также не дает возможности однозначно установить положение атома N. Во всех тех позициях, которые могут отвечать этому атому, коэффициенты заполнения были ниже (а температурные поправки выше) или равны таковым для тех атомов, которые, исходя из формулы соединения, достоверно заняты атомами C. Можно установить лишь следующую закономерность для этих величин: атомы молекулы изохинолина, находящиеся внутри гемового кармана, характеризуются большими значениями коэффициентов заполнения и меньшими значениями температурных поправок. Поскольку положение 7 оказалось сближенным с N⁶ дистального гистидина E7^{*}, возможно, что именно оно занято атомом N. Коэффициенты заполнения для атомов молекулы изохинолина на заключительной стадии уточнения лежат в интервале 0,7–1,0.

При проведении уточнения по методу Хендриксона — Коннерта допускались такие изменения в координатах атомов, при которых значения межатомных расстояний, валентных и двугранных углов аминокислотных остатков отличались от их стандартных значений лишь в установленных пределах (табл. 2). Ограничения на длину связи между атомом Fe и атомами молекулы изохинолина при уточнении не накладывались. Окончательное значение фактора недостоверности R равно 0,18.

Наибольший интерес в исследовании структуры комплекса леггемоглобина с изохинолином представлял способ связывания этого лиганда.

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

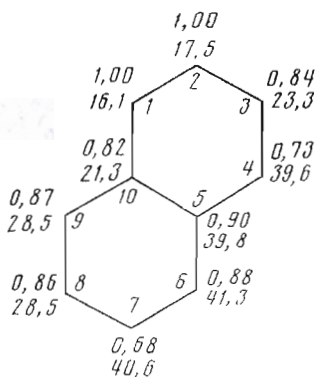


Рис. 1

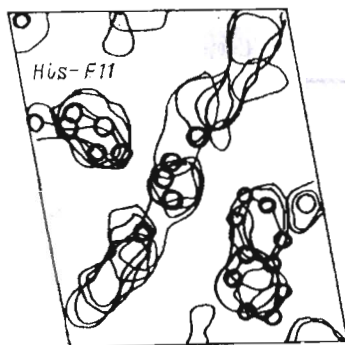


Рис. 2

Рис. 1. Коэффициенты заполнения (верхние цифры) и температурные факторы (нижние цифры, Å²) лиганда

Рис. 2. 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, а также атомы близлежащих аминокислотных остатков. Обозначения α -спиралей даны в соответствии с номенклатурой спиралей в структуре миоглобина [6]

Естественно было предположить образование связи между атомом Fe гема и атомом N изохинолинового цикла. Такое допущение подтверждалось также тем обстоятельством, что хинолин в отличие от изохинолина не связывается с белком. Действительно, связывание молекулы хинолина аналогичным способом (через атом N) приводило бы к недопустимой близости атома C молекулы хинолина с атомами гема. Выяснилось, однако, что связывание молекулы изохинолина имеет более сложный характер.

На рис. 2 приведен участок разностного синтеза электронной плотности на дистальной стороне гема. Форма максимума электронной плотности, примыкающего к атому Fe гема, позволяет однозначно ориентировать молекулу изохинолина. При этом в наибольшей близости от атома Fe (1,71 Å) оказывается атом в положении 1, который может быть только атомом углерода. Ближайшее положение 2 изохинолинового цикла, которое может быть занято атомом N, оказывается на значительно большем расстоянии от атома Fe (2,85 Å). Расстояния от атома Fe до позиций 3, 7 и 8 равны соответственно 4,1, 5,3 и 4,8 Å. Таким образом, следует допустить возможность существования в исследуемом комплексе трехцентровой связи между атомом Fe гема и атомами C в положении 1 и N в положении 2. Нельзя исключить также возможность расположения атома N в удаленном от атома Fe положении 7, поскольку в этом случае, как уже указывалось, возможно образование водородной связи между молекулой лиганда и имидазольным кольцом дистального гистидина.

Параметры связывания молекулы изохинолина приведены в табл. 3. Угол между плоскостью лиганда и плоскостью гема, проведенной через 24 атома порфиринового ядра, составляет 104° в отличие от комплексов легтемоглобина с такими крупными лигандами, как никотиновая кислота и нитрозобензол, в которых плоскости ароматических колец лигандов располагаются перпендикулярно плоскости гема. По-видимому, наклонное расположение изохинолина обусловлено размерами полости гемового кармана.

Самый короткий контакт лиганд имеет с атомом C* Phe-30 (2,95 Å). Плоскость имидазольного кольца проксимального гистидина (His-F11) не изменила положения по сравнению с дезокси-Lb (в табл. 3 приведены значения торсионных углов C^{e1}-N^{e2}-Fe-N¹). Длина связи Fe-N^{e2} - 2,26 Å.

* Здесь и далее обозначения атомов даны согласно номенклатуре IUPAC - IUB от 1969 г. [7].

Стереохимические параметры активного центра

Параметры	Lb-IQ	Дезокси-Lb
Расстояния, Å		
Fe-L ₁	1,71	—
Fe-N ^{ε2}	2,26	2,27
(Fe-N) *	2,00	2,07
Fe-N ⁴	1,93	1,86
ΔFe **	0,08	0,06
ΔC _M ***	0,39	0,14
Углы, град		
C ^{ε1} -N ^{ε2} -Fe-N ¹	-56	-55

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

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

*** Среднее смещение атомов C метиновых групп гема на той же плоскости.

Таблица 4

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

Спираль	Дезокси-Lb	Lb-IQ	Спираль	Дезокси-Lb	Lb-IQ
A	-10,7	-10,8	F	-8,0	-7,9
B	-13,9	-13,8	G	-7,3	-7,4
C	-5,0	-4,8	H	2,2	2,2
E	-4,3	-4,3			

Как в дезокси-Lb, так и в Lb-IQ атом Fe расположен с проксимальной стороны на расстоянии 0,08 Å от плоскости гема. Следует отметить несимметричное положение атома Fe относительно атомов N гема. Длина связи Fe-N⁴, равная 1,93 Å, меньше среднего значения длин связей Fe-N (2,00 Å), однако различия в длинах связей Fe-N в комплексе Lb-IQ меньше, чем в дезокси-Lb (разница между средним значением Fe-N и Fe-N⁴ 0,07 и 0,21 Å в Lb-IQ и дезокси-Lb соответственно).

При исследовании структуры Lb [1] было установлено неплоское строение гема, свидетельствующее о нарушениях в системе сопряженных π-взаимодействий между атомами порфиринового кольца. Степень гофрированности гема — поворота пиррольных колец вокруг линий, проходящих через противоположащие атомы азота (N¹-N³ или N²-N⁴), — зависит только от валентного и спинового состояния атома Fe и не зависит от геометрических размеров лиганда. О величине этого поворота можно судить по смещению мостиковых атомов C_M пиррольных колец — смещение в 0,03 Å соответствует наклону пиррольных колец к «средней» плоскости гема на 6° [8]. В комплексе Lb-IQ средняя величина смещения метиновых атомов C 0,39 Å (рис. 3). В дезокси-Lb и его нитрозобензольном комплексе эти значения равны 0,14 и 0,18 Å соответственно. Углы между плоскостями пиррольных колец и плоскостью гема от 8 до 12°.

В молекуле дезокси-Lb остатки пропионовых кислот гема обращены в одну и ту же сторону (в сторону дистального His), прикрывая полость гемового кармана. При этом карбоксильная группа остатка пропионовой кислоты IV пиррольного кольца сближена с атомом N^ε Lys-E10. В комплексе Lb-IQ этот остаток пропионовой кислоты смещен в проксимальную сторону.

При связывании лигандов в молекулах леггемоглобина происходят конформационные изменения, причем они затрагивают как боковые группы отдельных аминокислотных остатков, так и элементы вторичной структуры и гем в целом. Чтобы установить относительные перемеще-

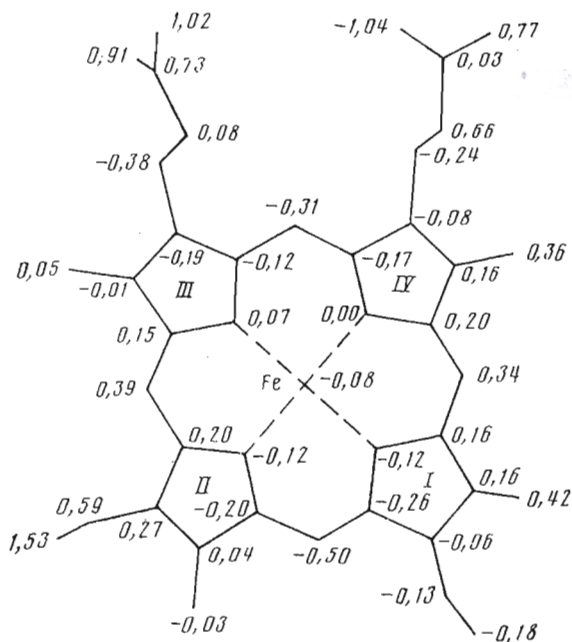


Рис. 3. Отклонения атомов гема в Lb-IQ (Å) от средней плоскости, рассчитанной по 24 атомам порфиринового ядра

ния элементов структуры, была проведена следующая расчетная процедура. Вводилась новая система координат, увязанная с гемом. Чтобы исключить изменения в самой группе гема и относительно расположении 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^{ε1} проксимального гистидина. Далее с использованием координат атомов C^α методом наименьших квадратов рассчитывались уравнения осей спиралей. Отрезки, соответствующие спиральям, определялись проекциями первого и последнего C^α-атомов данной спирали на эту ось (рис. 4). В табл. 4 приведены z-координаты середин отрезков, определяющие смещения спиралей относительно гема по вертикали. На рис. 4 видно, что изменения в структуре дезокси-Lb можно определить поворотом на 5° белковой части молекулы относительно гема вокруг оси, расположенной в плоскости и имеющей уравнение $x - 0,82 y = 0$.

Анализ изменений в строении молекулы дезокси-Lb при образовании комплекса Lb-IQ проводился после совмещения сравнимых молекул друг с другом методом наименьших квадратов с использованием координат C^α-атомов. Из данных табл. 5 по среднеквадратичным отклонениям в координатах сравниваемых структур после такого совмещения следует, что наиболее подвижным в молекуле является N-концевой участок, где различие в положениях C^α-атомов превышает 0,9 Å. Это связано с тем, что все 3 остатка этого участка находятся на поверхности и подвижны. Различия в координатах C^α-атомов для спирали C, переходного участка CD и гема превышают среднюю величину отклонений по всей молекуле белка (0,30 Å), что может быть связано с присоединением лиганда. Различия в координатах всех атомов для спирали E превышает 0,8 Å, что связано с изменением положения боковых групп аминокислотных остатков (в частности, для остатка His-E7 различия достигают 6,3 Å), поскольку его имидазольное кольцо в изучаемом комплексе выведено из гемового кармана. Различия в положениях атомов Fe в Lb-IQ и дезокси-Lb 0,1 Å.

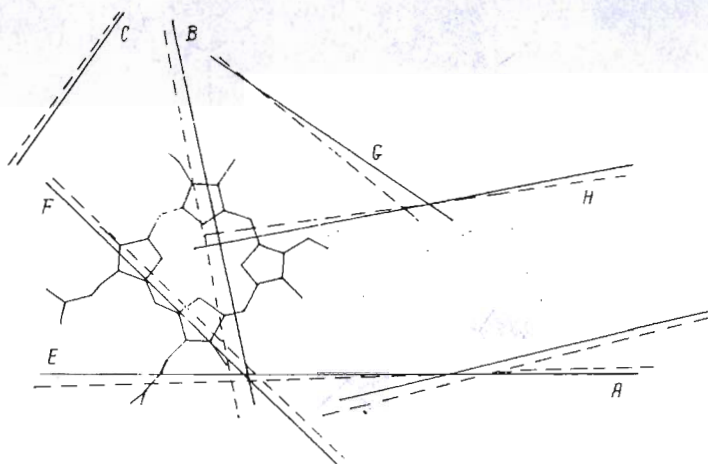


Рис. 4. Расположение осей α -спиралей в структуре дезокси-Lb (сплошные линии) и Lb-IQ (штриховые линии) при совмещении групп гема. Обозначения даны в соответствии с номенклатурой спиралей в структуре миоглобина [6]

Конформационные изменения, возникающие в результате присоединения лиганда, приводят к изменению системы водородных связей и солевых мостиков (табл. 6). Рассматривались случаи, когда расстояния между атомами, которые могут образовывать контакты, находились в интервале 2,2–3,6 Å. Системы таких контактов в дезокси-Lb и Lb-IQ весьма близки.

По разностным синтезам, которые рассчитывались в ходе уточнения, было локализовано 166 молекул растворителя. На расстояниях, меньших 3,6 Å от белка, находятся 94 молекулы воды. Таким образом, около 57% общего числа молекул воды образуют первый гидратный слой. Как видно из табл. 7, наибольшее число молекул воды образует по 2–4 водородные связи (54%).

Экспериментальная часть

Исходным материалом для получения комплекса Lb-IQ служили кристаллы комплекса леггемоглобина с ацетатом. Выращенные по методу, описанному ранее [9], кристаллы ацетат-Lb переводились в аквамелгемоглобин (Lb-H₂O) выдерживанием в течение 2 сут в 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 60% (NH₄)₂SO₄. Раствор Lb-H₂O в спектрометрической кювете титровали раствором изохинолина, добавляя последние порции по 5 мкл до прекращения изменений в видимой области спектра.

Набор дифракционных отражений для кристаллического комплекса Lb-IQ при разрешении 1,8 Å получен на дифрактометре КАРД-3 с координатным детектором [10]. Набор был получен с одного кристалла. Интегральные интенсивности измерялись при непрерывном сканировании кристалла вокруг оси ω со скоростью 0,6 град/мин. Полный оборот кри-

Таблица 5

Среднеквадратичные отклонения (Å) в координатах C α -атомов (1) и всех атомов белка (2) в структуре комплекса Lb-IQ при сравнении его с дезокси-Lb

N	Спирали							Межспиральные переходы						
	A	B	C	E	F	G	H	NA*	CD	EF	FG	GH	Γ_{em}	Δ^{**}
1	0,24	0,23	0,36	0,22	0,26	0,21	0,27	0,97	0,47	0,26	0,25	0,17	—	0,30
2	0,44	0,45	0,60	0,82	0,61	0,35	0,47	1,15	0,63	0,29	0,24	0,29	0,74	0,57

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

** Среднеквадратичное отклонение по молекуле.

Основные различия в системе водородных связей в дезокси-Lb и Lb-IQ (расстояния даны в Å)

Контакт	Дезокси-Lb	Lb-IQ	Контакт	Дезокси-Lb	Lb-IQ
(Thr-A1)O ¹ ... (Ser-A3)N	3,3	—	(Ser-CD2)O ¹ ... O2(III) (геи)	3,2	—
(Thr-A1)O ¹ ... (Gln-A4)O ^{e1}	3,6	—	(Ser-CD2)O ¹ ... (Glu-E3)O ^{e1}	—	3,5
(Ser-A3)O ¹ ... (Glu-H3)O ^{e1}	—	3,5	(Thr-CD7)O ¹ ... (Glu-CD9)O	3,1	—
(Lys-A9)N ^e ... (Glu-A13)O ^{e2}	3,4	—	(His-E7)N ^{e2} ... O2(IV) (геи)	—	3,2
(Glu-A14)O ^{e1} ... (Val-G19)O	3,6	—	(Lys-E13)N ^e ... (Glu-E17)O ^{e1}	—	3,4
(Glu-A14)O ^{e2} ... (Lys-GH2)N ^e	3,2	—	(Lys-E13)N ^e ... (Glu-E17)O ^{e2}	—	2,5
(Asn-B1)O ^{d1} ... (Lys-B4)N ^e	—	3,3	(Thr-EF4)O ¹ ... (Lys-H21)N ^e	—	2,8
(Pro-B3)O... (Thr-B6)O ¹	3,6	—	(Thr-EF4)O... (Lys-F5)N ^e	—	3,4
(Arg-B8)N ^e ... (Glu-G18)O ^{e1}	3,4	—	(Asp-F1)O ^{d1} ... (Thr-F3)N	3,5	—
(Arg-B8)N ^{e2} ... (Glu-G18)O ^{e1}	2,9	—	(Asn-F6)O ^{d1} ... (Ser-F9)O ¹	—	3,2
(Arg-B8)N ^{e1} ... (Glu-G18)O ^{e1}	—	3,6	(Asn-F6)O... (Ser-F9)O ¹	—	2,9
(Lys-C5)N ^e ... (Gly-CD6)N	3,5	—	(Ser-F9)O... (Ser-F13)O ¹	3,0	—
(Lys-C5)N ^e ... (Thr-CD7)O ¹	—	3,0	(Lys-G9)N... (Tyr-H12)O ⁿ	—	3,5
(Leu-C7)O... O2(III) (геи)	—	3,3	(Val-G20)O... (Lys-GH2)N ^e	3,4	—
(Ser-CD2)O ¹ ... O4(III) (геи)	3,4	—	(Thr-H9)O... (Asp-H13)O ^{d2}	3,2	—

Таблица 7

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

Число Н-связей	Число молекул H ₂ O	V*, Å ²	Число Н-связей	Число молекул H ₂ O	V*, Å ²
0	12	34,2	5	20	34,7
1	30	36,5	6	3	27,1
2	37	34,6	7	6	34,8
3	34	35,8	8	5	38,4
4	19	31,3			

* Среднее значение теплового фактора молекул.

сталла занимал 10 ч и позволял регистрировать две независимые области обратного пространства. Измерено 19 900 отражений, из них 95% с $I > 3\sigma(I)$. После усреднения эквивалентных отражений осталось 10 893 отражения, из них 89% с $I > 3\sigma(I)$. $R_{merge} = \Sigma I - \langle I \rangle / \Sigma I = 0,08$. При расчете структурных амплитуд вносились поправки на факторы Лоренца, поляризацию и поглощение по методу Норта — Филлипса [11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аругюнян 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.
2. Обмолова Г. В., Сафонова Т. Н., Тепляков А. В., Попов А. Н., Куранова И. П., Аругюнян Э. Г., Вайнштейн Б. К. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1509—1519.
3. Аругюнян Э. Г., Сафонова Т. Н., Обмолова Г. В., Тепляков А. В., Попов А. Н., Русаков А. А., Рубинский С. В., Куранова И. П., Вайнштейн Б. К. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. № 3. С. 293—302.
4. Hendrickson W. A., Konner S. H. Biomolecular Structure, Conformation, Function and Evolution. V. 1/Ed. R. Srinivasan. Oxford: Pergamon Press, 1979. P. 47—51.
5. Sussman J. L., Molbrook S. R., Church G. M., Sung Hou Kim. // Acta crystallogr. 1977. V. A33. № 5. P. 800—805.
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. № 4711. P. 422—427.
7. Biochemistry. 1970. V. 9. P. 3471—3503.
8. Аругюнян Э. Г. // Докл. АН СССР. Сер. Биохимия. 1980. Т. 252. С. 1264—1268.
9. Вайнштейн Б. К., Аругюнян Э. Г., Куранова И. П., Борисов В. В., Сосфенов Н. И., Павловский А. Г., Гребенко А. И., Конарева Н. В. // Кристаллография. 1974. Т. 19. № 5. С. 964—970.
10. 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.
11. Morth A. G., Phillips D. C., Matthews F. S. // Acta crystallogr. 1968. V. A24. № 3. P. 351—353.

Поступила в редакцию
24.IV.1991

**CRYSTAL STRUCTURE OF FERRIC COMPLEX OF THE YELLOW LUPIN
LEGHEMOGLOBIN WITH ISOQUINOLINE AT 1.8 Å RESOLUTION**

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

Complex of leghemoglobin with isoquinoline (Lb-IQ) is of interest with respect to the bulky ligand location in the heme pocket. The atomic model was refined (1.8 Å resolution) by a restrained parameter least-square procedure to a *R* factor of 0.18. The angle between the heme and ligand planes is 104°, the non-coplanarity apparently being due to the heme pocket size. The atom nearest to Fe is one of C atoms (Fe-C distance is 1.7 Å) but not the N atom of the ligand as was supposed previously. The imidazole ring of the proximal His F11 residue is not positionally affected as compared with deoxy-Lb. In both complexes the Fe atom is displaced from the heme plane towards the proximal His residue, distance between Fe and the heme plane being 0.08 Å. The isoquinoline binding causes conformational changes, leading to some alterations in hydrogen bonds. The model includes 166 water molecules.