

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛОБИНОВ С ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ

© 2020 г. Г.Б. Постникова, Е.А. Шеховцова, В.С. Сивожелезов

Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: gb_post@icb.psn.ru

Поступила в редакцию 27.11.2019 г.

После доработки 19.02.2020 г.

Принята к публикации 22.09.2020 г.

Проанализирована роль электростатических взаимодействий в стабилизации нативной конформации гемовой полости в структуре миоглобина кашалота (swMb) и лошади (hhMb), гемоглобина I (HbI) овода *Gasterophilus intestinalis* (giHbI) и мономерных и димерных гемоглобинов HbI и HbII моллюска *Lucina pectinata* (lpHbI и lpHbII), а также возможной ее дестабилизации при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами. Показано, что нативная конформация гемовой полости в этих глобинах, как в проксимальной, так и в дистальной ее части, поддерживается системой водородных связей с участием проксимального и дистального белковых остатков, обеих пропионовокислых групп гема и близких к ним на поверхности белка полярных аминокислот (His, Arg, Lys). Сеть водородных связей в проксимальной части гемовой полости контролирует положение атома Fe вне или в плоскости протопорфирина, которое влияет на эффективность связывания лиганда, в то время как в дистальной части гемовой полости сеть водородных связей, образованная с участием дистального остатка белка (HisE7 в swMb, hhMb и giHbI, и GlnE7 в lpHbII), очевидно, должна стабилизировать такую его конформацию, в которой тот способен донировать водород лиганду O₂. Водородная связь дистального остатка E7 с лигандом O₂ препятствует его быстрой диссоциации и играет важнейшую роль в регуляции сродства к лиганду. Найденные сети водородных связей в проксимальной и в особенности дистальной части гемовой полости, должны нарушаться при связывании оксиглобина с мембранной поверхностью из-за контакта отрицательно заряженных головок фосфолипидов с экспонированными в сторону мембраны лизинами или аргининами белка, измененного локального pH вблизи мембраны и эффекта отрицательного электростатического поля мембраны, приводя к уменьшению сродства белка к лиганду O₂ и облегчая его отщепление при физиологических значениях pO₂ в клетке.

Ключевые слова: глобины, фосфолипидная мембрана, пространственная структура, электростатические взаимодействия, водородные связи.

DOI: 10.31857/S0006302920060058

Глобины относятся к древнему семейству дыхательных глобулярных белков млекопитающих, моллюсков, членистоногих и насекомых, простетическая группа которых представлена железопорфириновым комплексом — гемом. Они способны обратимо связывать газообразные лиганды, O₂, CO и NO, обеспечивая протекание окислительных и других процессов в тканях. Несмотря на значительные различия в аминокислотных последовательностях, все глобины имеют

высокоомологичные пространственные структуры, которые включают, как правило, восемь α-спиральных фрагментов, обозначаемых латинскими буквами от A до H, а также межспиральные участки АВ, ВС, CD и т.д. Гемовая группа, протопорфирин IX, локализована в гидрофобном «кармане» между E- и F-спиралями и ориентирована таким образом, что оба пропионовокислых остатка гема направлены в растворитель.

Гемовая группа связана с белком нековалентно через ван-дер-ваальсовы или π-π-контакты между π-электронной системой протопорфирина и боковыми группами белка в гемовой полости, через аксиальную координацию гемового железа с белковыми лигандами и, наконец, через водо-

Сокращения: Mb — миоглобин; MbO₂ — оксимиоглобин; Hb — гемоглобин; swMb — миоглобин кашалота; hhMb — миоглобин лошади; giHbI — гемоглобин личинок овода *Gastrophilus intestinalis*; lpHbI — гемоглобин I моллюска *Lucina pectinata*; lpHbII — гемоглобин II моллюска *Lucina pectinata*.

родные (и ионные или солевые) связи между А- и D-пропионатами гема и ближайшими заряженными поверхностными остатками белка. Эти взаимодействия позволяют белку «узнавать» гемовую группу. Из двух аксиальных лигандов атома железа гема только пятый лиганд – проксимальный гистидин принадлежит белку, а шестое координационное место либо, как правило, свободно (дезоксид-форма глобина), либо занято молекулой O_2 или другим внешним лигандом.

Со времен Хилла и Милликана [1, 2] считалось, что по аналогии с гемоглобином крови миоглобин (Mb) функционирует в соответствии с его кривой оксигенации в растворе, т. е. дезоксигенация оксимиоглобина (MbO_2) в мышечной клетке должна происходить при снижении парциального давления O_2 (pO_2) в среде до $pO_2 < 3$ мм рт. ст. и при этом не требуется какого-либо взаимодействия MbO_2 с клеточными органеллами или метаболитами. Мы впервые показали [3–5], что, вопреки давно сформированным и вошедшим в учебники представлениям, для отщепления кислорода от оксимиоглобина (MbO_2) необходимо не только снижение pO_2 в клетке, но и активное взаимодействие его с дышащими митохондриями. Если же митохондрии отделены от раствора белка полупроницаемой мембраной, то даже при близком к нулю значении pO_2 никакой дезоксигенации MbO_2 не происходит. При этом для разных состояний митохондрий (нативные сопряженные, свежемороженые и разобщенные реагентом FCCP (*n*-трифторометоксикарбонилцианидфенилгидразоном) митохондрии) скорость дезоксигенации MbO_2 полностью совпадает со скоростью потребления митохондриями O_2 из раствора, т. е. полностью определяется интенсивностью их дыхания.

Проведенное нами изучение механизма миоглобин-митохондриального взаимодействия с привлечением различных физико-химических методов, использованием природных митохондриальных и искусственных нейтральных и отрицательно заряженных бислойных фосфолипидных мембран показало, что на внешней мембране митохондрий белки, специфичные к миоглобину, отсутствуют, а MbO_2 неспецифически связывается с мембранными фосфолипидами [6, 7]. Найдено также, что основной вклад в это взаимодействие вносят кулоновские электростатические взаимодействия локального характера, в которых с анионными группами (головками) отрицательно заряженных фосфолипидов наиболее вероятно взаимодействуют положительно заряженные остатки в окружении гемовой полости.

В результате взаимодействия миоглобина с фосфолипидной мембраной имеет место изменение конформации белка, в первую очередь нативной конформации гемовой полости, без заметного изменения третичной структуры, что приводит к уменьшению сродства миоглобина к лиганду и облегчает отщепление кислорода от MbO_2 при физиологических значениях pO_2 в клетке [8–10]. Полученные результаты хорошо согласуются с выводом, сделанным ранее из детального изучения функциональных свойств и пространственных структур миоглобинов млекопитающих и глобинов из других организмов, что электростатическая стабилизация является общим механизмом контроля лигандного связывания [11].

Все вышеупомянутые исследования проводились с использованием миоглобина кашалота и его модифицированных производных и митохондрий из печени крысы с сукцинатом в качестве дыхательного субстрата. Позднее была изучена дезоксигенация в присутствии митохондрий из сердца голубя (с глутаматом и малатом в качестве дыхательных субстратов) шести других оксиглобинов, миоглобина лошади и моллюска *Busucon*, мономерного леггемоглобина сои, мономерных и димерных гемоглобинов (Hb) I и II моллюска *Lucina pectinata*, а также димерного HbI насекомого *Gasterophilus intestinalis*, которые в десятки и сотни раз различаются по кинетическим и равновесным параметрам их реакции с O_2 в растворе [12]. Однако в присутствии митохондрий во всех случаях регистрировалась одинаковая скорость дезоксигенации оксиглобина, которая также соответствовала, как и для MbO_2 кашалота, скорости дыхания митохондрий, что свидетельствует в пользу взаимодействия всех изученных глобинов с митохондриями, хотя авторы работы [12] это отрицали.

В данной работе проанализирована роль электростатических взаимодействий в стабилизации нативной конформации гемовой полости и возможной ее дестабилизации при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами в структурах миоглобинов кашалота (swMb) и лошади (hhMb), димерного Hb *Gasterophilus intestinalis* (giHbI) и мономерных и димерных HbI и HbII моллюска *Lucina pectinata* (lpHbI и lpHbII)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Координаты атомов пространственных структур Mb кашалота (код структуры 1A6M, оксидформа), Mb лошади (код структуры 5D5R, дезокси-форма), HbI личинок паразитирующего овода *Gasterophilus intestinalis* (код структуры 2C0K, ок-

Таблица 1. Параметры реакции мономерных и димерных миоглобинов и гемоглобинов с кислородом (рН 7.0–7.5, 20–25°C)

Белок	$k_{\text{on}} \cdot 10^{-6},$ $\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	$k_{\text{off}}, \text{c}^{-1}$	$K = k_{\text{on}}/k_{\text{off}},$ M^{-1}	$p_{50},$ мм рт. ст.	$T, ^\circ\text{C}$	Ссылка
Мб кашалота	19	10	1.9	0.33–0.51 0.9	20 25	[12] [18]
Мб лошади	14	11	1.3	0.43–0.65	20	[12] [18]
Hb <i>Gasterophilus intestinalis</i>	10	2.4	4.2	0.15	25	[22]
HbI <i>Lucina pectinata</i>	100	61	1.6	0.34	20	[23]
HbII <i>Lucina pectinata</i>	0.39	0.11	3.5	0.16	20	[23]

си-форма), HbI моллюска *Lucina pectinata* (код структуры 1MOH, H₂S-форма) и HbII моллюска *Lucina pectinata* (код структуры 2OLP, лиганд O₂) взяты из Банка белковых данных и визуализированы в программе MolMol. Расстояния между атомами указаны в ангстремах.

Конформационный анализ аминокислот в окружении гема проводили путем сплошного перебора конформаций соответствующих аминокислот с шагом 10 градусов по каждому из двугранных углов, с оптимизацией ван-дер-ваальсовых конфликтов, электростатических (по Эвальду) и водородных связей, согласно методике, описанной в работе [13]. Учитывали взаимодействия исследуемых аминокислот со всеми атомами миоглобина, включая гемовую область. На рис. 1–3 представлены структуры, оптимальные по указанным критериям.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

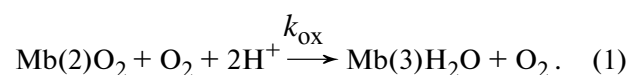
Как отмечалось выше, ранее все исследования проводили на миоглобине кашалота и его модифицированных производных с митохондриями из печени крысы с сукцинатом в качестве дыхательного субстрата. Позднее была изучена дезоксигенация других мономерных и димерных оксиглобинов, в десятки и сотни раз различающихся по кинетическим и равновесным параметрам их реакции с O₂ в растворе. Однако в присутствии митохондрий регистрировалась одинаковая скорость дезоксигенации всех оксиглобинов, соответствующая скорости дыхания митохондрий.

В данной работе проанализирована роль электростатических взаимодействий в стабилизации нативной конформации гемовой полости в структуре Мб кашалота и лошади, HbI овода *Gas-*

terophilus intestinalis и мономерных и димерных гемоглобинов HbI и HbII моллюска *Lucina pectinata*, а также возможной ее дестабилизации при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами.

Миоглобин кашалота (153 аминокислотных остатка, 17.8 кДа) – мономерный глобин, содержащий пентакоординированный атом железа гема с His93(F8) в качестве проксимального лиганда. Благодаря тому, что миоглобин может быть получен в больших количествах и легко кристаллизуется, он был первым белком, пространственная структура которого была расшифрована с атомным разрешением [14]. Миоглобин кашалота обладает очень высоким сродством к кислороду, мерой которого значение p_{O_2} , при котором дезокси-Мб(2) оксигенирован наполовину (p_{50}). Для него характерны высокая скорость ассоциации O₂ (k_{on}), низкая скорость диссоциации его из комплекса (k_{off}) и соответственно низкие значения p_{50} (табл. 1).

Свободный комплекс феррогема с O₂ в растворе нестабилен и очень быстро окисляется до ферригема, в то время как автоокисление нативного MbO₂ кашалота до окисленной мет-формы представляет собой медленный процесс, который занимает несколько суток при рН 7.2 и комнатной температуре, заметно ускоряясь при низких рН и повышении температуры [15, 16]:



Показано, что причина высокой стабильности O₂-комплекса в MbO₂ (и в оксигемоглобине) животных заключается в гидрофобном характере окружения гемовой группы в белке, а также в на-

личии водородной связи между лигандом O_2 и инвариантным дистальным His64(E7) в гемовой полости, которая играет важнейшую роль в регуляции сродства к кислороду, препятствуя его быстрой диссоциации [17]. Замена His64(E7) неполярными аминокислотными остатками, неспособными к Н-связыванию с лигандным O_2 , приводит к значительному снижению сродства к O_2 , главным образом, из-за увеличения k_{off} [15].

Показано также, что заметный вклад в стабилизацию нативной конформации гемовой полости MbO₂ вносят электростатические взаимодействия между пропионовокислыми остатками гема, А- и D-пропионатами, и близко расположенными положительно заряженными группами (Lys, Arg) белка. Электростатические взаимодействия между гем-D-пропионатом и Arg45(CD3), который в свою очередь образует Н-связь с дистальным HisE7, стабилизируют позицию дистального гистидина, в которой он способен донировать водород лиганду O_2 . Потеря положительного заряда в позиции 45, а тем более добавление туда отрицательного заряда нарушает нативную конфигурацию этой области, увеличивая доступность дистального кармана белка растворителю [15].

В данной работе проанализировано участие заряженных остатков Arg и Lys в окружении гема в CD-, D-, E- и FG-фрагментах структуры MbO₂ кашалота (использовали аминокислотные остатки с 40 по 100), а также гемпропионатов в образовании ионных и водородных связей, стабилизирующих нативную конформацию гемовой полости. Найдено, что с проксимальной стороны гема А-пропионат образует «солевой мостик» с His97(FG3), который в свою очередь участвует в сети Н-связей, включающей проксимальный His93(F8), Ser92(F7), Leu89(F4), Lys96(FG2) и Lys98(FG4) (рис. 1, табл. 2). Очевидно, что эта разветвленная сеть водородных связей с участием А-пропионата способствует нахождению проксимального His93(F8) в безлигандном дезоксиMb в конформации, аналогичной Т-форме гемоглобина с низким сродством к лиганду [18].

В дистальной части гемовой полости также обнаруживается сетка водородных связей, образованная главным образом гем-D-пропионатом, Arg45(CD3), Asp60(E3) и дистальным His64(E7) (рис. 1, табл. 2). Водородная связь между N-дельта карбонильным кислородом Asp60(E3) и His64(E7) и должна блокировать вращение дистального His64(E7) вокруг $C_\alpha-C_\beta$ -связи и стабилизировать «закрытую» конформацию этого гистидина, донирующего водород лиганду O_2 [19].

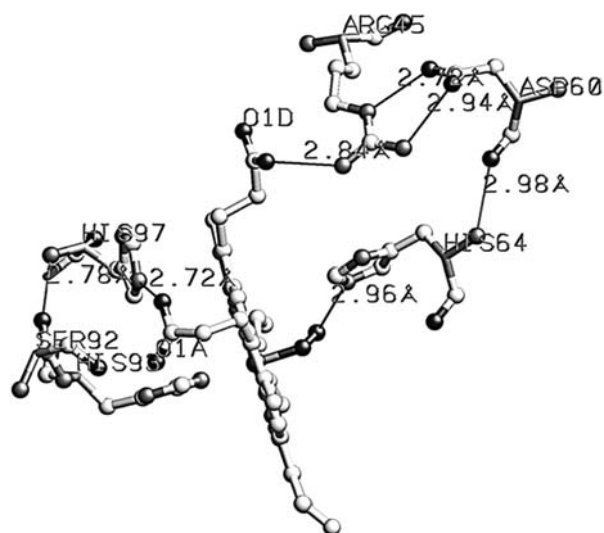


Рис. 1. Окружение гемовой группы миоглобина кашалота. Показаны водородные связи и их длина в Å. Аминокислоты надписаны при атомах C_α ; гемовые А- и D-пропионаты – при атомах первого карбоксильного кислорода O1A и O1D. Черные шарики – атомы кислорода, серые шарики – атомы азота, белые шарики – атомы углерода.

Миоглобин из сердца лошади (153 аминокислотных остатка, 17.8 кДа) по своей структуре и свойствам очень близок к Mb кашалота [20]. Наблюдается высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей обоих белков, особенно среди аминокислотных остатков, формирующих гемовый карман, где имеются всего две замены – Lys45(CD3) и Val67(E10) в миоглобине лошади вместо Arg45(CD3) и Thr67(E10) в миоглобине кашалота. Пентакоординированный атом железа в hhMb также содержит проксимальный His93(F8), и имеется дистальный His64(E7), способный образовать Н-связь со связанной молекулой кислорода. Замена Arg45(CD3) на Lys45(CD3) в миоглобине лошади лишь незначительно влияет на кислородсвязывающие свойства белка (табл. 1) и скорость его автоокисления, так что эта естественная мутация рассматривается как нейтральная [15].

С проксимальной стороны гема сетка из Н-связей в hhMb образована, как и в Mb кашалота, гем-А-пропионатом, His97(FG3), Ser92(F7), проксимальным His93(F8), Lys96(FG2), Lys98(FG4) и Leu89(F4), и стабилизирует нативную конформацию этой области молекулы (табл. 2). В дистальной части гемовой полости имеются определенные отличия сетки водородных связей в hhMb от Mb кашалота (табл. 2). Наряду с Н-связью гем-D-пропионата с Lys45(CD3), обнаруживается водородная связь дистального His64(E7) с пептидной NH-группой Val68(E11), а также связь Asp60(E3) с

Таблица 2. Сеть водородных связей в окружении гемовой группы глобинов

Проксимальная сторона	Расстояние, Å	Дистальная сторона	Расстояние, Å
Миоглобин кашалота, мономер, окси-форма			
Проп.А – (N)His97(FG3)	2.73	(N)His64(E7) – O ₂ -лиганд	2.97
(N)His93(F8) – (O)Ser92(F7)	2.96	Проп. D – (N)Arg45(CD3)	2.84
(N)His93(F8) – (CO)Leu89(F4)	2.94	(N)Arg45(CD3) – Asp60(E3)	2.73
(NH)Lys96(FG2) – (CO)Ser92(F7)	2.94	(N)Arg45(CD3) – Asp60(E3)	2.95
(NH)Lys98(FG4) – (CO)His97(FG3)	2.26	(NH)His64(E7) – Asp60(E3)	2.99
Миоглобин лошади, мономер, дезокси-форма			
Проп.А – (N) His97(FG3)	2.80	Проп. D – (N)Lys45(CD3)	2.97
(N) His93(F8) – (O) Ser92(F7)	2.87	(NH) Lys62(E5) – (CO)Asp60(E3)	3.55
(NH)Lys96(FG2) – (CO)Ser92(F4)	2.93	(NH)Lys63(E6) – (CO)Asp60(E3)	3.30
(NH)Lys98 (FG4)-(CO)His97(FG3)	2.25	(CO)His64(E7) – (NH)Val68(E11)	2.77
(NH)Ser92 (F4) – (CO)Leu89(F4)	3.38		
Гемоглобин овода <i>Gasterophilus intestinalis</i> , димер, цепь А, окси-форма			
Проп.А – (N)Arg65(E10)	2.91	(N)His62(E7) – O ₂ -лиганд	2.88
(N)Lys92(F3) – (O)Gln69(E14)	3.54	Проп. D – (N1)Arg58(E3)	3.50
		Проп. D – (N2)Arg58(E3)	3.38
		(NH)His62(E7) – (CO)Arg58(E3)	3.12
		(NH)Gln69(E14) – (CO)Ile66(E11)	3.43
Гемоглобин <i>Lucina pectinata</i> I, мономер, H ₂ S-форма			
Проп.А – (N)Arg99(F18)	2.91	(O)Gln64(E7) – H ₂ S-лиганд	3.34
(CO)His96(F15) – (NH)Arg99(F18)	2.94	Проп. D – (N)Gln64(E7)	3.84
		Проп. D – (N)Arg99(F18)	6.11
		(CO)Gln64(E7) – (NH)Ser67(E10)	3.26
Гемоглобин <i>Lucina pectinata</i> II, димер, цепь А, окси-форма			
Проп.А – (N)Arg100(F18)	2.71	(N)Gln65(E7) – O ₂ -лиганд	3.43
(N)His97(F15) – (CO)Met93(F11)	2.89	(O)Tyr30(B10) – O ₂ -лиганд	1.94
(NH)His97(F15) – (CO)Met93(F11)	3.12	Проп. D – (N)Lys92(F10)(цепь В)	2.63
(CO)His97(F15) – (NH)Arg100(F18)	2.99	(O)Gln65(E7) – (N)Lys92(F10)(ц. В)	2.73
		Проп. D – (N)Lys95(F13)(цепь В)	4.72

Примечание. Используемые сокращения: (N) – азот функциональной группы аминокислотного остатка, (O) – кислород функциональной группы аминокислотного остатка, (NH) – азот пептидной группы аминокислотного остатка, (CO) – кислород пептидной группы аминокислотного остатка.

соседними Lys62(E5) и Lys63(E6). Отсутствует Н-связь с лигандным кислородом, так как взята структура безлигандного белка.

Очень важную роль в сохранении нативной конформации дистальной части гемовой полости в миоглобинах играют электростатические взаимодействия между гем-D-пропионатом и Arg(Lys)45 в положении CD3. Замена Lys45 в MbO₂ свиньи на небольшой и незаряженный Ser приводит к увеличению равновесной константы диссоциации O₂ (K_{dis}) мутантного белка в 1.7 раза и скорости его автоокисления (k_{ox}) – в 6 раз, а при замещении Lys45 на Glu наблюдалось увеличение K_{dis} в 2.5 раза и почти двадцатикратное увеличение k_{ox} [15]. Прямая корреляция между k_{ox} и K_{dis} связана с тем, что оба процесса «запускаются» разрывом Н-связи дистального HisE7 с лигандом O₂ [15, 16].

На примере лошадиного Mb изучено также влияние водородного связывания с участием пропионовокислых групп гема и поверхностных аминокислотных остатков на динамику гем-белкового взаимодействия [21]. При замене Ser92(F7) на Asp или His97(FG3) на Leu, а Lys45(CD3) на Glu константа скорости диссоциации гема из миоглобина увеличивалась в три-пять раз (при pH 7.0). При этерификации же обоих пропионатов она возрастает в 20 раз [21].

Гемоглобин личинок паразитирующего овода *Gasterophilus intestinalis*, живущих в желудке лошади, содержит несколько изоформ белка, присутствующих в трахейных дыхательных клетках в миллимолярной концентрации. Гемоглобин giHbI представляет собой гомодимер (151 аминокислотный остаток в одной цепи, 37 кДа), субъединицы которого контактируют между собой в области G- и H-спиралей таким образом, что гемовые группы ориентированы в разные стороны [22]. Контактная поверхность содержит несколько полярных контактов, т. е. ассоциация димера основана на электростатических взаимодействиях.

По аминокислотной последовательности giHbI имеет только 21% гомологии с swMb, однако их пространственные структуры близки: проксимальный остаток гема представлен His97(F8), дистальный остаток – His62(E7), лигандная молекула O₂ стабилизируется Н-связью с His E7 (3.1 Å и 2.6 Å для субъединиц А и В соответственно). Константа скорости ассоциации кислорода k_{on} соответствует величине, характерной для swMb, а константа скорости диссоциации k_{off} в четыре раза меньше и, соответственно, сродство giHbI существенно выше (табл. 1). Низкое значе-

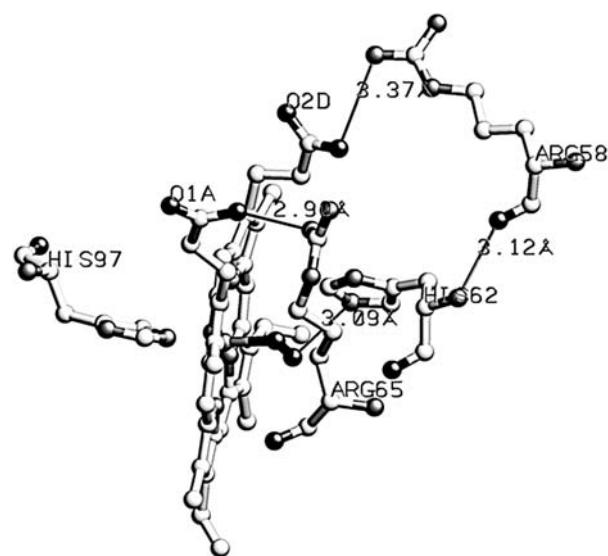


Рис. 2. Окружение гемовой группы гемоглобина овода *Gasterophilus intestinalis*. Показаны водородные связи и их длина в Å. Аминокислоты надписаны при атомах C_α; гемовые А- и D-пропионаты – при атомах первого карбоксильного кислорода O1A и O1D. Черные шарики – атомы кислорода, серые шарики – атомы азота, белые шарики – атомы углерода.

ние k_{off} отражает более высокую, чем в swMb, степень стабилизации связанного лиганда со стороны дистального His62(E7).

Поверхность giHbI богата заряженными аминокислотными остатками. С проксимальной стороны гема имеется лишь водородная связь А-пропионата с Arg65(E10), а с дистальной – гораздо более разветвленная система Н-связей с участием D-пропионата (рис. 2, табл. 2).

Гемоглобин, обнаруженный в жабрах двусторчатого моллюска *Lucina pectinata*, заселяющего богатый сероводородом тропический ил, содержит в высокой концентрации три различных белка: сульфид-реактивный мономерный lpHbI (142 аминокислотных остатка, 14.9 кДа), способный также связывать кислород, и транспортирующие кислород димерные lpHbII и lpHbIII (35 кДа), состоящие из разных мономеров А и В (151 и 152 аминокислотных остатка соответственно). Все они способствуют потоку H₂S и O₂ из окружающей морской воды к внутриклеточным H₂S-окисляющим симбионтам. Оксигенированный lpHbI реагирует с H₂S, образуя ферри-lpHbI-сульфид, а окси-lpHbII остается оксигенирован в присутствии сероводорода [23].

Первичные последовательности lpHbII и lpHbIII очень близки, но значительно отличаются от АК-состава lpHbI. Пространственная структура мономерного lpHbI и димерного lpHbII со-

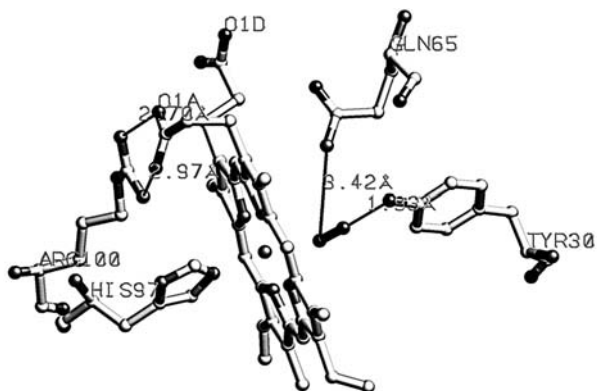


Рис. 3. Окружение гемовой группы гемоглобина II моллюска *Lucina pectinata*. Показаны водородные связи и их длина в Å. Аминокислоты надписаны при атомах C α , гемовые А- и D-пропионаты – при атомах первого карбоксильного кислорода O1A и O1D. Черные шарики – атомы кислорода, серые шарики – атомы азота, белые шарики – атомы углерода.

стоит из шести α -спиралей (А, В, Е, F, G и H), окружающих гемовый карман, и двух минорных спиральных фрагментов между В и Е спиралам [23, 24]. В димерном LpHbII пропионатные группы гемовых групп субъединиц А и В направлены в сторону контактной площадки. Оба белка содержат атом Fe в плоскости гема, более длинную F-спираль (18 аминокислотных остатков), проксимальный His96 или His97(F15) и консервативный дистальный глутамин в положении E7, Gln64(E7) в LpHbI и Gln65(E7) в LpHbII).

Для мономерного LpHbI значения k_{on} и k_{off} на порядок выше, чем у Mb кашалота, однако равновесная константа ассоциации и значения p_{50} близки (табл. 1). Для димерного LpHbII значения k_{on} и k_{off} существенно ниже, и значительно выше его сродство к лиганду O $_2$, такое же, как у giHbI овода (табл. 1), что отражает, очевидно, разную степень стабилизации кислородного комплекса в LpHbI и LpHbII. Действительно, лигандный O $_2$ тесно связан в дистальном гемовом сайте LpHbII через водородные связи с двумя аминокислотными остатками, Gln65(E7) и Tyr30(B10) (рис. 3), а в LpHbI вместо Tyr30(B10) присутствует Phe29(B10), неспособный донировать водород лиганду O $_2$ (табл. 2).

В проксимальной части гемовой полости LpHbI, позиции А-пропионата и проксимального His96(F15) стабилизируются водородными связями с Arg99(F18), а в дистальной области гема дистальный Gln64(E7) связан водородными связями с D-пропионатом и Ser67(E10). В направлении D-пропионата ориентирован также один из атомов азота Arg99(F18) (табл. 2).

В структуре димерного LpHbII, в отличие от LpHbI, присутствуют разветвленные сетки Н-связей в проксимальной и дистальной областях гемовой полости (рис. 3). В их образовании активное участие принимают проксимальный His97(F15), А-пропионат и Arg100(F11), а в дистальной области гема – соответственно D-пропионат, дистальный Gln65(E7) и Lys92(F10) соседней субъединицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хорошо известно, что даже небольшие изменения структуры гемовой полости в разных глобинах при высокой степени гомологии их третичных структур приводят к существенным различиям (в десятки и сотни раз) кинетических и равновесных параметров связывания лиганда [18]. В данной работе показано, что нативная конформация гемовой полости в глобинах животных, swMb и hhMb, насекомого, giHbI, и моллюска, LpHbI и LpHbII, как проксимальной, так и дистальной ее части, поддерживается системой водородных связей с участием проксимального и дистального белковых лигандов, обеих пропионовых групп гема, а также близко расположенных к ним на поверхности белка положительно заряженных аминокислот (His, Arg, Lys). Обычно в структурно-функциональных исследованиях гемовой полости глобинов главная роль отводится методу молекулярной динамики. Однако сети водородных связей, подобные обнаруженным нами в настоящей работе, плохо воспроизводятся этим методом из-за значительного вклада квантовых эффектов в их образование, в частности, обобществления протона между донором и акцептором. Поэтому для уточнения пространственной структуры окружения гема вместо метода молекулярной динамики был использован сплошной перебор конформаций боковых групп аминокислот гемового окружения и пропионатов гема.

Сеть водородных связей в проксимальной части гемовой полости контролирует положение атома Fe вне или в плоскости протопорфирина, которое влияет на эффективность связывания лиганда, в то время как сеть водородных связей в дистальной части гемовой полости, образованная с участием дистального остатка белка (HisE7 в swMb, hhMb и giHbI, и GlnE7 в LpHbII), очевидно, должна стабилизировать его конформацию, в которой он способен донировать водород лиганду O $_2$.

С помощью рамановской спектроскопии было изучено соотношение молекул swMb с «закрытым» и «открытым» дистальным гемовым карманом в результате вращения дистального

His64(E7) вокруг C_{α} – C_{β} -связи как функции рН [19]. Значительный рост скорости диссоциации лиганда для открытой формы обусловлен потерей Н-связи с дистальным His64(E7), который стабилизирует связанный O_2 в закрытом состоянии. Энергия стабилизации водородной связи составляет $\sim 4(\pm 3)$ ккал/моль. Отмечается, что рост «открытой» популяции миоглобина в результате протонирования дистального гистидина или взаимодействия с другими метаболическими агентами в клеточной области, где локальная кислотность и метаболизм выше, а кислород быстро истощается, может рассматриваться как потенциально важный бимолекулярный механизм для контроля за связыванием и отщеплением кислорода в мышечной клетке.

Подобная ситуация реализуется, по-видимому, при взаимодействии глобина с митохондриями в условиях гипоксии. Найденные в настоящей работе сети водородных связей в проксимальной и в особенности дистальной части гемовой полости могут нарушаться под влиянием отрицательно заряженной фосфолипидной мембраны. Механизмы такого влияния могут включать контакты отрицательно заряженных головок фосфолипидов с экспонированными в сторону мембраны лизинами или аргининами белка, измененный локальный рН вблизи мембраны и даже более дальнедействующий эффект отрицательного электростатического поля мембраны. Все эти взаимозависимые факторы могут приводить к существенному изменению сродства белка к лиганду O_2 .

В отличие от тетрамерного Hb крови, сродство которого к O_2 регулируется как самим лигандом, так и аллостерическими эффекторами – дифосфоглицератом, протонами и CO_2 , обеспечивая необходимую скорость доставки O_2 с кровью, для миоглобина были неизвестны какие-либо низкомолекулярные соединения или клеточные метаболиты, способные уменьшить его сродство к лиганду, т. е. сдвинуть кривую оксигенации Mb в сторону более высоких значений $pO_2 = 10\text{--}20$ мм рт. ст., реально наблюдающихся в мышечной клетке при гипоксии. В наших исследованиях впервые показано, что регуляция сродства Mb к O_2 , как и в случае других белков-переносчиков, осуществляется с помощью его взаимодействия с мишенью – митохондриальной мембраной, что облегчает диссоциацию O_2 в физиологических условиях и обеспечивает поступление его с нужной скоростью непосредственно в митохондрии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. L. Hill, *Nature* **132**, 897 (1933).
2. G. A. Millikan, *Physiol. Rev.* **19**, 503 (1939).
3. G. B. Postnikova and S. V. Tselikova, *Biophysics (Moscow)* **50**, 284 (2005).
4. G. B. Postnikova, S. V. Tselikova, and E. A. Shekhovtsova, *Biochemistry (Moscow)* **74**, 1211 (2009).
5. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *J. Phys. Chem. Biophys.* **3**, 126 (2013).
6. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *Biochemistry (Moscow)* **77**, 280 (2012).
7. P. A. Grigoriev, G. B. Postnikova, and E. A. Shekhovtsova, *Biophysics (Moscow)* **57**, 55 (2012).
8. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *Biochemistry (Moscow)* **83**, 168 (2018).
9. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *Am. J. Biol. Chem.* **3**, 16 (2015).
10. G. B. Postnikova and E. A. Shekhovtsova, *Physiol. Sci.* **1**, 1 (2014).
11. S. Kundu and M. S. Hargrove, *Proteins: structure, function, and genetics* **50**, 239 (2003).
12. J. B. Wittenberg and B. A. Wittenberg, *J. Experim. Biol.* **210**, 2082 (2007).
13. M. U. Johansson, V. Zoete, O. Michielin, and N. Guex, *BMC bioinformatics* **13**, 173 (2012).
14. J. C. Kendrew, R. T. Dickerson, B. E. Strandberg, et al., *Nature (Lond.)* **185**, 422 (1960).
15. R. E. Brantley, S. J. Smerdon, A. J. Wilkinson, et al., *J. Biol. Chem.* **268**, 6995 (1993).
16. K. Shikama, *Chem. Rev.* **98**, 1357 (1998).
17. J. S. Olson, A. J. Mathews, R. J. Rohlfs, et al., *Nature* **336** (6196), 265 (1988).
18. E. Antonini and M. Brunori, *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands* (Amsterdam–London, 1971).
19. W. D. Tian, J. T. Sage, and P. M. Champion, *J. Mol. Biol.* **233**, 155 (1993).
20. S. V. Evans and G. D. Brayer, *J. Biol. Chem.* **263** (9), 4263 (1988).
21. Ch. L. Hunter, E. Lloyd, L. D. Eltis, et al., *Biochemistry* **36**, 1010 (1997).
22. A. Pesce, M. Nardini, S. Dewilde, et al., *Prot. Sci.* **14**, 3057 (2005).
23. D. W. Kraus and J. B. Wittenberg, *J. Biol. Chem.* **265** (27), 16043 (1990).
24. J. A. Gavira, A. Camara-Artigas, W. De Jesus-Bonilla, et al., *J. Biol. Chem.* **283** (14), 9414 (2008).

Electrostatic Interaction of Globins with Phospholipid Membranes

G.B. Postnikova, E.A. Shekhovtsova, and V.S. Sivozhelezov

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The present study aimed to analyze the role of electrostatic interactions contributing to the stability of the native conformations of the heme group in the structure of sperm whale myoglobin (swMb), horse heart myoglobin (hhMb), hemoglobin I (HbI) from the botfly *Gasterophilus intestinalis* (giHbI) and monomeric and dimeric hemoglobins HbI and HbII from the mollusk *Lucina pectinata* (lpHbI and lpHbII) as well as investigate a possible reason of destabilization due to interaction with negatively charged phospholipid membranes. It was shown that the native conformation of the heme cavity in these globins, both in its proximal and distal sides, is sustained by a system of hydrogen bonds involving the proximal and distal protein residues, both heme propionic acid groups and the nearby polar amino acids on the protein surface (His, Arg, Lys). The hydrogen bond network in the proximal part of the heme pocket controls the position of the Fe atom outside or in the protoporphyrin plane, affecting the efficiency of ligand binding, while in the distal part of the heme cavity the hydrogen bond network formed with the participation of the distal protein residue (HisE7 in swMb, hhMb and giHbI, and GlnE7 in lpHbII) should, apparently, stabilize conformation where the protein is able to donate hydrogen to O₂ ligand. The hydrogen bond between distal residue E7 and O₂ ligand prevents its rapid dissociation and plays an important role in the regulation of ligand affinity. The hydrogen bond networks found in the proximal and, especially, distal heme environments should be disturbed when oxyglobin binds to the membrane surface due to the contact of negatively charged phospholipid heads with the lysine or arginine exposed to the membrane, the altered local pH near the membrane and the effect of the negative electrostatic field of the membrane, resulting in a decrease in the affinity of the protein to O₂ ligand and facilitating its dissociation at normal pO_2 values of the cell.

Keywords: globins, phospholipid membrane, spatial structure, electrostatic interactions, hydrogen bonds