



УДК 577.112.854.012.7

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СМЕШАННОГО ДИСУЛЬФИДА
ГЕМОГЛОБИНА И ГЛУТАТИОНА*Сандалова Т. Ш., Белобров П. И.**Институт физики им. Л. В. Киренского Сибирского отделения
Академии наук СССР, Красноярск*

Методом атом-атомных потенциальных функций проведен конформационный анализ смешанного дисульфида гемоглобина с глутатионом (HbSSG). Изучена конформационная подвижность С-концевого фрагмента β -субъединицы мет- и дезоксигемоглобина со свободными и блокированными глутатионом активными SH-группами. Выделены наиболее стабильные конформации смешанного дисульфида. Показано, что его пространственная структура зависит от состояния гемоглобина до образования связи S—S в дисульфиде, образованном из дезоксигемоглобина, переплетение атомов гемоглобина и глутатиона сильнее, чем в дисульфиде, полученном из метгемоглобина. В обоих случаях образование дисульфида меняет пространственную структуру как гемоглобина, так и глутатиона. На основании анализа структуры HbSSG объясняются изменения биохимических свойств гемоглобина, происходящего при присоединении глутатиона.

Известно, что в эритроците содержится довольно много глутатиона и ферментов его обмена: глутатионсинтетазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и т. д. [1, 2]. При недостатке глутатиона или ферментов, участвующих в его метаболизме, а также при сдвиге равновесия в глутатионовой системе в сторону окисленного глутатиона (GSSG), происходящем при попадании в клетку некоторых окислителей, наблюдаются различные нарушения работы эритроцита: выпадение в осадок денатурированного метгемоглобина в виде так называемых телец Гейнца [3], нарушение транспортных мембранных процессов вплоть до самопроизвольного лизиса клетки [4], полимеризация молекул белка за счет образования дисульфидных мостиков [5].

В ряде работ показано, что часть внутриклеточного глутатиона находится в виде смешанных дисульфидов с белками, причем количество смешанных дисульфидов зависит от окислительно-восстановительного состояния клетки [6]. Основным белком эритроцита является гемоглобин, поэтому понятен интерес исследователей, занимающихся изучением транспортной функции крови, к дисульфиду, образованному гемоглобином и глутатионом.

Известно, что в тетрамере гемоглобина $\alpha_2\beta_2$ есть две активные сульфгидрильные группы, которые вступают в реакцию с тиоловыми реагентами в неденатурирующих условиях. Было показано также, что данные SH-группы, блокировка которых в значительной степени изменяет свойства гемоглобина [7], принадлежат остаткам Cys93 каждой из двух β -субъединиц молекулы гемоглобина (применяемые далее принятые [8] обозначения типа Cys93 указывают как номер остатка в полипептидной цепи, так и его принадлежность к α - или β -субъединице белка).

Чрезвычайно важная черта реакции гемоглобина с лигандами — кооперативность этого процесса, присущая только тетрамерам гемоглобина и связанная со сложными конформационными перестройками молекулы, важной частью которых является движение С-концевых аминокислотных

Сокращения: MetHbSH — метгемоглобин со свободными SH-группами; DeoxyHbSH — дезоксигемоглобин со свободными SH-группами; GSH — глутатион; HbSSG — смешанный дисульфид гемоглобина и глутатиона.

остатков всех четырех цепей. Любая модификация, мешающая этим перестройкам, приводит к снижению кооперативности оксигенации гемоглобина. Остаток Cys β 93 находится в непосредственной близости от С-конца β -цепей. Если еще учесть, что предшествующий ему остаток His β 92 образует химическую связь с атомом железа, то становится понятным, что модификация этого остатка не может не сказаться на свойствах гемоглобина.

Гемоглобин с модифицированными остатками Cys β 93 изучался неоднократно [7, 9, 10]. Было показано, что в зависимости от реагента в разной степени меняется кооперативность оксигенации, сродство к O₂, зависимость оксигенации от pH. Если тиоловый реагент образует ковалентный мост между спиральями гемоглобина, полностью запрещаая движение С-концевых остатков β -цепи, то оксигенация становится некооперативной. Если же движение С-конца возможно, но заторможено, то константа Хилла n_H , являющаяся мерой кооперативности, имеет значение между 1 (отсутствие кооперативности) и 2,7 (нормальный гемоглобин) [11]. С движением С-концевых остатков связана и разная реакционная способность SH-группы гемоглобина в лигандной и нелигандной конформациях. В нелигандной конформации остаток Cys β 93 прикрыт последними С-концевыми аминокислотными остатками β -цепи, что приводит к очень низкой активности сульфгидрильной группы. В лигандной конформации С-концевой фрагмент не заслоняет SH-группу.

В работе Риггса показано, что за 20 мин даже при 166-кратном избытке N-этилмалеимида только 30% дезоксигемоглобина присоединяет N-этилмалеимид [7], между тем как время полупериода реакции оксигемоглобина с этим реагентом меньше 3 мин [9]. Однако разные производные гемоглобина, находящиеся в лигандном состоянии, также имеют разную реакционную способность SH-групп, которая зависит от спинового состояния гема [12]. В низкоспиновых производных (CN-Hb⁺, HbCO) активность сульфгидрильной группы самая низкая, с увеличением спина она растет и для высокоспиновых производных (F-Hb⁺, H₂O-Hb⁺) достигает наивысшего значения. Это связано с тем, что образование высокоспинового гемоглобина вызывает сильное перемещение спирали F, так что остаток Cys β 93 оказывается снаружи глобулы. В низкоспиновых производных SH-группа выдвинута наружу глобулы значительно меньше, чем в высокоспиновых.

Свойства смешанного дисульфида гемоглобина и глутатиона аналогичны свойствам гемоглобина, модифицированного другими реагентами на SH-группы [13, 14]: сродство к O₂ в 0,2 М фосфатном буфере (в зависимости от pH) в 4–10 раз выше, чем у гемоглобина, со свободными SH-группами; константа Хилла уменьшена до 1,7; эффект Бора слабо снижен.

Чтобы объяснить изменение свойств гемоглобина при его модификации глутатионом, а также проследить, как меняется пространственная структура гемоглобина и глутатиона при образовании между ними дисульфидной связи, был проведен конформационный анализ дисульфида HbSSG.

Расчет проводился методом атом-атомных потенциальных функций в приближении жесткой геометрии с постоянными длинами связей и валентными углами. Внутримолекулярная энергия включала в себя энергию невалентных взаимодействий (потенциал Леннарда-Джонса), кулоновских взаимодействий и торсионную энергию боковых цепей. Диэлектрическая постоянная равнялась 10, так как нас интересовали процессы, происходящие на поверхности глобулы. Пробное уменьшение ее до 2 не приводило к качественно другой картине. В работе использовались координаты атомов метгемоглобина и дезоксигемоглобина лошади, любезно предоставленные проф. М. Ф. Перутцем (Кембридж, Англия). В качестве стартовых комбинаций углов глутатиона были использованы углы шести основных конформаций, полученных нами ранее для свободного глутатиона [15]. Отсчет углов и их обозначение соответствуют правилам IUPAC-IUB [16]. Для углов вращения по связям боковых цепей остатков Cys были взяты

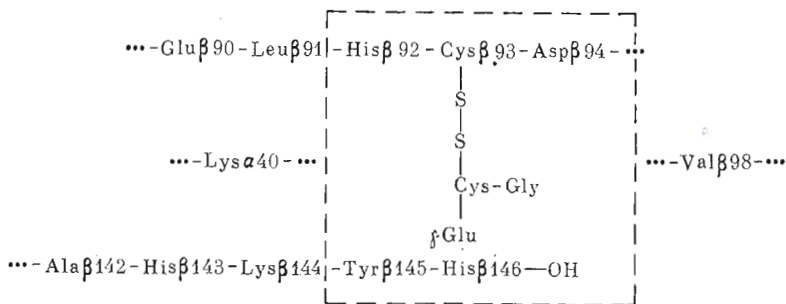


Рис. 1. Строение рассчитанной части молекулы смешанного дисульфида гемоглобина и глутатиона. Семь аминокислотных остатков, находящихся внутри пунктирной области, составляют малый фрагмент дисульфида, строение которого рассчитывали на первом этапе. Влияние остальных восьми остатков учитывалось на следующих этапах конформационного анализа дисульфида HbSSG

начальные комбинации с углами $\pm 60^\circ$, а для угла вращения вокруг связи S—S — три возможных начальных значения: ± 90 и 180° . Поскольку были рассмотрены конформации молекул, состоящих из разного числа атомов, сравнение проводилось по энергии, приходящейся на один аминокислотный остаток. Расчеты проводились в несколько этапов.

На первом этапе были отобраны четыре аминокислотных остатка метгемоглобина, которые, согласно третичной структуре, находятся в непосредственной близости от остатка Cys β 93 (рис. 1), и при условии жесткой структуры белка рассчитаны возможные конформации глутатиона (табл. 1). Разрешалось вращение вокруг всех связей боковой цепи Cys β 93 и вокруг всех одинарных связей глутатиона. Всего на данном этапе было рассчитано 280 разных конформаций фрагмента дисульфида HbSSG (далее — малый фрагмент). Более 200 из них были отброшены, так как их потенциальная энергия в расчете на один остаток превышала минимальную более чем на 4 ккал/моль и энергию этих конформаций нельзя снизить изменением пространственной структуры двух C-концевых остатков β -субъединицы. В табл. 1 перечислены все конформации глутатиона, дающие устойчивые структуры малого фрагмента дисульфида HbSSG. Анализ оставшихся конформаций показал, что пространственная структура глутатиона слабо отличается от его структуры в свободном состоянии. По углам χ^1 и χ^2 Cys β 93 определились три области допустимых значений: $150, 80^\circ$; $50, -100^\circ$; $0, 80^\circ$. Угол вращения вокруг связи S—S (χ_{SS}) имел три минимума вблизи всех взятых нами стартовых значений (± 90 и 180°).

На следующем этапе проверяли, надо ли учитывать другие аминокислотные остатки гемоглобина, кроме пяти, показанных на рис. 1. Для этого были рассчитаны расстояния между всеми парами атомов i и j , где i нумерует атомы гемоглобина, а j — глутатиона, во всех возможных конформациях. В результате этих расчетов были выделены те аминокислотные остатки, с которыми может контактировать глутатион. Оказалось, что необходимо учесть еще шесть аминокислотных остатков той же β -цепи и по крайней мере один остаток α -цепи — Lys α 40, аминогруппа которого образует слабую связь с концевой COO⁻-группой β -цепи дезоксигемоглобина (см. рис. 1).

Итак, на втором этапе был рассчитан фрагмент HbSSG, включающий 12 аминокислотных остатков гемоглобина. Белок по-прежнему считался жестким, т. е. вращение разрешалось вокруг связей боковой цепи остатка Cys β 93 и всех одинарных связей глутатиона. Добавление новых аминокислотных остатков гемоглобина привело к резкому сужению допустимой области по углам χ^1 , χ^2 остатка Cys β 93. Если на первом этапе по этим углам выделялись три области допустимых значений (см. табл. 1), то на втором допустимой осталась только первая область, да и та сместилась в область $\chi^1 \approx 150^\circ$. Кроме того, стерические условия запретили углу χ_{SS}

Возможные низкоэнергетические конформации глутатиона и боковой цепи остатка Cys93 β-субъединицы метгемоглобина в малом фрагменте смешанного дисульфида HbSSG *

| Двугранные углы (град.) остатков | | | | Начальные конформации глутатиона ** при значениях угла χSS, равных | | |
|----------------------------------|----------------|----------------|----------------|---|--------|------|
| Cysβ93 гемоглобина | | Cys глутатиона | | -90° | 90° | 180° |
| χ ¹ | χ ² | χ ² | χ ¹ | | | |
| 150 | 80 | 100 | 100 | 1R, 4R, 1B, 3B | — | — |
| 150 | 80 | -110 | 80 | 1B, 3B, 4B | — | 4R |
| 150 | 80 | 120 | -120 | + | 4R, 1B | — |
| 150 | 80 | -100 | -90 | + | 4B | + |
| 50 | -100 | 100 | 40 | + | + | — |
| 50 | -100 | 100 | -100 | — | + | — |
| 50 | -100 | -90 | -90 | + | 1R | — |
| 50 | -100 | -80 | 80 | 1B, 3B, 4B | — | — |
| 0 | 80 | 160 | 180 | R | 4R | — |
| 0 | 80 | -90 | -90 | + | — | — |

* В состав малого фрагмента дисульфида HbSSG включены также еще четыре ближайших аминокислотных остатка метгемоглобина (см. рис. 1), но конформация этих остатков при расчете потенциальной энергии фрагмента принималась жесткой.

** Теоретически возможны шесть низкоэнергетических конформаций глутатиона, обозначенных как 1R, 3R, 4R, 1B, 3B и 4B [15]. «+» означает, что все шесть начальных конформаций глутатиона дают стабильные конформации дисульфида, а «-» означает, что ни одна из шести стартовых конформаций глутатиона не ведет к устойчивым конформациям дисульфида.

принимать значения вблизи +90°. В результате из 70 конформаций, стабильных для малого фрагмента HbSSG, осталось только 28. Во всех устойчивых конформациях HbSSG глутатион находится снаружи глобулы, и области изменения всех углов вращения, включая и углы боковой цепи остатка Cys, довольно широкие и совпадают с разрешенными областями свободного глутатиона [15]. Дисульфидная связь находится в щели и прикрыта атомами белка.

Однако было бы неправильным ограничиваться случаем жесткого белка. Действительно, если внутри глобулы атомы упакованы довольно плотно, то внешние аминокислотные остатки обладают некоторой свободой. Особенно это относится к С-концевым остаткам гемоглобина, конформация которых в лигандном и нелигандном состоянии молекулы разная. Из рентгеноструктурного анализа известно [17], что в молекуле дезоксигемоглобина остаток Tyrβ145 находится в щели между спиралями F и H. Кроме ван-дер-ваальсовых сил фенольное кольцо удерживается там водородной связью между гидроксилом остатка Tyrβ145 и группой C=O пептидной связи остатка Valβ98. Расстояние в кристалле между этими атомами равно 3,8 Å. Имидазольное кольцо С-концевого гистидина (Hisβ146) образует солевой мостик с остатком Aspβ94, находясь от него на расстоянии 3,73 Å, а конечная COO⁻-группа — с аминогруппой лизина, принадлежащего α-субъединице (Lysα40). В результате конформационных переходов, происходящих при присоединении лиганда, щель между спиралями F и H сужается. Остаток Tyrβ145 выходит наружу, отодвигая остаток Hisβ146 и разрывая связи, которые образовывали тирозин и гистидин в дезоксигемоглобине. Поэтому следующим шагом явилось выяснение вопроса, какие двугранные углы отвечают за изменение конформации С-концевого фрагмента гемоглобина при присоединении к нему лиганда.

Для этого были изучены конформационные возможности фрагмента гемоглобина со свободными SH-группами как в лигандном (MetHbSH), так и в нелигандном (DeoxyHbSH) состоянии. Учитывались те же 12 аминокислотных остатков гемоглобина, что и для дисульфида HbSSG. Разрешалось вращение вокруг всех одинарных связей двух последних остатков:

Наиболее устойчивые расчетные конформации С-концевого дипептида гемоглобина Тугβ145 – Hisβ146 *

| № конформации | Состояние гемоглобина | Двугранные углы | | | | | | | | |
|---------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | Lysβ144 | Тугβ145 | | | | Hisβ146 | | | |
| | | | ψ | φ | ψ | χ ¹ | χ ² | φ | ψ | χ ¹ |
| 1 | DeoxyHbSH | 47 | -96 | 104 ^{3*} | -88 ^{3*} | -95 | -97 ^{3*} | 92 ^{3*} | 36 ^{3*} | -86 ^{3*} |
| 2 | | 60 ^{3*} | -97 | -7 | -86 ^{3*} | -94 | -71 ^{3*} | -40 ^{3*} | 52 ^{3*} | 84 ^{3*} |
| 3 | | 120 ^{3*} | -131 ^{3*} | -3 ^{3*} | -126 ^{3*} | 88 ^{3*} | -111 ^{3*} | 110 ^{3*} | 48 ^{3*} | 91 ^{3*} |
| 4 | DeoxyHbSH ^{2*} (кристалл) | 50 | -101 | 98 | -82 | -92 | -95 | -94 | 87 | 51 |
| 5 | MetHbSH | -53 | -73 | 80 | 36 ^{3*} | -82 ^{3*} | -120 | 138 | -142 | 83 ^{3*} |
| 6 | | -52 | -74 | 82 | 36 ^{3*} | -84 ^{3*} | -129 | -25 | 62 | 64 ^{3*} |

* При расчете потенциальной энергии фрагмента учитывалось также влияние еще 10 аминокислотных остатков, геометрия которых принималась жесткой (см. рис. 1). Данные для MetHbSH отвечают лигандному, а в DeoxyHbSH – нелигандному состоянию гемоглобина.

^{2*} Координаты атомов кристаллического DeoxyHbSH были любезно предоставлены проф. М. Перутцем (Кембридж, Англия).

^{3*} Область допустимых изменений угла превышает 60°.

Тугβ145 и Hisβ146, а также изменение угла ψ остатка Lysβ144, так как из рентгеноструктурных исследований известно, что именно два последних остатка меняют свою конформацию при присоединении лиганда к гемю.

В табл. 2 перечислены наиболее устойчивые конформации, полученные в результате анализа дезокси- и метгемоглобина. Оказалось, что самая устойчивая конформация дезоксигемоглобина фактически совпадает с кристаллической, хотя в расчете не учитывалась водородная связь остатков Тугβ145 и Valβ98. Ее учет приведет к тому, что эта конформация станет еще более выгодной, так что почти все молекулы дезоксигемоглобина примут эту уникальную конформацию.

Без учета водородной связи С-концевой фрагмент гемоглобина очень лабилен — области допустимых изменений по всем углам довольно широкие. Для метгемоглобина допустимые области почти по всем двугранным углам уже. Но основное различие конформаций дезокси- и метгемоглобинов заключается в значении угла ψ₁₄₄. Этот угол отрицателен для всех стабильных конформаций MetHbSH, а для DeoxyHbSH имеет широкую допустимую область при положительных значениях ψ₁₄₄.

На рис. 2 показана зависимость внутримолекулярной энергии гемоглобина от ψ₁₄₄. Для дезоксигемоглобина без учета водородной связи этот угол может иметь значения 30–150°. Введение в расчет водородной связи между тирозином-145 и валином-98 суживает этот интервал около ψ₁₄₄ ≈ 50°. В метгемоглобине допустимая область по углу ψ₁₄₄ значительно уже и лежит далеко от значений этого угла в дезоксигемоглобине. Существенно сокращена для метгемоглобина и область допустимых значений φ₁₄₅. Если для дезоксигемоглобина допустимыми были как R-, так и B-конформации остатка Тугβ145, то для метгемоглобина допустима область M'. Остальные углы С-концевого фрагмента имеют пересекающиеся допустимые области в лигандном и нелигандном состоянии, хотя у MetHbSH они обычно уже.

Таким образом, за изменение конформации С-концевого фрагмента β-цепей гемоглобина ответственно главным образом вращение вокруг связи С_α—С остатка Lysβ144, приводящее к расхождению атомов, между которыми в DeoxyHbSH образована водородная связь и солевые мостики, на довольно большие расстояния. Так, для конформации 5 (табл. 2) рас-

* Буквенные обозначения областей на конформационных картах как в работе [18].

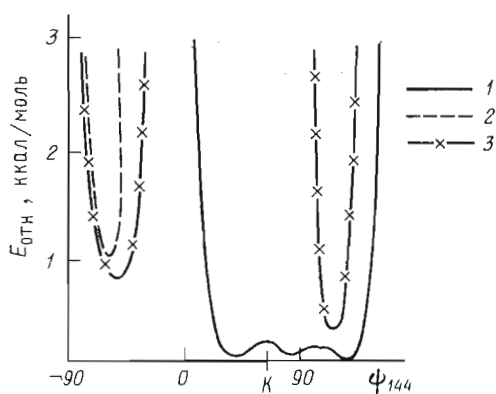


Рис. 2. Зависимость от угла ψ_{144} энергии молекул: дезокси-гемоглобина (1), метгемоглобина (2) и смешанного дисульфида гемоглобина и глутатиона (3). Буквой *K* отмечено значение угла ψ_{144} в молекуле кристаллического дезоксигемоглобина. По всем остальным углам проведена минимизация

стояние между атомами кислорода тирозина и валина составляет 13 Å, а между имидазолом остатка His146 и COO⁻-группой остатка Asp94 — 7 Å. При отрицательном значении угла ψ_{144} невозможно образование и солевого мостика между концевой COO⁻-группой β -субъединицы и аминокислотной группой боковой цепи остатка Lys40. Из многочисленных экспериментов (см., например, [17]) известно, что именно этот солевой мостик чрезвычайно важен для нормального протекания реакции оксигенации. Если его образование невозможно, то кооперативность процесса снижается.

Теперь, зная, изменения каких углов переводят С-концевой фрагмент β -цепей из нелигандной конформации гемоглобина в лигандную, мы можем перейти к последнему этапу — расчету фрагмента дисульфида HbSSG, у которого гибким является не только глутатион, но и часть молекулы белка. Разрешалось изменение тех же двугранных углов, что и на предыдущем шаге. В качестве начальных конформаций трех последних остатков β -субъединицы были взяты устойчивые конформации как в лигандном, так и в нелигандном состоянии β -цепи, полученные на предыдущем этапе (табл. 2).

Наиболее выгодные рассчитанные конформации фрагмента дисульфида HbSSG перечислены в табл. 3. Как и следовало ожидать, количество возможных конформаций дисульфида при условии гибкости белка больше, чем для жесткого. Так, например, по углам χ_{93}^1 и χ_{93}^2 появились новые допустимые области: -60 , 20 и -90 , 120° . Все возможные конформации HbSSG можно разбить на два типа. Для типа I (рис. 3а) характерны положительные значения угла ψ_{144} , для типа II (рис. 3б) — отрицательные. Минимум внутримолекулярной энергии дисульфида HbSSG при отрицательных значениях угла ψ_{144} (рис. 2) лежит выше, чем при положительных значениях, однако перевести молекулу дисульфида из конформаций 1–5 в 6 или 7 невозможно, так как глутатион ограничивает подвижность С-концевых остатков белка. Поэтому, если глутатион присоединится к гемоглобину, у которого угол ψ_{144} имел отрицательное значение, то дисульфид HbSSG останется в этой конформации, хотя она менее выгодна, чем другие.

Рассмотрим подробнее конформации типа I. Присоединение глутатиона переводит белок в состояние, пространственная структура которого отличается как от мет-, так и от дезоксигемоглобина. Угол ψ_{144} принимает значения в узком интервале допустимых значений вблизи 120° . Эта область лежит далеко от значений этого угла в метгемоглобине, но внутри области допустимых значений дезоксигемоглобина. Однако это не означает, что концевые остатки β -субъединицы гемоглобина могут образовывать

Наиболее устойчивые конформации фрагмента смешанного дисульфида глутатона и гемоглобина HbSSG из 15 аминокислотных остатков (рис. 1) *
Приведены значения двугранных углов, град.

| Номер конформации | E _{отн} , ккал/моль | С-концевой пептид гемоглобина | | | | Дисульфидный мостик | | | | Глутатион | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|-----|---------|------|---------------------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----|------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Lysβ144 | | Tyrβ145 | | Hisβ146 | | Cysβ93 | | χSS | | Cys глутатиона | | Gly | | Glu | | | |
| | | φ | ψ | φ | ψ | φ | ψ | χ ¹ | χ ² | χ ¹ | χ ² | φ | ψ | φ | ψ | χ ¹ | χ ² | χ ³ | χ ¹ |
| 1 | 0 | 123 | -89 | -32 | -120 | 81 | -136 | 80 | -159 | -150 | -174 | -92 | -26 | 178 | 0 | 175 | 178 | 478 | -132 |
| 2 | 0,5 | 122 | -87 | -38 | -100 | 21 | -160 | 65 | -116 | -54 | -125 | -87 | 143 | 171 | -1 | 115 | 171 | 120 | -125 |
| 3 | 0,8 | 121 | -87 | -34 | -128 | 85 | -153 | 43 | -164 | 88 | 72 | -100 | 155 | 176 | -7 | 78 | 176 | 88 | -131 |
| 4 | 0,81 | 123 | -88 | -30 | -127 | 76 | -152 | 35 | -162 | -163 | -113 | -63 | -42 | 178 | 0 | 85 | 178 | 94 | -139 |
| 5 | 1 | 122 | -90 | -32 | -120 | 77 | -155 | 32 | -168 | -148 | -92 | -61 | -46 | 181 | 1 | -83 | 181 | 120 | -146 |
| 6 | 0,5 | -65 | 33 | -108 | -60 | 153 | -140 | 60 | 160 | -120 | -100 | -94 | 141 | -160 | 40 | 81 | -160 | -117 | -110 |
| 7 | 1 | -67 | 31 | -104 | -65 | -37 | -141 | 65 | 165 | 84 | 113 | -100 | -33 | -147 | 5 | 93 | -147 | 95 | -135 |
| 8 | 1,7 | -49 | -7 | -77 | -95 | -9 | -167 | 52 | 152 | 94 | 65 | -98 | 153 | 173 | -20 | 65 | 173 | 88 | -139 |

* При расчете потенциальной энергии фрагмента допускалось изменение двугранных углов боковых цепей всех аминокислотных остатков, а также углов φ и ψ основной цепи глутатиона и С-концевого дипептида гемоглобина.

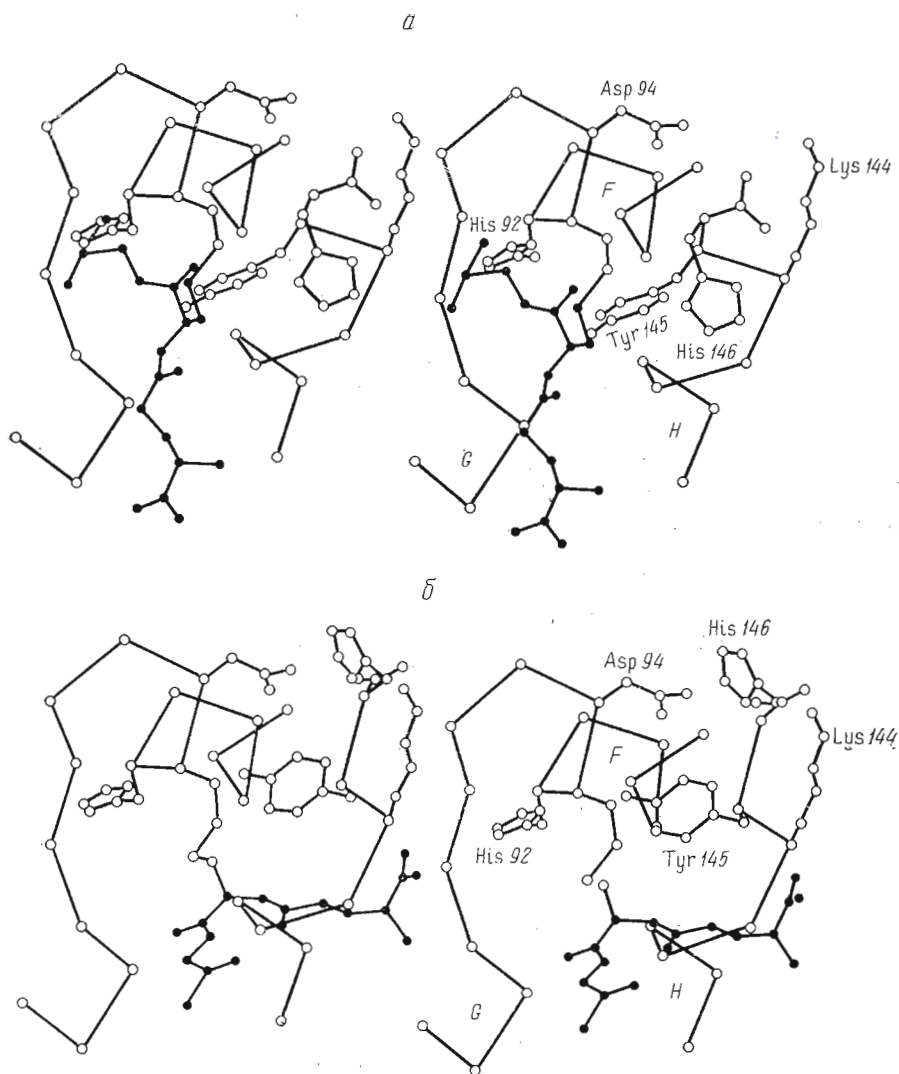


Рис. 3. Стереопроекции 15-звенного фрагмента смешанного дисульфида HbSSG в наиболее выгодных конформациях: типа I (а) и типа II (б). Для наглядности у большинства аминокислотных остатков β -субъединицы гемоглобина показаны только C_{α} -атомы. Подробная структура дана только для малого фрагмента, отмеченного на рис. 1 пунктиром. Черные кружочки — атомы связанного глутатиона. Буквами F, G и H отмечены спиральные участки β -субъединицы белка

связи, как в дезоксигемоглобине. Действительно, ни в одной стабильной конформации не обнаружено сближения групп, образующих солевые мостики в дезоксигемоглобине. Так, в конформации 3 (табл. 3) расстояние между OH-группой Tyr β 145 и группой C=O Val β 98 составляет 7,3 Å, между имидазолом His β 146 и COO⁻-группой Asp β 94 — 9 Å, а между NH₃⁺-группой Lys α 40 и концевой COO⁻-группой β -субъединицы — 6,5 Å. Для конформации 4 эти расстояния равны соответственно 7,1; 7,9; 6,5 Å.

Из рис. 4 видно, что в дезоксигемоглобине для остатка Tyr β 145 допустимы области R и B, однако они значительно меньше, чем для одиночного остатка Tyr. Для метгемоглобина эти углы имеют значения в довольно узкой области вблизи $-70, 80^\circ$. Для дисульфида HbSSG, имеющего конформацию типа I, область разрешенных значений углов ϕ_{145}, ψ_{145} очень узка и лежит внутри R-области. Сужены допустимые области и по всем другим углам C-концевого фрагмента. Это говорит о том, что присоединение глутатиона мешает конформационным перестройкам белка.

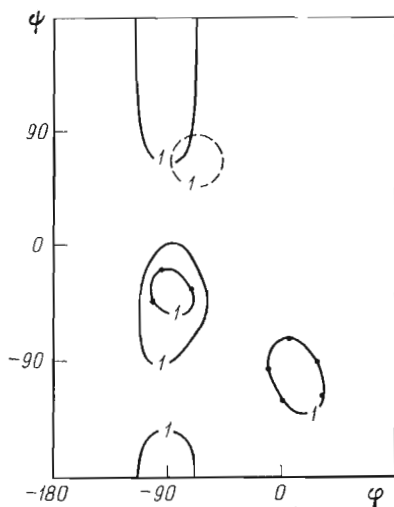


Рис. 4. Конформационные карты по углам φ и ψ остатка Tyr β 145 в дисульфиде HbSSG (штрихпунктир), дезоксигемоглобине (сплошная линия) и метгемоглобине (штрих)

0,2 ккал/моль (на один остаток), а для конформации 5 допустимы *B* и *R*, но обе очень вытянуты по углу φ ($-140^\circ \leq \varphi \leq 60^\circ$), что было невозможно для свободного глутатиона. Для некоторых конформаций сужены допустимые области для углов φ и ψ глицина; так, для конформации 1 запрещены положительные значения угла φ . Немного изменилась и структура остатка Glu: для всех полученных стабильных конформаций дисульфида HbSSG типа I положительные значения χ^3 стали менее выгодными, в то время как для глутатиона в наиболее стабильных конформациях угол $\chi^3 \approx 90^\circ$.

В целом отметим, что если для свободного глутатиона наиболее выгодной была квазициклическая структура молекулы, когда NH_3^+ -группа остатка Glu подходила довольно близко (на 4–5 Å) к COO^- -группе глицина, то в дисульфиде HbSSG конформация глутатиона более вытянута. Расстояние между его противоположно заряженными концевыми группами не уменьшалось ниже 8,1 Å (конформация 5), а обычно составляла 10–11 Å. Это легко объяснить, так как стабилизация квазициклической конформации глутатиона происходит за счет электростатического взаимодействия аминной и карбоксильной групп. В дисульфиде HbSSG эти группы взаимодействуют с многочисленными заряженными группами белка. Так, в конформации 3 NH_3^+ -группа остатка Glu взаимодействует с близко расположенной COO^- -группой остатка Asp β 99. Выше уже говорилось о том, что глутатион мешает образованию солевых мостиков между остатками гемоглобина. Однако сам глутатион образует многочисленные связи с заряженными группами белка. Например, в конформации 4 кислород пептидной связи глицина глутатиона расположен на расстоянии 3 Å от NH -группы пептидной связи Asp β 99, а в конформации 5 возможно образование водородной связи между OH -группой остатка Tyr β 145 и группой $\text{C}=\text{O}$ остатка Glu глутатиона.

Конформации дисульфида HbSSG типа II (рис. 3б) отличаются от описанных выше строением белковой части гемоглобина. Перевод угла ψ_{144} в область отрицательных значений привел к смещению областей допустимых значений углов φ и ψ остатка Tyr β 145 (см. рис. 4). Для одиночного остатка Tyr область с $\varphi \approx 0^\circ$ не является разрешенной, а для дисульфида HbSSG, имеющего $\psi_{144} \approx -50^\circ$, значения φ_{143} лежат только в этой области. Остальные двугранные углы C-концевого фрагмента β -субъединицы гемоглобина соответствуют углам HbSSG, имеющего конфор-

Дисульфидный мостик в молекуле HbSSG также является жестким образованием. Разрешенные области по углам вращения вокруг связей боковых цепей обоих остатков Cys представляют собой несколько узких областей, разделенных высокими барьерами. По углу χ_{ss} крутильные колебания происходят с амплитудой, не превышающей 10–20°. Отметим, что на этом этапе расчетов большинство выгодных конформаций имеют значение χ_{ss} в области -160° , т. е. в *транс*-положении, хотя для связи S–S это область максимума торсионного потенциала. Лишь 20% конформаций имели значение χ_{ss} вблизи -90° , и не было найдено ни одной с $\chi_{ss} \approx 90^\circ$.

Конформация глутатиона в дисульфиде HbSSG немного отличается от его конформации в свободном состоянии. По углам φ и ψ остатка Cys в зависимости от структуры белковой части выделяется *R*- или *B*-область. Так, для конформации 1 допустима только *R*-область; для конформации 2 *B*-область выгоднее *R* на

мации типа I. К каким изменениям в пространственной структуре молекулы HbSSG приведет такой набор двугранных углов? С-Концевой фрагмент β -цепи принимает конформацию, в которой остаток Tyr β 145 оказывается между остатками Leu β 88 и Leu β 141, в то время как в конформациях типа I остаток Tyr β 145 выходит наружу. Глутатион не дает возможности белку изменить свою конформацию, делает эту часть белка очень жесткой. Структура дисульфидного мостика очень похожа на его структуру в конформациях типа I, произошло лишь некоторое сужение допустимых областей, особенно по углам χ^1 и χ^2 остатка Cys β 93. Допустимая область угла χ_{ss} немного сдвинулась: если для конформаций типа I $\chi_{ss} = -160 \pm 10^\circ$, то для конформаций типа II $\chi_{ss} = 160 \pm 10^\circ$.

Значительно сузилась и допустимая область по углу ψ остатка Cys глутатиона: ширина как R^- , так и B^- областей (они имеют одинаковую энергию) не превышала 30° , между тем как у некоторых конформаций типа I она составляла $60-80^\circ$. Что же касается «крыльев» молекулы глутатиона, т. е. остатков Gly и Glu, то их конформации почти совпадают с конформациями, полученными для свободного глутатиона, за исключением того, что стала выгодной (в ряде конформаций самой выгодной) область $(-100, 100^\circ)$ по углам χ^2 , χ^3 остатка Glu. В глутатионе эта область имела более высокую энергию по сравнению с другими.

Так же как и у конформаций типа I, отсутствуют квазициклические структуры глутатиона: расстояние между концевыми группами составляет 11 \AA для конформации 6 и 10 \AA — для конформации 7. В конформации 6 возможно образование связей между имидазолом остатка His β 146 и COO^- -группой остатка Gly глутатиона, а также между NH_3^+ -группой остатка Glu глутатиона и карбоксильной группой остатка Asp β 99. В конформации 7 карбоксильная группа глицина глутатиона подходит на расстояние $3-4 \text{ \AA}$ к амидной группе пептидной связи, образованной остатком His β 97.

Таким образом, конформационный анализ дисульфида HbSSG показал, что конформация этой молекулы зависит от того, в каком состоянии находился гемоглобин во время образования дисульфида. Если глутатион присоединился к дезоксигемоглобину (а это возможно только при разрыве солевых мостиков С-конца молекулы), то в полученном дисульфиде гемоглобиновая и глутатионовая части дисульфида переплетаются и довольно активно взаимодействуют своими заряженными группами. В дисульфиде, полученном из метгемоглобина, взаимодействие гемоглобина и глутатиона слабее, так как глутатион выходит своими концами далеко наружу глобулы гемоглобина, а с белком тесно соприкасаются только атомы дисульфидного мостика и остатка Cys глутатиона. Однако и в этом случае возможно образование слабых связей между гемоглобином и заряженными группами глутатиона.

Изучив структуру дисульфида HbSSG, попытаемся объяснить его свойства, исследованные Хьюсманом и Дози [13] и Бирхмейером с соавт. [14]. Рассмотрим сначала кооперативность процесса оксигенации. Из расчетов следует, что глутатион препятствует образованию солевого мостика между α_2 - и β_1 -субъединицами гемоглобина (связь между NH_3^+ -группой остатка Lys α 40 и COO^- -группой концевого His β 146). Это хорошо согласуется с экспериментальными данными. Действительно, из работ [13, 14] известно, что присоединение глутатиона к гемоглобину приводит к значительному уменьшению константы Хилла (с 2,7 до 1,7). В то же время Кильмартин и Вуттон показали [19], что гемоглобин с удаленным остатком His β 146 имеет $n_H = 2,5$. Однако, как неоднократно указывал Перутц (см., например, [8]), такое незначительное снижение кооперативности в экспериментах Кильмартина отнюдь не говорит о ненужности этого мостика для нормальной протекания реакции оксигенации. Дело в том, что в гемоглобине без His β 146 солевой мостик с Lys α 40 может образовывать COO^- -группа Tyr β 145. Больше уменьшение кооперативности в HbSSG, как и в гемоглобинах, модифицированных некоторыми другими тиоловыми реагентами [7, 8], говорит о том, что в этих случаях мост $\beta_1-\alpha_2$ вообще не образуется.

Увеличение сродства дисульфида HbSSG к кислороду, обнаруженное Хьюсманом и Бирхмейером, тоже легко объяснить с помощью наших расчетов. Действительно, из них вытекает, что глутатион препятствует переходу β -субъединицы в нелигандную конформацию, загораживая С-концевым остаткам дорогу в щель между спиралью *F* и *H*. Кроме того, глутатион фиксирует лигандную конформацию тетрамера гемоглобина, мешая образованию β_1 - α_2 -контакта. Известно, что сродство гемоглобина к O_2 в оксиконформации значительно выше, чем в дезокси- [17]. Увеличение сродства при присоединении глутатиона объясняется в таком случае фиксацией молекулы гемоглобина в лигандной конформации.

Рассмотрим, наконец, изменение щелочного эффекта Бора (освобождение протонов при присоединении O_2 к гемоглобину при pH выше 6). Кильмартин и Вуттон показали [19], что удаление остатка His β 146 снижает щелочной эффект Бора на 50%, т. е. половина протонов, отделяемых от гемоглобина при оксигенации, принадлежит имидазольным кольцам остатка His β 146, а отделение их происходит при разрыве солевого мостика между остатками His β 146 и Asp β 94. В гемоглобине, к остатку Cys β 93 которого присоединен N-этилмалеимид, щелочной эффект Бора также уменьшен наполовину [19]. Однако в опытах Хьюсмана дисульфид HbSSG обладал щелочным эффектом Бора, лишь слабо отличающимся от эффекта самого гемоглобина. Этот результат можно объяснить тем, что в некоторых конформациях дисульфида HbSSG, полученных в этой работе, имидазол остатка His β 146 может образовывать солевые мостики не с Asp β 94, а с другими остатками.

Таким образом, глутатион смешанного дисульфида HbSSG препятствует образованию водородной связи с участием остатка Tyr β 145, но не мешает С-концевому остатку гистидина образовывать связи с заряженными группами. Например, в конформации 5, несмотря на то что связь Tyr β 145...Val β 98 образоваться не может (расстояние между группами 6,7 Å), гистидин подходит на 3,7 Å к карбоксильной группе остатка Asp β 94. Во всех полученных стабильных конформациях дисульфида подвижность этого остатка довольно велика: допустимые области по всем его двугранным углам довольно широкие и разделены невысокими барьерами. Итак, остаток His β 146 β -субъединицы HbSSG может образовывать солевые мостики. Структуры, стабилизированные солевыми связями с участием остатка His β 146, будут не столь устойчивы, как дезоксигемоглобин, стабилизированный еще и водородными связями, образованными остатком Tyr β 145, поэтому лишь часть молекул дисульфида HbSSG будет находиться в конформации с солевым мостиком, в котором участвует имидазол остатка His β 146. Это и приведет к щелочному эффекту Бора, промежуточному между эффектом Бора нормального гемоглобина и гемоглобина с удаленным остатком His β 146.

Итак, конформационный анализ смешанного дисульфида гемоглобина с глутатионом кроме установления пространственной структуры этого соединения позволил объяснить его биохимические свойства и показать на конкретном примере, каким образом происходит взаимная подстройка конформаций большой и малой молекул при их взаимодействии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968.
2. Kaplan J. C. Rev. eur. etud. clin. et biol., 1971, v. 16, № 6, p. 523–528.
3. Kosower N. S., Marikovsky Y., Wertheim B., Danon D. J. Lab. and Clin. Med., 1971, v. 78, № 4, p. 533–545.
4. Kosower E. M., Kosower N. S. Nature, 1969, v. 224, № 5215, p. 117–120.
5. Haest C. W., Kamp D., Denticke B. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 557, № 2, p. 363–371.
6. Coetzer T., Zail S. Blood, 1980, v. 56, № 2, p. 159–167.
7. Riggs A. J. Biol. Chem., 1961, v. 236, № 7, p. 1948–1954.
8. Perutz M. F. Nature, 1970, v. 228, № 5273, p. 726–739.
9. Garel M. C., Benzard J., Thillet J. Eur. J. Biochem., 1982, v. 123, № 3, p. 513–519.
10. Neyn S., Merishima J. Biochemistry, 1980, v. 19, № 2, p. 258–265.

11. Simon S. R., Arndt D. R., Konigsberg W. H. J. Mol. Biol., 1971, v. 58, № 1, p. 69-77.
12. Perutz M. F., Fersht A. R., Simon S. R., Roberts G. C. Biochemistry, 1974, v. 13, № 10, p. 2174-2186.
13. Huismans T. H. J., Dozy A. M. J. Lab. and Clin. Med., 1962, v. 60, № 2, p. 302-319.
14. Birchmeier W., Tuchschnid P. E., Winterhalter K. H. Biochemistry, 1973, v. 12, № 19, p. 3667-3672.
15. Сандалова Т. П., Белобров П. И. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1013-1021.
16. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. J. Mol. Biol., 1970, v. 52, № 1, p. 1-17.
17. Perutz M. F. Ann. Rev. Biochem., 1979, v. 48, p. 327-387.
18. Дашевский В. Г. Конформации органических молекул. М.: Химия, 1974.
19. Kilmartin J. V., Wootton J. F. Nature, 1970, v. 228, № 5273, p. 766-767.

Поступила в редакцию
14.XI.1983

CONFORMATIONAL ANALYSIS OF A HEMOGLOBIN-GLUTATHIONE MIXED DISULFIDE

SANDALOVA T. P., BELOBROV P. I.

*L. V. Kirensky Institute of Physics, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Krasnoyarsk*

Theoretical conformational analysis was carried out for a mixed disulfide of hemoglobin with glutathione. The conformational mobility of the β -subunit C-terminal fragment in methemoglobin and deoxyhemoglobin either with free or glutathione-blocked reactive SH-groups was examined. The most stable conformations of the mixed disulfide were delineated. Its spatial structure was shown to be dependent on the hemoglobin state prior to the S-S-bond formation: a disulfide made with deoxyhemoglobin had more closely interwoven hemoglobin and glutathione chains than the methemoglobin-derived disulfide. However, in both cases disulfide formation brought about the alterations in the spatial structure of hemoglobin as well as glutathione. The changes in the hemoglobin biochemical properties accompanying the association with glutathione were rationalized in the frames of the mixed disulfide structural analysis.