

УДК547.044:577.053:577.085.21

©Коллектив авторов

## ЭЛЕКТРОННАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ГЕМА ГЕМОГЛОБИНА С ОКСИДОМ АЗОТА И ДИНАМИКА АТОМНОГО ОСТОВА ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Т. А. РОМАНОВА<sup>1,3</sup>, П. О. КРАСНОВ<sup>1,2</sup>, П. В. АВРАМОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН, 660036, Красноярск,  
Академгородок, эл. почта: [paul@iph.krasn.ru](mailto:paul@iph.krasn.ru)

<sup>2</sup> Красноярский государственный университет

<sup>3</sup> Красноярский государственный аграрный университет

Полуэмпирическим квантово-химическим методом PM3 проведено сравнительное исследование атомной и электронной структур комплексов гема гемоглобина с кислородом и оксидом азота. Установлено, что в результате оптимизации геометрии межъядерное расстояние в молекулах лиганда значительно меняется. В молекуле кислорода при связывании с гемом длина связи кислород-кислород возрастает на 0,046 Å, в то время как в молекуле NO длина связи кислород-азот – на 0,064 Å, что указывает на более прочную химическую связь между NO и Fe гема. Исходя из значений суммарного заряда молекул, NO связан с железом гема ковалентно, а между кислородом и Fe формируются лишь слабые ион-дипольные взаимодействия. В комплексах гема с O<sub>2</sub>, орбитали атомов лиганда дают небольшой вклад в верхнюю заполненную и нижнюю вакантную орбитали, в то время как в комплексах с NO орбитали атомов лиганда существенно замешиваются в молекулярные орбитали комплекса, при этом неспаренный электрон молекулы NO переходит на *d*-орбиталь железа, формируя конфигурацию *d*<sup>7</sup>, а сама молекула оксида азота приобретает положительный заряд. Проведение молекулярно-динамических расчетов для всех комплексов при физиологической температуре (310K) показало, что существенно меняется не только эффективная геометрия комплексов, но и заселенность *p*-орбиталей атомов углерода и азота порфиринового кольца в результате тепловых молекулярных колебаний. В комплексах гема с NO (но не с O<sub>2</sub>) под действием температуры меняются относительные вклады *p*-орбиталей атомов азота и кислорода лиганда, *d*-орбиталей железа, что должно влиять на реакционную способность комплекса.

**Ключевые слова:** гем, оксид азота, электронная структура, квантово-химические методы, молекулярная динамика



**ВВЕДЕНИЕ.** Центральное место в литературе последних лет отводится оксиду азота (NO) как универсальному регулятору ключевых биохимических процессов [1-3]. Оказалось, что такая простая двухатомная молекула как оксид азота может выступать в качестве эндогенного регулятора. В отличие от других сигнальных молекул, оксид азота может влиять на клеточный метаболизм без участия каких-либо мессенджеров [4]. В качестве регулятора NO функционирует практически во всех тканях организма, непосредственно в которых и образуется при участии NO-синтаз в т.н. цикле оксида азота, где в качестве субстрата используется L-аргинин.

Одно из важных свойств данного соединения – способность с высоким сродством взаимодействовать с железом клеточных металлопротеинов. Так, взаимодействуя с активным центром гуанилатциклазы, оксид азота выступает в качестве вазодилататора [4].

В последние годы активно вводятся экспериментальные исследования энергетики, атомной и электронной структуры комплексов гема с различными лигандами, в числе которых и оксид азота [2,5,6]. Описаны не только особенности электронной структуры подобного класса соединений, но определены энергии диссоциации и ряд других термодинамических характеристик. Тем не менее, эти исследования так и не дают объяснений столь высокому сродству оксида азота с железопротеинами, хотя ответ на этот вопрос можете объяснить механизмы регуляции ряда биохимических процессов, протекающих при участии данного соединения. Остается невыясненной природа химической связи и характер изменений электронной структуры гема при образовании комплекса с оксидом азота.

В последнее время в теоретической молекулярной биологии для решения подобных задач все большее распространение получают квантово-химические методы, поскольку именно электронные аспекты процессов, протекающих в биологических системах, привлекают внимание исследователей. К сожалению, расчеты электронной структуры комплексов гема с лигандами встречаются в литературе достаточно редко и авторы, в большинстве случаев, не делают попыток связать полученные результаты с биологическими свойствами изучаемых объектов.

Целью настоящей работы явилось сравнительное теоретическое квантово-химическое и молекулярно-динамическое исследование электронной и атомной структур комплексов гема с молекулярным кислородом и оксидом азота и динамики их атомного остова при физиологической температуре.

**МЕТОДИКА.** Атомную и электронную структуры комплексов гема с лигандами исследовали полуэмпирическим квантово-химическим методом PM3.

Для теоретического исследования влияния температуры на динамику атомного остова (например, во время различного рода атомных перегруппировок и молекулярных колебаний) широкое применение нашел метод неэмпирической молекулярной динамики [7,8], который не требует введения эмпирических межмолекулярных и межатомных потенциалов для расчетов. Влияние физиологической температуры (310K) на атомные и электронные структуры комплексов исследовали методом неэмпирической молекулярной динамики в полуэмпирическом квантово-химическом потенциале PM3.

В работе использовалась демонстрационная версия программы HyperChem 5.1, позволяющая проводить расчеты соединений переходных элементов с использованием как *ab initio*, так и полуэмпирического потенциала метода PM3.



### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Геометрия комплексов

Согласно экспериментальным данным, комплекс молекулярного кислорода с железом гема может иметь два изомера (рис. 1). В первом изомере молекула кислорода координирована к железу гема горизонтально, во втором (рис. 1А) - одним атомом и находится под углом к плоскости порфиринового кольца, при этом последний изомер более стабилен [9,10].

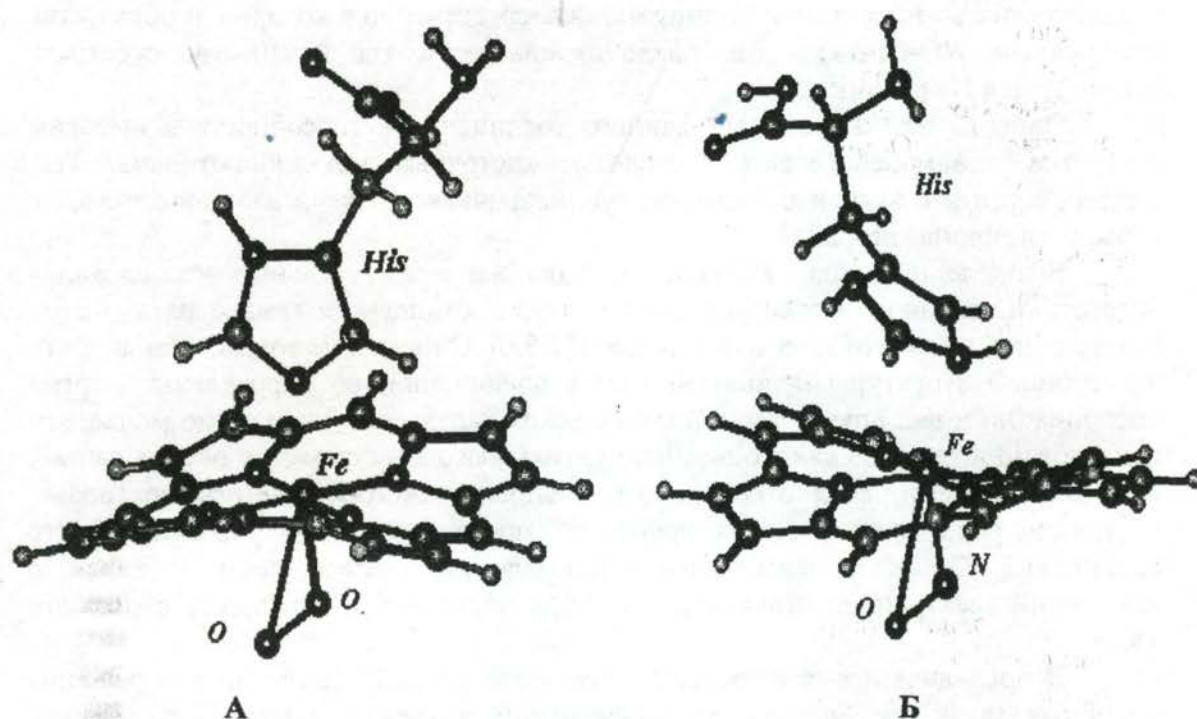


Рисунок 1.

Способы координации молекулы кислорода и оксида азота с гемом

С обеих сторон плоскости гема гемоглобина, «над» и «под» атомом железа, располагаются имидазольные кольца двух остатков гистидина (His). Один занимает восьмое положение в  $\alpha$ -спирали глобина и наиболее приближенный к атому железа (проксимальный). Атом азота имидазольного кольца His находится в контакте с атомом железа и образует с ним ковалентную связь.

Нами были рассчитаны комплексы гема с His в 5-ом координационном положении (проксимально относительно плоскости) и молекулами O<sub>2</sub> и NO в шестом (дистально относительно плоскости) положении. Ограничения по симметрии объектов не использовались, при этом порфириновое кольцо в процессе оптимизации геометрии приобретало форму «седла» (рис. 1), а отсутствие лиганда в 6-ом положении усиливало такой эффект.

Молекула NO, как и молекула O<sub>2</sub>, координирована под углом к плоскости гема через атом азота (рис. 1Б). Изменение межатомного расстояния в молекуле лиганда при исследовании геометрии комплексов позволяет судить об изменении силы химической связи между атомами, образующими лиганд, при образовании комплексного соединения. Согласно нашим расчетам, расстояние между Fe и азотом имидазольного кольца His практически не отличалось как при связывании гемом кислорода, так и оксида азота. Но межатомное расстояние в самой молекуле лиганда значительно менялось (таб. 1). Так, расстояние между атомами в



молекуле кислорода при связывании с гемом возрастало на 0,046 Å, в то время, как, межатомное расстояние в молекуле NO - на 0,064 Å, что указывает на более прочную химическую связь между молекулой NO и Fe гема.

Таблица 1. Геометрическая структура комплексов гема с His и лигандами в шестом координационном положении

Комплекс	Fe-O1	Fe-O2	Fe-N <sub>ак</sub>	O1 - O2
O <sub>2</sub>	-	-	-	1,169
Гем+His+O <sub>2</sub> (∠)	1,814	2,265	1,881	1,215
	Fe-N	Fe-O	Fe-N <sub>ак</sub>	N - O
NO	-	-	-	1,129
Гем+His +NO	1,848	1,971	1,882	1,193

Примечание: O1 и O2 - атомы молекулы кислорода, N<sub>ак</sub> - атом азота имидазольного кольца His, ... + O<sub>2</sub> (∠) - молекула кислорода координирована под углом к плоскости порфиринового кольца

#### Эффективные атомные заряды комплексов гема с лигандами

Заряд железа в комплексе гема с O<sub>2</sub> существенно выше, чем в комплексе с NO (рис.2). Атом кислорода, координированный с железом гема, имеет положительный заряд и соизмерим с зарядом атома азота в комплексе с NO.

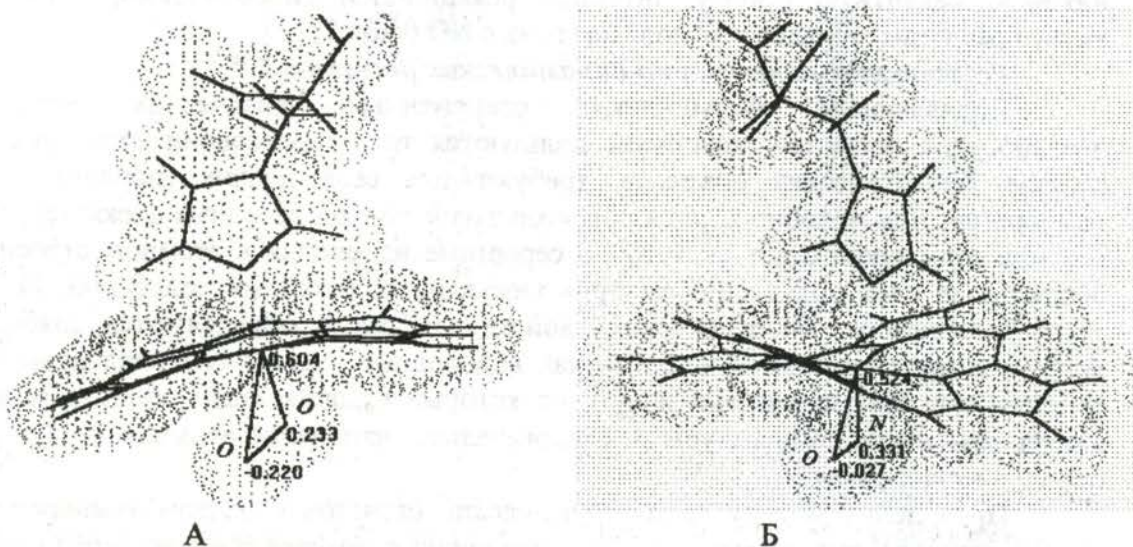


Рисунок 2.

Заряды атомов кислорода и оксида азота в комплексе с гемом

Исходя из значений суммарного заряда молекулы лиганда, можно сделать вывод, что молекула кислорода поляризуется, т.к. ее суммарный заряд близок к нулю, в то же время в молекуле NO он приблизительно равен + 0,3, что указывает на значительное перераспределение заряда с NO на порфириновую плоскость. Следовательно, молекула NO связана с железом гема ковалентно, а между кислородом и Fe формируются лишь слабые ион-дипольные взаимодействия.

#### Электронное строение

Структуры верхних заполненных и нижних вакантных орбиталей комплексов гема с молекулой O<sub>2</sub> и NO в основном сформированы p-орбиталями атомов углерода и азота порфиринового кольца. Доли остальных атомных



орбиталей, участвующих в формировании данных молекулярных орбиталей относительно малы (результаты не представлены). Замена кислорода на оксид азота приводит к увеличению вклада  $d$ -орбиталей в верхнюю заполненную и нижнюю вакантную орбиталь Fe, что в свою очередь также указывает на более прочное взаимодействие Fe с NO, чем с O<sub>2</sub> (табл. 2).

Таблица 2. Парциальные вклады  $d$ -орбиталей Fe в верхнюю заполненную и нижнюю вакантную молекулярные орбитали в комплексах гема с лигандами

$d$ -орбитали Fe	Гем-His-O <sub>2</sub>	Гем-His-NO
Верхняя заполненная орбиталь комплекса	0,70%	1,15%
Нижняя вакантная орбиталь комплекса	0,34%	1,50%
$\Delta E$ (эВ)	5,84	2,53

Примечание: % -парциальные вклады  $d$ -орбиталей Fe в молекулярные орбитали комплексов,  $\Delta E$  (эВ) - величина энергетической щели.

Реакционная способность комплексов зависит, в частности, от величины энергетической щели ( $\Delta E$ ) или энергетического расщепления между верхней заполненной и нижней вакантной орбиталями. Чем меньше величина этой щели, тем выше реакционная способность комплекса, что связано с уменьшением энергии возбуждения системы при переходе электрона с верхней заполненной на нижнюю вакантную орбиту. Большей реакционной способностью, согласно нашим расчетам, обладают комплексы гема с NO (табл.2).

#### *Результаты молекулярно-динамических расчетов*

Подавляющее большинство современных физических методов исследования вещества, которыми пользуются при определении структуры и свойств биологических объектов, требуют для себя низких (порядка 77K) температур. Для подобного рода объектов такой подход не всегда адекватен, так как при этом происходят достаточно серьезные изменения в атомном строении вещества за счет подавления внутримолекулярных тепловых колебаний. Более того, большинство биологических свойств как раз и определяются слабыми типами химических связей (такими как водородные, различного типа донорно-акцепторные взаимодействия и пр.), на которые кардинальным образом может влиять изменение температуры и, следовательно, изменение атомной структуры биологических объектов.

Проведение молекулярно-динамических расчетов с учетом температуры (310K) показало, что существенно, по сравнению с температурой жидкого гелия, меняется не только эффективная геометрия комплексов (в среднем на 0,06Å, данные не представлены), но и заселенность  $p$ -орбиталей атомов углерода и азота порфиринового кольца. В комплексах гема с NO под действием температуры меняются относительные вклады  $p$ -орбиталей атомов азота и кислорода лиганда (NO),  $d$ -орбиталей железа (рис. 3). На данном рисунке представлена электронная структура набора стоп-кадров динамического кино, смоделированного при температуре 310K. Пик с энергией около -4 эВ соответствует верхней заполненной орбитали. Видно, что при температуре 310K меняются парциальный вклад  $d_{z^2}$ -орбитали в ее плотность. В комплексе гема с O<sub>2</sub> таких изменений во вкладах и положении  $d$ -орбиталей не наблюдалось.

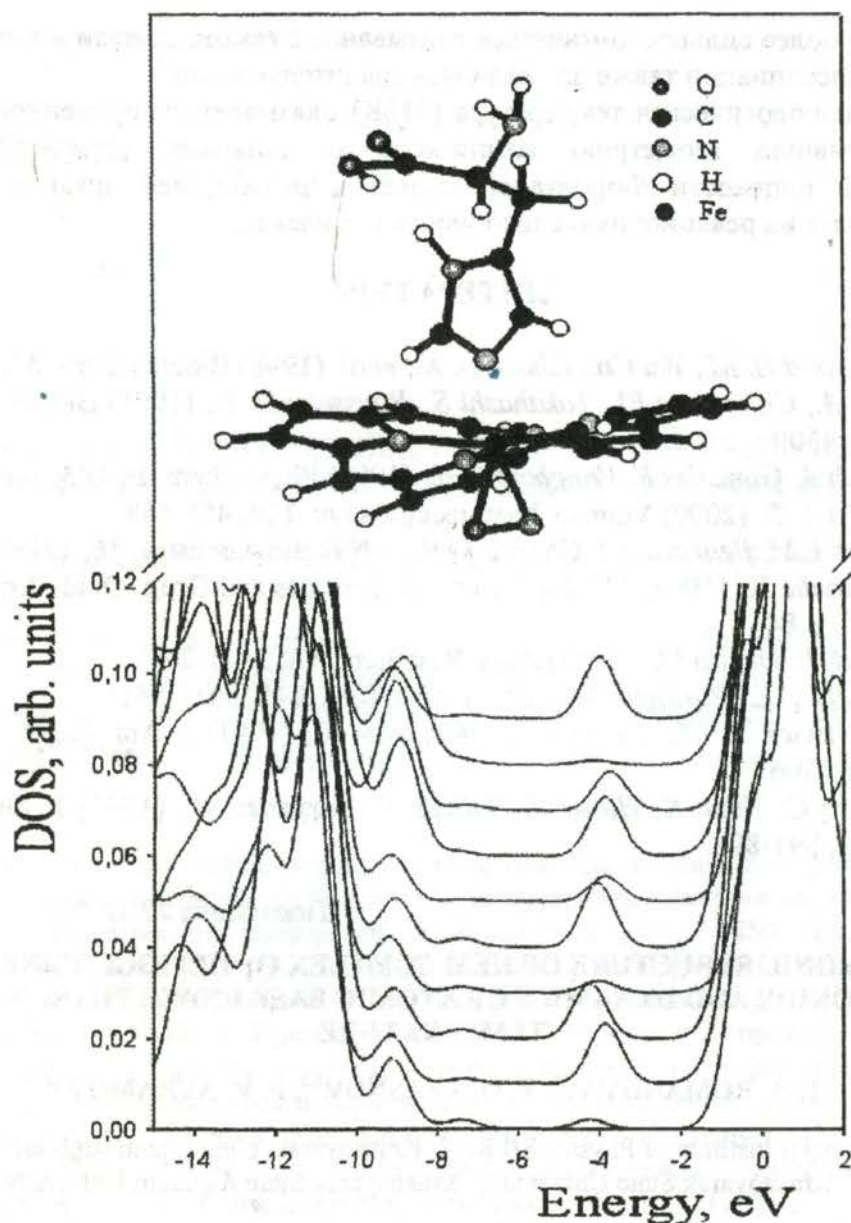


Рисунок 3.

Плотности состояний  $d_{22}$ -орбиталей железа в комплексе гема с His и оксидом азота под влиянием температуры (310K), рассчитанные для набора из 10 стоп-кадров динамического кино

На основании проведенных расчетов мы можем сделать следующие выводы:

1. Энергетическая щель в комплексах гема с NO в 1,5 раза меньше, чем в комплексах с O<sub>2</sub>, что говорит о большей реакционной способности первых.

2. В комплексах гема с O<sub>2</sub>, орбитали атомов лиганда дают небольшой вклад в верхнюю заполненную и нижнюю вакантную орбитали, в то время как, в комплексах с NO орбитали атомов лиганда существенно замешиваются в молекулярные орбитали комплекса, при этом неспаренный электрон молекулы NO переходит на  $d$ -орбиталь железа, формируя конфигурацию  $d^7$ , а сама молекула оксида азота приобретает положительный заряд. Следовательно, молекула NO



испытывает более сильное химическое связывание с гемом, нежели молекула O<sub>2</sub> и константа диссоциации также должна быть значительно выше.

3. Физиологическая температура (310K) оказывает существенное влияние на эффективную геометрию комплексов и вызывает перераспределение электронной плотности *d*-орбиталей железа и *p*-орбиталей лиганда NO, что должно влияет на реакционную способность комплекса.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Abu-Soud H. M., Wu Ch., Ghosh D. K., et al. (1998) *Biochemistry*, **37**, 3777-3786.
2. Boffi A., Chiancone EL, Takahashi S., Rousseau D. L., (1997) *Biochemistry*, **36**, 4505-4509.
3. Ghosh A, Gonzales E, Vangberg T. J., (1999) *Phys. Chem. B*, **103**, 1363-1367.
4. Ванин А. Ф. (2000) *Успехи физических наук*, **170**, 455-458
5. Miller L.M, Pedraza A.I. Chance M.R, (1997) *Biochemistry*, **36**, 12199-12207.
6. Watanabe Y., (1996) 11<sup>th</sup> Int. Symp. Microsomes and Drug. Oxid., Los Angeles, Calif., p.84.
7. Car R, Parinello M., (1985) *Phys. Rev. Lett.*, **55**, 2471-2483.
8. Bloechl P.E., Parinello M., (1992) *Phys. Rev. B***45**, 9413-9419.
9. Proniewicz. L. M., Paeng I. R., Nakamoto K., (1991) *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3294-3306
10. Rovira C, Kunc K. Hutter J. Ballone P. Parinello M., (1997) *J. Phys. Chem. A***101**, 891-898.

Поступила 27.12.00.

### ELECTRONIC STRUCTURE OF HEM COMPLEX OF HEMOGLOBINE WITH NITRIDE OXIDE AND DYNAMICS OF ATOMIC BASE UNDER PHYSIOLOGICAL TEMPERATURE

T. A. ROMANOVA<sup>1,3</sup>, P. O. KRASNOV<sup>1,2</sup>, P. V. AVRAMOV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Kirenskii Institute of Physics SB RAS, Krasnoyarsk, e-mail: paul@iph.krasn.ru

<sup>2</sup> Krasnoyarsk State University, <sup>3</sup>Krasnoyarsk State Agrarian University

The comparative study of atomic and electronic structure of hem complexes of hemoglobine with molecular oxygen and nitric oxide has been performed by semiempirical quantum chemical PM3 method. It has been shown that the length of chemical bonding in oxygen molecule coordinated with hem increases by 0.046 Å and the length of chemical bonding in nitrogen oxide coordinated with hem increases by 0.064 Å in comparison with pure substances. This fact indicates that chemical bonding between nitric oxide and Fe atom of hem is stronger that one with oxygen molecule. Analysis of charge of the molecules indicates that NO bounded with Fe by covalent chemical bonding and oxygen molecule bounded with Fe by weak dipole interaction. Atomic orbitals of ligand atoms in oxygen complex play small part in high occupied (HOMO) and low vacant (LVMO) molecular orbitals in comparison with HOMO and LVMO of complex with NO. In the last one unpaired electron of NO molecule moves from ligand to *d*-orbitals of Fe atom and creates *d*<sup>7</sup>-configuration. Molecular dynamics simulation under physiological temperature (310K) indicates visible difference in atomic and electronic structure of the complexes in comparison with ones under low (from 77 up to 0 K) temperatures.

**Key words:** hem, nitric oxide, electronic structure, quantum-chemical methods, molecular dynamics