

02

Моделирование дополнительных центров связывания ионов железа в гемоглобине методом XANES-спектроскопии

© Е.В. Пронина, М.А. Кременная[¶], В.Ю. Лысенко, Г.Э. Яловега

Южный федеральный университет, Физический факультет,
Ростов-на-Дону, Россия

[¶]e-mail: kremennaya@sfedu.ru

Поступила в редакцию 19.05.2023 г.

В окончательной редакции 28.07.2023 г.

Принята к публикации 31.10.2023 г.

Проведена оценка вкладов дополнительных Fe-связывающих центров в гемоглобине и гемового железа в экспериментальный спектр гемоглобина, подвергнутого влиянию мочевины, на основе теоретического анализа экспериментальных спектров рентгеновского поглощения. Рассчитаны теоретические спектры рентгеновского поглощения за K-краем железа для структурных моделей предполагаемых дополнительных центров связывания и гема. С помощью процедуры линейной комбинации теоретических спектров установлено, что в обработанном гемоглобине с большей вероятностью ионы железа кроме гема располагаются в дополнительном Fe-связывающем центре, имеющем в своем окружении аминокислоты цистеин-93, гистидин-146 и аспарагин-94 (Cys93, His146, Asp 94).

Ключевые слова: гемоглобин, XANES, дополнительные центры связывания железа, эндогенные токсиканты.

DOI: 10.61011/OS.2023.11.57000.4930-23

Одной из самых значимых белковых структур для жизнедеятельности человека является гемоглобин. При нарушении обменных процессов в организме токсикантами становятся физиологические продукты обмена в повышенных дозах, например мочевина. Под воздействием таких неблагоприятных факторов наблюдается нарушение пространственной структуры белков, приобретает способность образовывать комплексы с переходными металлами (Zn, Fe, Cd, Ni). В результате в клетке возникают стабильные белковые агрегаты со сниженной функциональной активностью [1,2].

Спектроскопия рентгеновского поглощения в ближней к краю области (X-Ray Absorption Near Edge Structure — XANES) является перспективным инструментом для изучения биологических систем [3,4]. Новые возможности изучения механизмов нарушений функций белковых молекул при патологических состояниях открывают модельные эксперименты на отдельных молекулах в условиях, воспроизводящих действие эндогенных (возникающих вследствие внутренних причин) токсикантов в организме. В работах [5,6] на основе данных спектроскопии XANES белковых пленок была показана их способность к связыванию ионов металлов под воздействием повреждающих факторов дополнительными связывающими центрами в структуре белков. В настоящей работе метод теоретического анализа спектров XANES за K-краем железа был использован для определения локальной атомной структуры окружения Fe-связывающих центров в гемоглобине.

Методы

Структурные данные гемоглобина были взяты из Protein Data Bank (PDB) [7]. Для структурной модели плоскости гема (порфириновое ядро, содержащее железо) использована структура 3ODQ, для Fe-связывающих центров — 1BZ1. Для этих моделей проведена процедура геометрической оптимизации полной энергии системы на основе теории функционала электронной плотности (Density Functional Theory - DFT) с использованием обменно-корреляционного потенциала B3LYP и базисного набора TZP в программе ADF. Теоретический анализ спектров XANES для K-краев железа проводился методом конечных разностей в полном потенциале в программе FDMNES [8]. Размер расчетных кластеров составлял 6 Å. К спектрам применена процедура лоренцевой свертки для учета эффектов уширения.

Результаты и обсуждение

В работе [9] для количественной оценки содержания ионов металлов, связанных молекулами интактного (исходный гемоглобин, без обработки) и обработанного мочевиной гемоглобина (далее — обработанный гемоглобин), использовалась интенсивность выхода флуоресценции ионов серы из аминокислотных остатков цистеина и метионина. Сравнение интенсивностей пиков SK_{α} и FeK_{α} ($R_{Fe/S}$) для интактного и обработанного гемоглобина составило 0.44 и 0.56 соответственно, что превышало значения $R_{Fe/S}$ для гемоглобина (0.33). Это указывало на появление дополнительных центров связывания ионов

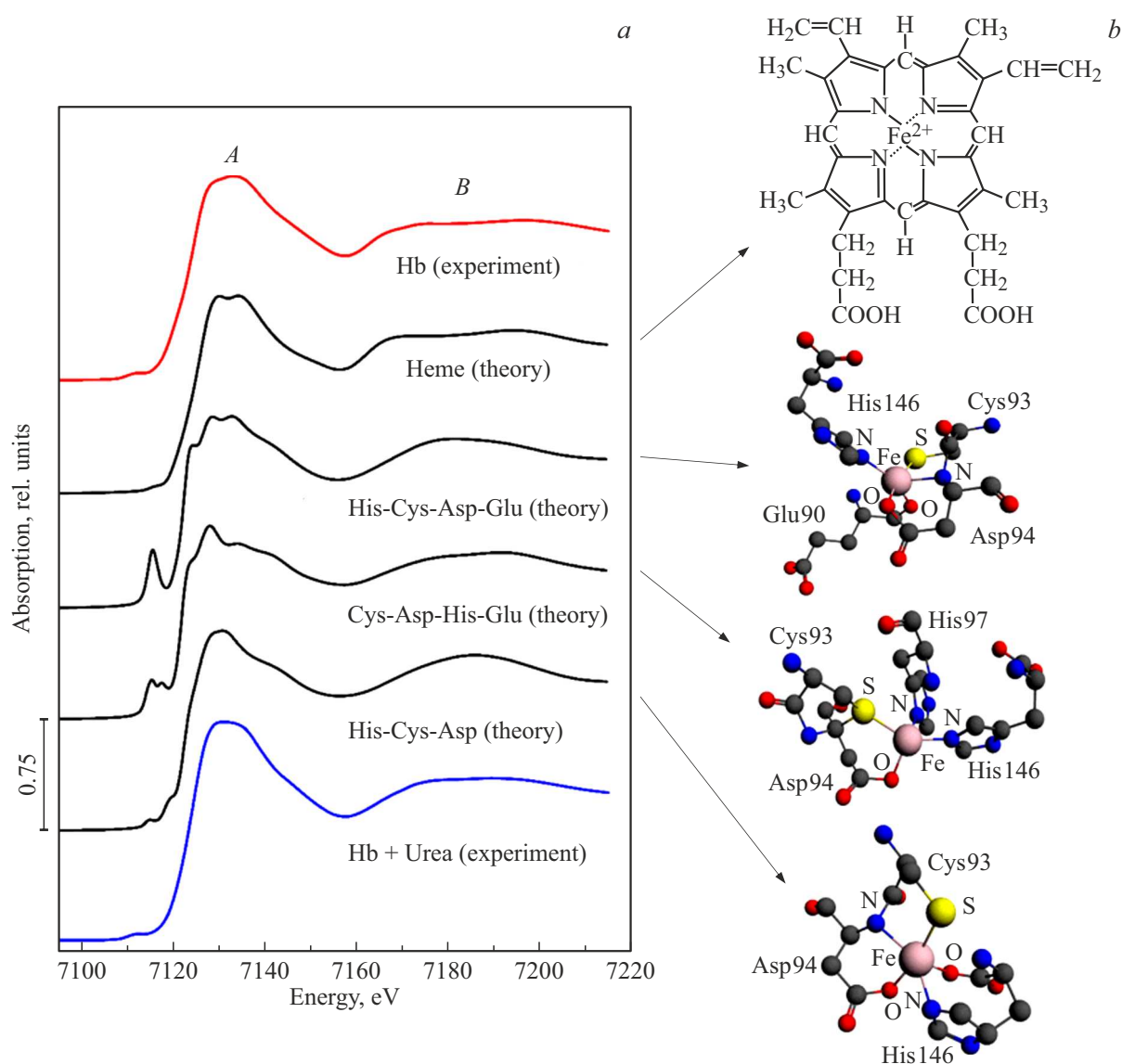


Рис. 1. Экспериментальные спектры XANES за K -краем Fe интактного и обработанного гемоглобина (из работы [9]) в сопоставлении с теоретическими спектрами для структурных моделей гема и Fe-связывающих центров (а); структурные модели (b). Hb — Hemoglobin (Гемоглобин), Hb+Urea — гемоглобин, обработанный мочевиной.

Fe в гемоглобине, кроме гема, после его обработки мочевиной.

Способность к связыванию ионов металлов (Fe и Zn) аминокислотами обсуждалась в работах [5,10]. Известно, что в большинстве белков ($\sim 90\%$) ионы цинка координированы с цистеином (Cys), гистидином (His), остатками аспарагина (Asp) и глутамина (Glu) [11,12]. На основе этих данных для теоретического анализа экспериментальных спектров XANES были построены структурные модели гема и Fe-связывающих центров, содержащих комбинации аминокислот (Cys93, His146, Asp 94), (Cys93, His146, Glu90, Asp94), (Cys93, His146, Asp94, His97) (рис. 1, b). В модельных структурах (Cys93, His146, Asp 94), (Cys93, His146, Glu90, Asp94) железо координировано серой (Cys), двумя азотами

(His/Asp), двумя кислородами (Asp/Glu/Cys). В модели (Cys93, His146, Asp94, His97) железо координировано серой (Cys), двумя азотами (His), кислородом (Asp). Для полученных моделей были рассчитаны спектры XANES и сопоставлены с экспериментальными данными (рис. 1, a).

Как можно видеть из рис. 1, a, с экспериментальным спектром интактного гемоглобина хорошо согласуется теоретический спектр, рассчитанный для иона Fe в геме, что соответствует $R_{Fe/S} = 0.44$ для интактного гемоглобина. Для количественной оценки вкладов в спектр XANES обработанного гемоглобина от Fe в геме и предполагаемых дополнительных Fe-связывающих центров была проведена процедура линейной комбинации теоретических спектров XANES (рис. 2). Из рис. 2

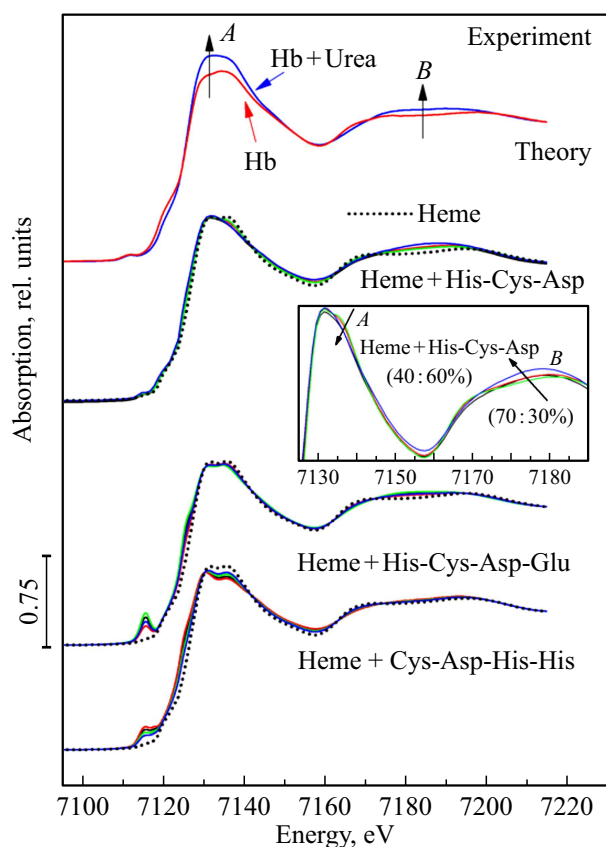


Рис. 2. Экспериментальные спектры XANES за *K*-краем железа в интактном и обработанном гемоглобине [9] в сопоставлении с линейными комбинациями теоретических спектров для структурных моделей. Вставка: тенденция изменения теоретических спектров при различных весах гема и модели Fe-связывающего центра (Cys93, His146, Asp 94). Hb — Hemoglobin (Гемоглобин), Hb+Urea — гемоглобин, обработанный мочевиной.

следует, что различия в экспериментальных спектрах интактного и обработанного гемоглобина выражаются в росте интенсивности и изменении формы белой линии *A* и пика *B*. Спектр XANES — это усредненный спектр от всех ионов Fe, находящихся в образце, следовательно, он представляет собой суперпозицию сигналов от ионов Fe, находящихся в плоскости гема и дополнительных центрах связывания. Наблюдаемые различия связаны с изменением соотношения гемовое Fe/Fe-связывающие центры. Таким образом, спектр интактного гемоглобина должен в большей мере отражать локальное окружение ионов Fe в геме ($R_{\text{Fe/S}} = 0.44$), а в спектре обработанного гемоглобина должен присутствовать сигнал от дополнительных Fe-связывающих центров, что и подтверждается результатами линейной комбинации.

На рис. 2 показано, что тенденцию изменения экспериментальных спектров лучше отражает комбинация теоретических спектров гема и структурной модели (Cys93, His146, Asp 94), что подтверждает наибольшую вероятность присутствия этих аминокислот в окружении

дополнительного Fe-связывающего центра. На вставке приведена тенденция изменения спектров при различных соотношениях весов. Для теоретического спектра гема характерно деление максимума *A*, при увеличении веса компоненты структурной модели (Cys93, His146, Asp 94) наблюдается тенденция к исчезновению двойного пика и совпадение формы пика с экспериментальным. Так же для пика *B* с увеличением вклада Fe-связывающей модели наблюдается рост интенсивности, как и для экспериментальных спектров. Для структурных моделей (Cys93, His146, Glu90, Asp94) и (Cys93, His146, Asp94, His97) данная тенденция для пиков *A* и *B* не наблюдается. Более того, наблюдается интенсивный рост спектральной особенности в предкраевой области.

Заключение

Проведена оценка вкладов дополнительных Fe-связывающих центров в гемоглобине и гемового железа в экспериментальный спектр гемоглобина, подвергнутого влиянию мочевины. Показана тенденция изменения результирующих теоретических спектров гема и предполагаемых Fe-связывающих центров (Cys93, His146, Asp 94), (Cys93, His146, Glu90, Asp94), (Cys93, His146, Asp94, His97), полученных в результате линейной комбинации при различных весах. Установлено, что в обработанном гемоглобине с большей вероятностью ионы Fe, кроме гема, располагаются в дополнительном Fe-связывающем центре, имеющем в своем окружении аминокислоты цистеин-93, гистидин-146 и аспарагин-94 (Cys93, His146, Asp 94).

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ N 19-29-12052 МК.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] S. Reeg, T. Grune. *Antioxid. Redox Signal.*, **23** (3), 239 (2015). DOI: 10.1089/ars.2014.6062
- [2] J.S. Cristóvão, B.J. Henriques, C.M. Gomes. *Protein Misfolding Diseases. Methods in Molecular Biology* (Humana New York, N.Y., 2019), vol. 1873, p. 3–18. DOI: 10.1007/978-1-4939-8820-4
- [3] D. Motz, S. Praetz, C. Schlesiger, J. Henniges, F. Böttcher, B. Hesse, H. Castillo-Michel, S. Mijat, W. Malzer, B. Kanngießer, C. Vogt. *J. Anal. At. Spectrom.*, **38** (2), 391 (2023). DOI: 10.1039/D2JA00351A
- [4] G.E. Yalovega, M.A. Kremennaya. *Crystallogr. Rep.*, **65** (6), 813 (2020). DOI:10.1134/S1063774520060395

- [5] N.N. Novikova, M.V. Kovalchuk, E.A. Yurieva, O.V. Konvalov, N.D. Stepina, A.V. Rogachev, G.E. Yalovega, O.V. Kosmachevskaya, A.F. Topunov, S.N. Yakunin. *J. Phys. Chem. B*, **123** (40), 8370 (2019). DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b06571
- [6] O.V. Konvalov, N.N. Novikova, M.V. Kovalchuk, G.E. Yalovega, A.F. Topunov, O.V. Kosmachevskaya, E.A. Yurieva, A.V. Rogachev, A.L. Trigub, M.A. Kremennaya, V.I. Borshevskiy, D.D. Vakhrameev, S.N. Yakunin. *Materials*, **13** (20), 4635 (2020). DOI: 10.3390/ma13204635
- [7] PDB-Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/>
- [8] Y. Joly. *Phys. Rev. B*, **63** (12), 125120 (2001). DOI: 10.1103/PhysRevB.63.125120
- [9] Н.Н. Новикова, С.Н. Якунин, М.В. Ковальчук, Э.А. Юрьева, Н.Д. Степина, А.В. Рогачев, М.А. Кременная, Г.Э. Яловега, О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов. *Кристаллография*, **64** (6), 931 (2019). DOI: 10.1134/S0023476119060134
- [10] K.B. Shumaev, O.V. Kosmachevskaya, A.A. Timoshin, A.F. Vanin, A.F. Topunov. *Methods in Enzymology. Globins and Other Nitric Oxide-Reactive Proteins, Part A* (Academic Press, 2008), **436**, p. 445–461. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)36025-X
- [11] M. Padjasek, A. Kocyla, K. Kluska, O. Kerber, J.B. Tran, A. Krężel. *J. Inorg. Biochem.*, **204**, 110955 (2020). DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110955
- [12] S.M. Ireland, A.C. Martin. *Database*, 2019, baz006 (2019). DOI: 10.1093/database/baz006