

Компьютерное моделирование пространственной структуры цитохрома с методами МД и АНИС.

Островерхова Т.В., Черткова Р.В., Некрасов А.Н.

В работе проведены исследования, направленные на выяснение механизма, обеспечивающего выведение атома Fe из плоскости гема цитохрома с. Для этого при помощи методов компьютерного моделирования конструировали мутантные варианты цитохрома с, имеющие сниженные способности к переносу электрона. Мутантные варианты цитохрома с были получены в препаративных количествах, были исследованы их биологические свойства.

Введение

Методы компьютерного моделирования получили широкое распространение при решении классических и инновационных биологических задач. Применение методов компьютерного моделирования позволяет значительно ограничить возможные варианты решения при постановке реального эксперимента и сделать прогноз относительно конечных результатов исследовательского проекта. Целью настоящего проекта является изменение структурных характеристик цитохрома с, направленное на ограничение способности этого белка к электронному транспорту. Для достижения поставленной цели на начальной стадии использовались методы компьютерного моделирования.

Пространственная структура цитохрома с включает в себя гем типа с. Благодаря этой особенности белок обладает функцией переноса электрона при взаимодействии с его редокс-партнёрами. Так, цитохром с участвует в переносе электрона между комплексами дыхательной цепи, локализующимися во внутренней мембране митохондрии. Акцептируя электрон от комплекса III, цитохром с переносит электрон к комплексу IV. Антиоксидантная функция цитохрома с заключается в принятии электрона от супероксидного анион-радикала и его одновременной дезактивации.

Известно, что функционирование гемсодержащего белка гемоглобина (см. рис. 1)

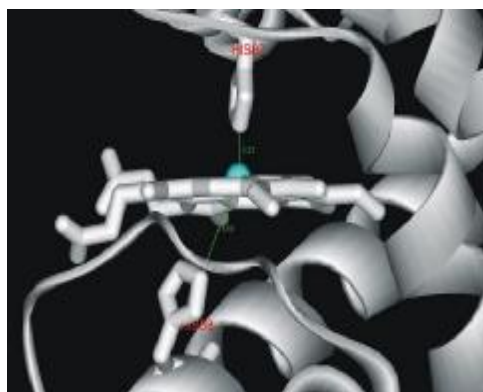


Рис.1. Молекула гемоглобина с отмеченными а.о., взаимодействующими с атомом Fe.

связано с выведением атома Fe из плоскости гема [1]. Предположив, что сходный механизм функционирования существует и у цитохрома с, мы

исследовали структурные особенности микроокружения атома Fe, обеспечивающие его экспонирование.

При анализе структурной организации цитохрома *c* обеспечивающей функционирование этого белка нами были использованы методы анализа информационной структуры (АНИС-метода), молекулярной динамики (МД), а также генно-инженерные, микробиологические и биохимические методы. Использование методов компьютерного моделирования на начальной стадии проекта должно было снизить количество вариантов мутантных последовательностей цитохрома *c*, имеющих сниженные способности к переносу электрона. Исследование биохимических свойств рекомбинантных белков позволяет сделать выводы об изменении биологической активности мутантных вариантов цитохрома *c* и, следовательно, о влиянии отдельных аминокислотных замен в гене цитохрома *c* на процесс электронного транспорта в окислительно-восстановительных реакциях.

Материалы и методы

АНИС-метод. Для расчета информационной структуры цитохрома *c* использовался “ANIS-trees” веб-сервис [2], реализующий АНИС-метод. Метод основан на новом приближении, позволяющим выявлять иерархически организованные структуры при анализе первичных структур белков. Детальное математическое описание АНИС-метода представлено на веб-сервисе [2]. По окончании расчёта поверхности с наложением условия локального максимума получили дискретное множество точек. Соединяя ближайшие, получили иерархически организованные структуры - элементы информационной структуры белка (ЭЛИС). Элементы низшего уровня иерархии (ЭЛИС первого ранга) имеют неоднородную плотность распределения по аминокислотной последовательности, что позволяет представить первичную структуру белка как совокупность сайтов трех типов. Сайты с аномально высокой плотностью называются ADD+, нормальной плотностью - NORMAL, низкой плотностью ЭЛИС первого ранга - ADD-сайтами. Плотность расположения ЭЛИС первого ранга говорит о степени конформационной детерминированности различных участков полипептидной цепи цитохрома *c*.

Метод МД. МД моделирование проводили с использованием потенциального поля AMBER. Для каждой из последовательностей моделирование проводилось без учета влияния растворителя в течении 10000 ps при 300К. Для генерации последовательностей на участке (78-83) а.о. цитохрома *c*, используемых при МД моделировании, применялась программа, написанная на C++, использующая при генерировании последовательностей физико-химические и эволюционные параметры а.о.

*Конструирование мутантных генов цитохрома *c*.* Мутантные гены цитохрома *c* синтезировали методом сайт-направленного мутагенеза QuikChange™ Mutagenesis Kit (Stratagene, США). Аминокислотные замены вводили в ген лошадиного цитохрома *c*, находящегося в составе экспрессионного плазмидного вектора pVP(CYCS). Для экспрессии полученных мутантных генов цитохрома *c* использовали штамм *E.coli*

JM109.

Выделение полученных мутантных вариантов цитохрома с. Очистку мутантных белков проводили с использованием ионообменной и адсорбционной хроматографий. Мутантный вариант I81Y/A83Y/G84N дополнительно очищали с помощью гель-фильтрации.

Получение препарата митопластов для измерения их активности в присутствии мутантных вариантов цитохрома с. Выделение митохондрий из печени крысы осуществляли методом Джонсона и Ларди. Удаление цитохрома с из митохондрий печени крысы проводили промывкой раствором высокой ионной силы.

Изучение взаимодействия мутантных вариантов цитохрома с с комплексами дыхательной цепи. Для исследования взаимодействия вариантов цитохрома с, несущих аминокислотные замены, с комплектом III измеряли сукцинат:цитохром с-редуктазную активность митопластов. В ходе измерений фиксировали количество восстановленного цитохрома с фотометрически при 550 нм в среде, содержащей окисленный цитохром с. Для исследования вариантов цитохрома с, несущих аминокислотные замены, с комплектом IV измеряли цитохром с-оксидазную активность митопластов. В ходе измерений фиксировали количество кислорода амперометрически в среде, содержащей окисленный цитохром с. Активности выражали в мкмоль окисленного цитохрома с/мин на мг белка митопластов.

Результаты и обсуждение

По итогам исследования аминокислотной последовательности цитохрома с АНИС-методом выявлено, что информационную структуру цитохрома с образуют два ЭЛИС высшего ранга 1-58, 59-104 а.о. (рис.2).

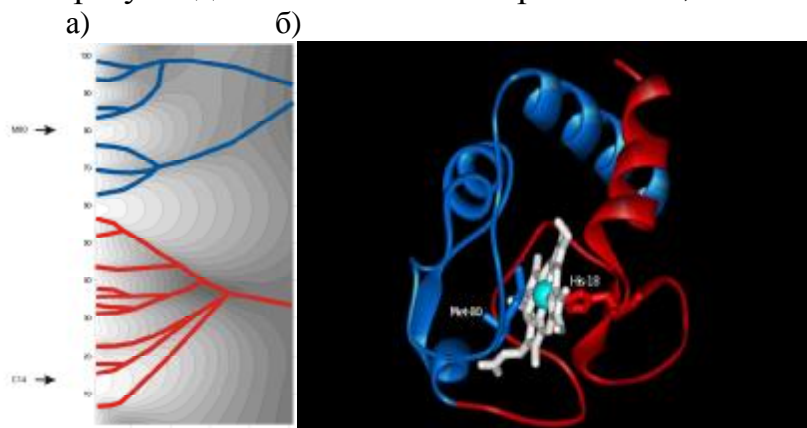


Рис.2. а) Информационная структура цитохрома с. По оси X - размер сайта, для которого рассчитывалась функция, описывающая величину скоррелированности между а.о., по оси Y – номер остатка в последовательности цитохрома с, определяющий положение центра сайта, по оси Z (разные тона серого) – значение функции отражающие степень скоррелированности; б) пространственная структура (1RHC.PDB) цитохрома с. ЭЛИС высшего ранга окрашены в разные цвета. Указано расположение остатков His-18 и Met-80, взаимодействующих с атомом Fe

В первичной структуре цитохрома с были выделены четыре ADD+, пять NORMAL сайтов, а также один ADD- сайт, расположенный на стыке двух ЭЛИС высшего ранга (59-79) и (80-104) и включающий в себя остаток Met-

80, участвующий в создании одной из координационных связей атома Fe (рис.3).



Рис.3. Расположение сайтов с различной плотностью ЭЛИС высшего ранга ADD+(оранжевый цвет), NORMAL (белый цвет) и ADD-(зеленый цвет) в структуре 1RHC.PDB цитохрома *c*. Видно, что остаток Met-80, взаимодействующий с атомом Fe, расположен на ADD- сайте.

Проведено исследование физической модели функционирования гема в металлосодержащих белках [1]. На основании этой модели нами было сделано предположение, что «выталкивание» атома Fe из плоскости гема происходит за счёт сил, возникающих при движении друг относительно друга элементов пространственной структуры цитохрома *c*, соответствующих ЭЛИС высшего ранга. Возникающие при этом движения деформации локализуются на ADD- сайте цитохрома *c*.

На основе данных АНИС метода были сконструированы три мутантных варианта цитохрома *c*, в которых на ADD- сайте (76-83 а.о.) были введены точечные мутации, направленные на увеличение степени скоррелированности а.о. в этом сайте. Мутации подобного характера способствуют повышению детерминированности конформационных состояний цитохрома *c*. Гены с заменами I81Y/A83Y/G84N, T78N/K79Y/M80I/I81M/F82N, T78S/K79P были синтезированы и экспрессированы, целевые белки получены в препаративных количествах. Исследование биологической активности мутантных вариантов цитохрома *c* проводили на митохондриях печени крысы. В ходе тестирования полученных мутантных белков наблюдали существенное снижение по сравнению с цитохромом *c* дикого типа их способности к переносу электрона в дыхательной цепи. Наибольшее снижение сукцинат: цитохром *c*-редуктазной активности митохондрий печени крысы наблюдалось в присутствии мутантного варианта T78S/K79P (3% от активности цитохрома *c* дикого типа). Наибольшее снижение цитохром *c*-оксидазной активности митохондрий печени крысы наблюдалось в присутствии мутантного варианта I81Y/A83Y/G84N (15% от активности цитохрома *c* дикого типа).

Для получения характеристик, описывающих конформационные свойства полипептидной цепи на участке (76-83 о.а.) было проведено МД моделирование этого фрагмента последовательности цитохрома *c* и

различных его вариантов с введёнными точечными мутациями. К сожалению, к настоящему моменту четких корреляций между данными МД и АНИС-метода получено не было. Мы полагаем, что это может быть связано с относительной «мягкостью» использовавшейся системы потенциальных полей или с необходимостью учета влияния растворителя. Работы в этом направлении будут продолжены.

Выводы

1. Построена информационная структура цитохрома *c* с использованием АНИС-метода и исследовано положение ADD+, NORMAL и ADD- сайтов. На основе полученных данных сконструированы три мутантных варианта цитохрома *c* с точечными мутациями, введенными на ADD- сайте.

2. Проведено МД моделирование ряда мутантных вариантов аминокислотных последовательностей цитохрома *c*. Полученные в результате моделирования параметры не имеют чётких корреляций с данными, полученными с помощью АНИС-метода.

3. Мутантные варианты цитохрома *c* получены и протестированы на митопластах печени крысы. Биологические активности митопластов в присутствии полученных вариантов имеют существенно сниженные значения по сравнению с активностью цитохрома *c* дикого типа.

Литература

1. M. Paoli, R. Liddington, J. Tame, A. Wilkinson, G. Dodson. Crystal structure of T state haemoglobin with oxygen bound at all four haems / J. of Mol. Biol., Vol. 256, 1996 – pp. 775-792

2. <http://anis.ibch.ru/trees/>

Островерхова Татьяна Владимировна, аспирант биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, tato-tato@list.ru

Черткова Рита Валерьевна, научный сотрудник лаборатории инженерии белка Института биоорганической химии имени М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, канд.биол.наук, rita@nmr.ru

Некрасов Алексей Норбертович, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии белка Института биоорганической химии имени М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, канд.физ.-мат.наук, alexei_nekrasov@mail.ru