

УДК 577.112.3

МОДЕЛИРОВАНИЕ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ ЦИТОХРОМА С ЛОШАДИ МЕТОДОМ АНАЛИЗА ИНФОРМАЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Т.В. Островерхова¹, Р.В. Черткова², А.Н. Некрасов², Д.А. Долгих^{1, 2}, М.П. Кирпичников^{1, 2}

(¹кафедра биоинженерии; ²Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва; e-mail: tato-tato@list.ru)

С помощью метода анализа информационной структуры (АНИС-метод) исследована информационная структура цитохрома с. На основе полученных данных сконструированы и получены варианты цитохрома с, несущие замены, направленные на понижение его способности к взаимодействию с комплексами дыхательной цепи. Проведены исследования биологической активности полученных мутантных вариантов цитохрома с в ходе взаимодействия с комплексами III и IV дыхательной цепи в системе митопластов печени крысы.

Ключевые слова: цитохром с, АНИС-метод, информационная структура, дыхательная цепь, митопласты.

Основной функцией цитохрома с является перенос электрона в дыхательной цепи митохондрии от комплекса III на комплекс IV. Принимая электрон от комплекса III, цитохром с переходит в восстановленную форму, а отдавая электрон комплексу IV, — в окисленную. Окисленная и восстановленная формы цитохрома с лошади имеют существенные различия в резонансных раман-спектрах хромофора, характеризующих перераспределение электронной плотности порфирина гема [1]. С точки зрения информационной теории белка цитохром с и гемоглобин могут обладать общим механизмом функционирования вследствие наличия общего кофактора. Известны работы по изучению конформации α и β -субъединиц гемоглобина в разных функциональных формах методом рентгеноструктурного анализа [2]. Изменения стереохимии гемопорфиринового кольца каждой субъединицы гемоглобина при его переходе из одной формы в другую характеризуются смещением атома железа по отношению к плоскости макроцикла [2]. Можно предположить, что структурные перестройки кофактора, связанные с выведением атома железа из плоскости гема, происходят и в цитохроме с при переносе электрона в дыхательной цепи.

Исходя из проведенного нами анализа информационной структуры цитохрома с, мы предположили, что для работы кофактора цитохрома с, возможно, связанной со смещением атома железа, принципиальное значение имеет участок 76—83 аминокислотной последовательности цитохрома с. Этот участок содержит лиганд гема Met-80 и, согласно расчетным данным, служит гибким сочленением для N- и C-концевых последовательностей цитохрома с, обеспечивая тем самым подвижность Met-80 и координируемого им атома железа. Для проверки этого предположения на основе данных, получен-

ных с помощью АНИС-метода, нами был сконструирован ряд мутантных вариантов цитохрома с лошади. Введенные в ген цитохрома с мутации были направлены на уменьшение конформационной подвижности участка 76—83 а.о. белка, что должно было привести к подавлению его электрон-транспортной активности.

Объекты и методы исследования

Для расчета информационной структуры цитохрома с использовался АНИС-метод, принципиальные положения которого приведены на “ANIS-trees” веб-сервисе [3]. Введение мутаций в ген цитохрома с в составе экспрессионного плазмидного вектора pBP(CYCS) осуществляли методом сайт-направленного мутагенеза QuikChange™ Mutagenesis Kit (Stratagene, США). Для экспрессии полученных мутантных генов цитохрома с использовали штамм *Escherichia coli* JM109. Выделение мутантных вариантов цитохрома с проводили с использованием ионообменной и адсорбционной хроматографий. Препарат митопластов из митохондрий печени крысы получали с помощью метода Джонсона и Ларди [4]. Удаление цитохрома с из митохондрий печени проводили промывкой раствором высокой ионной силы [5]. Сукцинат:цитохром с-редуктазную активность митопластов печени крысы, лишенных цитохрома с, измеряли фотометрически при 550 нм. Активности выражали в мкмоль восстановленного цитохрома с/мин на мг белка митопластов. Цитохром с-оксидазную активность митопластов печени крысы, лишенных цитохрома с, измеряли амперометрически с использованием закрытого платинового электрода. Активности выражали в мкмоль окисленного цитохрома с/мин на мг белка митопластов [6].

Результаты и обсуждение

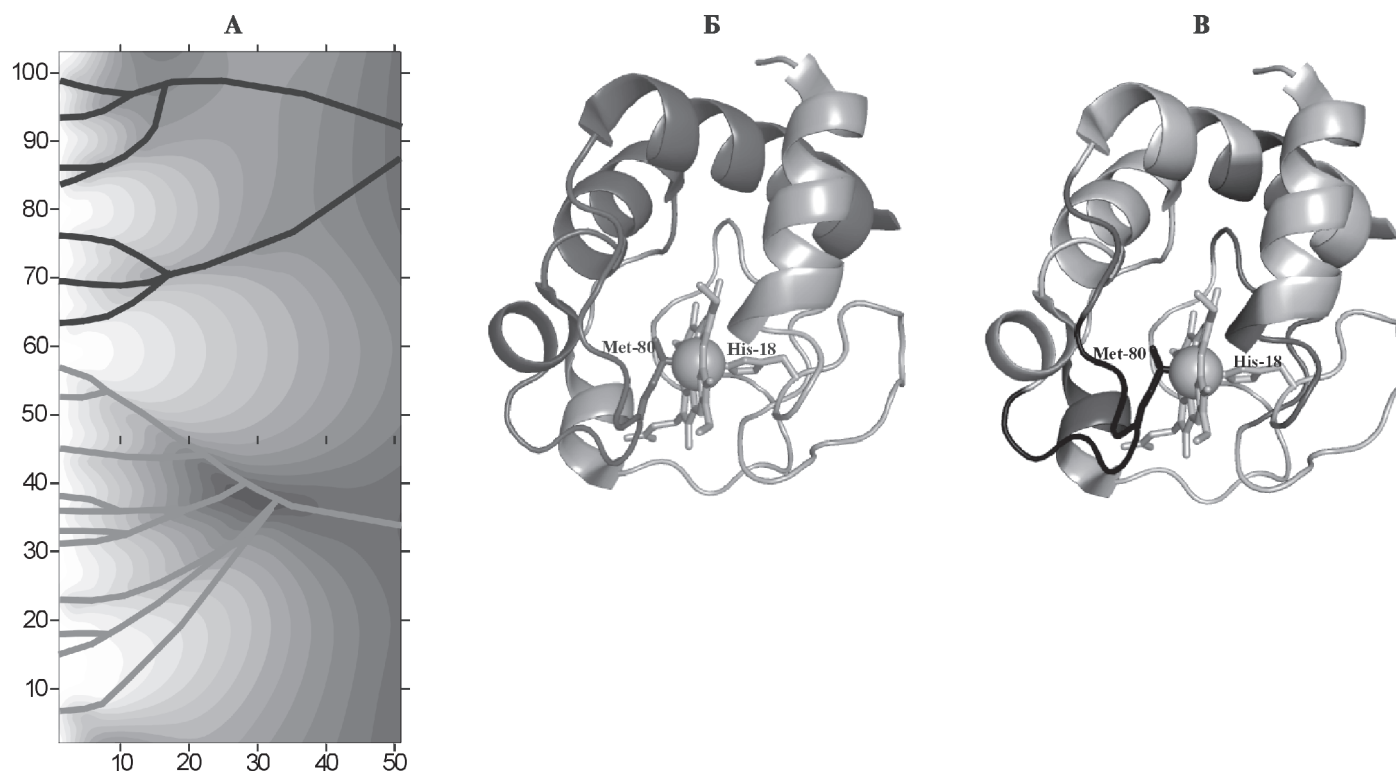
По результатам исследования аминокислотной последовательности цитохрома *c* АНИС-методом обнаружили, что информационную структуру цитохрома *c* образуют два иерархически организованных элемента информационной структуры (ЭЛИС) высшего ранга 1—58 а.о. и 59—104 а.о. (рисунок, А) [3, 7]. Соответствующие им элементы пространственной организации представлены на рисунке, Б. Кроме того, в информационной структуре цитохрома *c* выделен один сайт с аномально низкой плотностью ЭЛИС (ADD-сайт) (рисунок, В) [3, 8]. Сайт пониженной плотности входит в состав одного из двух ЭЛИС высшего ранга 59—104 а.о. и находится на стыке ЭЛИС более низкого ранга 59—79 а.о. и 80—104 а.о. ADD-сайт включает остатки 76—83, в том числе лиганд железа Met-80 (рисунок, В). Второй лиганд железа His-18 располагается на другом ЭЛИС высшего ранга 1—58 а.о., таким образом аминокислотные лиганды железа входят в состав разных ЭЛИС высшего ранга, соответствующих протяженным участкам полипептидной цепи цитохрома *c*.

Исследована информационная структура другого гемсодержащего белка гемоглобина, в котором аминокислотными лигандами железа служат His-58 и His-87. Показано, что информационная структура гемоглобина состоит из двух ЭЛИС высшего ранга и каждый из этих ЭЛИС содержит по одному ами-

нокислотному лиганду железа. Таким образом, расположение лигандов железа как функционально значимых а.о. на разных ЭЛИС высшего ранга характерно для информационной структуры и гемоглобина, и цитохрома *c*, а также гидролаз [9]. По нашему мнению, смещение атома железа при работе кофактора в гемоглобине происходит за счет движения двух больших элементов пространственной структуры белка, соответствующих ЭЛИС высшего ранга, каждый из которых содержит по аминокислотному лиганду железа. Именно по этой причине лиганды гема расположены в разных ЭЛИС высшего ранга.

Было сделано предположение о наличии аналогичного гемоглобину механизма, обеспечивающего работу кофактора, в цитохроме *c*. Движение ЭЛИС высшего и более низкого рангов относительно друг друга в цитохроме *c* может быть обеспечена гибкостью сайта 76—83 а.о. (ADD-сайта) в белке, находящегося на стыке ЭЛИС более низкого ранга в составе одного из ЭЛИС высшего ранга. Таким образом, используя новые теоретические представления о структурной организации цитохрома *c*, нами была предложена модель функционирования этого белка, построенная с помощью АНИС-метода.

На основании предложенной модели функционирования цитохрома *c* и расчетных данных, полученных АНИС-методом, были сконструированы мутантные варианты цитохрома *c*, содержащие замены



А) Информационная структура цитохрома *c*: по оси X отложен размер сайта, для которого рассчитывалась функция, описывающая величину скоррелированности а.о., по оси Y отложен номер а.о. в последовательности цитохрома *c*, по оси Z (диапазон оттенков серого) отложено значение функции, отражающее степень скоррелированности а.о.; Б) пространственная структура цитохрома *c*, на которой выделены ЭЛИС высшего ранга; В) пространственная структура цитохрома *c*, на которой выделен ADD-сайт (черным цветом). Указаны лиганды железа His-18 и Met-80

в ADD-сайте, I81Y/A83Y/G84N, T78N/K79Y/M80I/I81M/F82N и T78S/K79P. Мутации были направлены на понижение гибкости ADD-сайта в белке, что, по нашему мнению, могло привести к заторможенности движения железа в геме и подавлению способности цитохрома *c* к переносу электрона в дыхательной цепи. Мутантные гены цитохрома *c* были получены и экспрессированы в клетках *E. coli*, а соответствующие рекомбинантные белки выделены в препаративных количествах. Для изучения способности мутантных вариантов цитохрома *c* к транспорту электрона изучали их взаимодействие с комплексами III и IV. Наибольшее снижение сукцинат:цитохром *c*-редуктазной активности митопластов (на 97% от активности в присутствии цитохрома *c* дикого типа) наблюдалось при добавлении мутантного варианта T78S/K79P. Наибольшее снижение цитохром *c*-оксидазной активности митопластов (на 85% от активности в присутствии цитохрома *c* дикого типа) наблюдалось при добавлении мутантного варианта I81Y/A83Y/G84N. Полученные данные близки к результатам для мутантных вариантов цитохрома *c*, сконструированных ранее [6] с целью устранения электростатических взаимодействий цитохрома *c* с комплексами дыхательной цепи. Возможно, замены а.о., находящиеся в *N*-концевой последо-

вательности единственного ADD-сайта, оказываются критичными для взаимодействия цитохрома *c* с комплексом III, в то время как замены а.о., находящиеся в *C*-концевой последовательности ADD-сайта, соответственно — с комплексом IV.

Таким образом, в нашей работе исследована информационная структура цитохрома *c*, представленная двумя ЭЛИС высшего ранга. Сконструированы варианты цитохрома *c* с заменами I81Y/A83Y/G84N, T78N/K79Y/M80I/I81M/F82N, T78S/K79P, направленными на снижение его электрон-транспортной активности. Получены и исследованы мутантные варианты цитохрома *c*. Показано, что биологическая активность мутантных вариантов значительно снижена по сравнению с цитохромом *c* дикого типа.

Авторы выражают благодарность В.Г. Гривенниковой и А.Д. Виноградову (кафедра биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова) за помощь при выполнении работ по определению биологической активности цитохромов.

* * *

Работа была выполнена при финансовой поддержке программы РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Strekas T., Spiro T.* Cytochrome *c*: resonance raman spectra // *Biochim. Biophys. Acta.* 1972. Vol. 278(1). P. 188—192.
2. *Paoli M., Liddington R., Tame J., Wilkinson A., Dodson G.* Crystal structure of T state haemoglobin with oxygen bound at all four haems // *J. of Mol. Biol.* 1996. Vol. 256(4). P. 775—792.
3. URL: <http://anis.ibch.ru/trees/> 15.10.2010.
4. *Johnson D., Lardy H.* Isolation of liver or kidney mitochondria // *Meth. Enzymol.* 1967. Vol. 10. P. 94—96.
5. *Jacobs E., Sanadi D.* The reversible removal of cytochrome *c* from mitochondria // *J. Biol. Chem.* 1960. Vol. 235. P. 531—534.
6. *Пепелина Т., Черткова Р., Островерхова Т., Долгих Д., Кирпичников М., Гривенникова В., Виноградов А.* Направленный мутагенез цитохрома *c*: реакции с компонен-

тами дыхательной цепи и супероксид-радикалом // *Биохимия.* 2009. Т. 74. № 6. С. 768—778.

7. *Некрасов А., Петровская Л., Топорова В., Крюкова Е., Родина А., Москалёва Е., Кирпичников М.* Применение метода анализа информационной структуры для конструирования антагониста интерлейкина-13 // *Биохимия.* 2009. Т. 74. № 4. С. 493—500.

8. *Nekrasov A., Zinchenko A.* Structural features of the interfaces in enzyme-inhibitor complexes // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2010. Vol. 28(1). P. 85—90.

9. *Nekrasov A., Zinchenko A.* Hydrolases: The correlation between informational structure and the catalytic centers organization // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2008. Vol. 25(5). P. 553—562.

Поступила в редакцию
13.12.10

DESIGN OF MUTANTS VARIANTS OF CYTOCHROME C AND TESTING ITS BIOLOGICAL ACTIVITY

T.V. Ostroverkhova, R.V. Chertkova, A.N. Nekrasov, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov

At this research work the informational structure of cytochrome *c* was investigated using the ANIS-method (analyse of informational structure method). The mutant genes of cytochrome *c* were constructed on a basis of data from ANIS-method. The mutations were turned to reduce electron-transport activity of cytochrome *c* at mitochondrial respiratory chain. These mutant genes were obtained and expressed at bacterial system. Recombinant proteins were purified and its biological activities were tested at rat liver mitochondria.

Key words: cytochrome *c*, informational structure, ANIS-method, respiratory chain, mitochondria.

Сведения об авторах

Островерхова Татьяна Владимировна — аспирантка, кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8(962)942-88-93; e-mail: tato-tato@list.ru

Черткова Рита Валерьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории инженерии белка Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8(495)335-28-88; e-mail: rita@nmr.ru

Некрасов Алексей Норбертович — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии белка Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8(495)335-43-66; e-mail: alexei_nekrasov@mail.ru

Долгих Дмитрий Александрович — докт. биол. наук, заведующий лабораторией инженерии белка Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8(495)335-28-88; e-mail: dolgikh@nmr.ru

Кирпичников Михаил Петрович — докт. биол. наук, акад. РАН, декан биологического факультета МГУ, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8(495)939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru