# \_\_\_\_ СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ \_\_\_\_ СОЕЛИНЕНИЙ

УЛК 538.911

# НАЧАЛЬНАЯ СТАДИЯ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ЦИТОХРОМА С В ВОДНОМ РАСТВОРЕ, ПРОИСХОДЯЩИХ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ МЕТАНОЛА

© 2022 г. П. Д. Короткова<sup>1,\*</sup>, А. А. Юрченко<sup>2</sup>, В. И. Тимофеев<sup>3,4</sup>, А. Р. Гусельникова<sup>2</sup>, Г. К. Владимиров<sup>6</sup>, А. Б. Шумм<sup>1,5</sup>, Ю. А. Владимиров<sup>1,2,3,6</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
 <sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
 <sup>3</sup> Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва, Россия <sup>4</sup> КК НБИКС-природоподобных технологий, Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва. Россия

<sup>5</sup>Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, Россия

<sup>6</sup> Институт регенеративной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва. Россия

\*E-mail: korotkovapol@gmail.com Поступила в редакцию 02.12.2020 г. После доработки 11.12.2020 г. Принята к публикации 11.12.2020 г.

Промоделирована молекулярная динамика молекулы цитохрома С из сердца лошади в водном растворе и в 50%-ном водно-метанольном растворе. Для каждой из систем проводили три независимых расчета по 100 нс. Показано, что добавление метанола существенно влияет на подвижность атомов молекулы цитохрома С на участке от валина в 20-м положении до пролина в 30-м положении, который относится к одному из известных сайтов связывания кардиолипина. При этом за 100 нс не про-исходит разрыва и существенного изменения длины координационной связи между железом гема и серой близлежащего метионина, а также изменения расстояний от гема до аминокислотных остатков, обеспечивающих флуоресценцию, что наблюдалось в других работах при добавлении метанола к цитохрому С.

### **DOI:** 10.31857/S0023476122020096

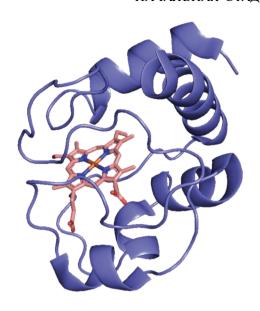
# **ВВЕДЕНИЕ**

Цитохром С (**Цит** c) — это гемсодержащий белок, имеющий в своем составе гем типа С, ковалентно связанный с белком при помощи двух расположенных аксиально по отношению к нему аминокислотных остатков. Цит c является важным участником дыхательной цепи митохондрий, выполняющим роль переносчика электронов между элементами дыхательной цепи [1]. Кроме того, при определенных условиях Цит c участвует в запрограммированной клеточной гибели по пути апоптоза [2].

Наиболее изученным вариантом этого белка с точки зрения пространственной структуры является Цит c из сердца лошади, содержащий 105 аминокислотных остатков. Пространственная структура и аминокислотная последовательность

Цит c из сердца лошади (PDB ID: 1HRC, [3]) представлены на рис. 1. Молекула Цит c содержит  $\alpha$ -спирали, а также множество подвижных петель. Отметим, что атом железа, содержащийся в составе гема C, координирован двумя аминокислотными остатками — His-18 и Met-80.

Известно, что в определенных условиях Цит c может менять конформацию, переходя в состояние, близкое по свойствам к так называемой "moltenglobule" (расплавленная глобула), что может быть связано с изменением полярности среды [4]. Показано, что добавление кардиолипина также меняет конформацию Цит c [5]. Данный факт, учитывая участие Цит c и кардиолипина в процессе апоптоза, может быть интересен с точки зрения изучения молекулярного механизма Цит c-опосредованного апоптоза.



**Рис. 1.** Структура используемой для расчетов молекулярной динамики молекулы Цит c.

Получено несколько кристаллических структур, в которых Цит c из сердца лошади значительно менял конформацию [6, 7]. В [6] были получены димеры и тримеры Цит c за счет того, что координационная связь между железом гема и Met-80 разрушалась, а подвижная петля, на которой расположен Met-80, значительно меняла свою конформацию. Этого удалось достичь в растворе Цит c в калий-фосфатном буфере при объемной доле этанола, равной 60%. В [8] изучалось поведение Цит c в зависимости от типа и концентрации соли в растворе.

В настоящей работе для изучения динамики начальной стадии перехода Цит с из сердца лошади из обычной формы в состояние расплавленной глобулы промоделирована молекулярная динамика Цит c в водном растворе и в 50%-ном водно-метанольном растворе. Изучалось влияние именно метанола, так как известно, что наличие метанола способствует переходу в состояние, схожее по свойствам с расплавленной глобулой [9–11], а также в связи с тем, что при изучении взаимодействия Цит с с кардиолипином последний чаще всего присутствует в испытуемой пробе в виде метанольного раствора. Кроме того, добавление метанола в раствор может моделировать изменение полярности микроокружения Цит c в клетке. Рассмотрено влияние метанола на подвижность молекулы Цит c, а также на некоторые межатомные расстояния в глобуле Цит c.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для расчета молекулярной динамики Цит c в водном растворе использовали структуру Цит c из

сердца лошади, полученную методом рентгеноструктурного анализа (PDBID: 1HRC). Топология системы построена с использованием программного пакета AmberTools19 [12], после чего преобразована в формат GROMACS [13] с помощью программы АСРҮРЕ [14]. Для построения топологии гема применяли параметры, полученные в [15]. Расчет молекулярной динамики проводили с использованием программного пакета GROMACS 2019.1 [13]. В качестве силового поля применяли поле amber14sb [16]. В качестве модели воды использовали ТІРЗР. В систему было добавлено 0.15 М КСІ, а также ионы для нейтрализации суммарного заряда системы. Для релаксации структуры и во избежание стерических клэшей в дальнейших расчетах проводили минимизацию потенциальной энергии с шагом в 1 фс до максимальной силы 1000 кДж/моль/нм. Система была уравновешена в NVT- и NPT-ансамблях (100 пс каждый) при температуре 300 К и давлении 1 атм. Температуру и давление контролировали с использованием модифицированного термостата Берендсена [17] и баростата Паринелло—Рахмана [18] с временными константами  $tau \ t = 0.1 \ пc \ u$  $tau_p = 2$  пс соответственно. Продуктивную молекулярную динамику проводили в изотермо-изобарическом ансамбле с шагом в 2 фс. Молекулярную динамику Цит c в 50%-ном водно-метанольном растворе проводили аналогичным образом, за исключением того, что в систему были добавлены молекулы метанола.

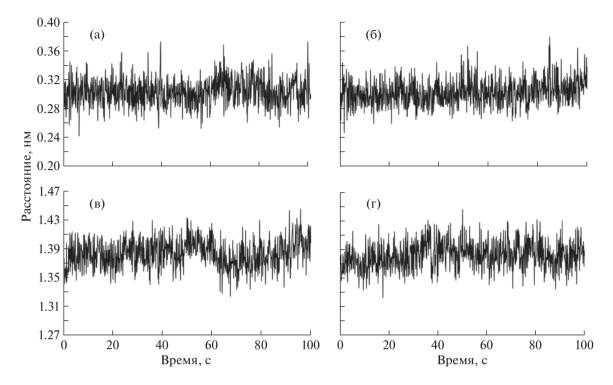
Для получения статистически достоверных результатов расчеты молекулярной динамики проведены в трех независимых повторностях для каждой из систем. Результаты представлены в виде усредненных значений (n = 3).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследована динамика молекулы Цит c в водном растворе и в 50%-ном водно-метанольном растворе.

Ранее было показано, что в присутствии метанола в Цит c происходит разрыв железо-серной связи > Fe·S(Met80) между железом гема и серой в составе Met80. Для оценки влияния метанола на координационную связь между железом гема и серой в составе Met80 рассмотрено изменение длины этой связи во времени (рис. 2а и 2б). Из графиков видно, что за 100 нс не происходит ни разрыва данной связи, ни существенного изменения ее длины ни в водном, ни в 50%-ном воднометанольном растворе.

В [19] показано, что при наличии в растворе метанола Цит c приобретает флюоресценцию, характерную для остатков тирозина и триптофана. Для оценки влияния метанола на расстояния от гема до флуоресцирующих в метанольном рас-

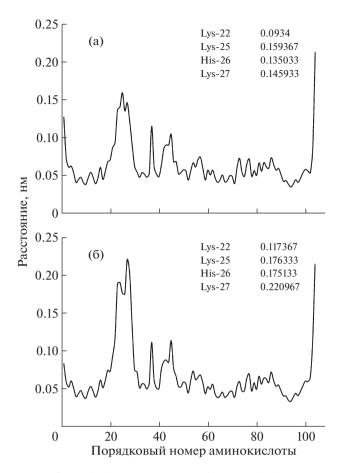


**Рис. 2.** Кинетика изменения межатомных расстояний в молекуле Цит c: а, б — между атомом железа в составе гема и атомом серы в составе метионина в 80-м положении, в, г — между атомом железа в составе гема и атомом азота в составе триптофана; а, в — 50%-ном водно-метанольном растворе, б, г — в водном растворе.

творе Цит с аминокислотных остатков тирозина и триптофана в настоящей работе рассмотрено изменение во времени расстояния от железа в составе гема до атомов азота в составе остатков тирозина в положениях 48, 67, 74 и 97 (данные не представлены) и остатка триптофана в положении 59 (рис. 2в, 2г). Из рисунка видно, что за 100 нс не происходит существенного изменения расстояний от гема до остатка триптофана ни в водном, ни в 50%-ном водно-метанольном растворе. Также не наблюдалось изменений расстояния от гема до остатков тирозина в обеих системах.

Полученные результаты по межатомным расстояниям можно объяснить по меньшей мере двумя причинами. Первой и наиболее простой причиной может быть то, что процесс разрыва рассматриваемой железо-серной связи и увеличения расстояния от гема до флуорофоров под действием метанола происходит за временной период, продолжительность которого больше рассмотренных 100 нс. Другая причина может заключаться в том, что условия, приводившие к разрыву железо-серной связи и увеличению расстояния от гема до флуорофоров, наблюдаемым в присутствии метанола в реальных экспериментах, вероятнее всего были также обеспечены определенными значениями рН и ионной силы в исследуемых растворах. В эксперименте по моделированию молекулярной динамики в раствор помещали ионы калия и хлора в концентрации  $0.15\,\mathrm{M}$ , имитируя тем самым физиологические условия. Кроме того, исследуемая система была уравновешена ионами, чтобы нейтрализовать ее суммарный заряд, что необходимо для проведения расчетов. Таким образом, построенная реакционная система не в полной мере повторяет условия каждого из экспериментов, в которых показаны те изменения структуры Цит c, которые не удалось увидеть в результате расчетов молекулярной динамики.

Изучено различие подвижности молекулы Цит с и отдельных ее участков в водном растворе и в 50%-ном водно-метанольном растворе. Для этого рассчитаны RMSF (root-mean-square fluctuation)  $C\alpha$ -атомов молекулы Цит c в обоих растворах (рис. 3). Из рисунка видно, что подвижность Сαатомов в водном и 50%-ном водно-метанольном растворах существенно различается для аминокислотных остатков в промежутке от Val-20 до Pro-30: в присутствии метанола на этом участке происходит уменьшение значений RMSF. Примечательно, что в этой области находятся аминокислотные остатки, относящиеся к так называемому L-сайту связывания кардиолипина [20]. Таким образом, снижение RMSF в этой области указывает на то, что в присутствии метанола происходит стабилизация той части полипептидной цепочки Цит c, которая отвечает за взаимодей-



**Рис. 3.** RMSF (root-mean-square fluctuation)  $C\alpha$ -атомов аминокислотных остатков в составе Цит c: a-b 50%-ном водно-метанольном растворе, b-b водном растворе. В текстовом виде приведены значения RMSF для атомов в составе указанных аминокислотных остатков.

ствие с кардиолипином. На рис. 3 также видно, что за период в 100 нс изменений подвижности в других участках Цит c не происходит.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00244) в части моделирования молекулярной динамики и при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН в части анализа результатов молекулярного моделирования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Zhang Z., Huang L., Shulmeister V.M. et al. // Nature. 1998. V. 392. № 6677. P. 677. https://doi.org/10.1038/33612

- 2. Goldstein J.C., Waterhouse N.J., Juin P. et al. // Nat. Cell. Biol. 2000. V. 2. № 3. P. 156. https://doi.org/10.1038/35004029
- 3. Bushnell G.W., Louie G.V., Brayer G.D. // J. Mol. Biol. 1990. V. 214. № 2. P. 585. https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90200-6
- 4. *Hirota S., Ueda M., Hayashi Y. et al.* // J. Biochem. 2012. V. 152. № 6. P. 521. https://doi.org/10.1093/jb/mvs098
- Muenzner J., Pletneva E.V. // Chem. Phys. Lipids. 2014.
  V. 179. P. 57.
  https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.002
- Hirota S., Hattori Y., Nagao S. et al. // PNAS. 2010.
  V. 107. № 29. P. 12854.
  https://doi.org/10.1073/pnas.1001839107
- Parui P.P., Deshpande M.S., Nagao S. et al. // Biochemistry. 2013. V. 52. № 48. P. 8732. https://doi.org/10.1021/bi400986g
- 8. *Deshpande M.S.*, *Parui P.P.*, *Kamikubo H. et al.* // Biochemistry. 2014. V. 53. № 28. P. 4696. https://doi.org/10.1021/bi500497s
- 9. *Bychkova V.E.*, *Dujsekina A.E.*, *Klenin S.I. et al.* // Biochemistry. 1996. V. 35. № 19. P. 6058. https://doi.org/10.1021/bi9522460
- 10. Grandori R. // Protein Sci. 2002. V. 11. № 3. P. 453.
- 11. *Kamatari Y.O., Konno T., Kataoka M. et al.* // J. Mol. Biol. 1996. V. 259. № 3. P. 512. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0336
- 12. Case D.A., Cheatham III T.E., Darden T. et al. // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. № 16. P. 1668. https://doi.org/10.1002/jcc.20290
- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al. // Softwarex. 2015. V. 1. P. 19. https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001
- 14. *Da Silva A.W.S.*, *Vranken W.F.* // BMC Res. Notes. 2012. V. 5. № 1. P. 367. https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367
- Giammona D.A. "An examination of conformational flexibility in porphyrins and bulky-ligand binding in myoglobin". Ph.D. thesis, USA, Davis, University of California, 1984.
- 16. *Maier J.A.*, *Martinez C.*, *Kasavajhala K. et al.* // J. Chem. Theory Comput. 2015. V. 11. № 8. P. 3696. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255
- 17. Berendsen H.J., Postma J.V., van Gunsteren W.F. et al. // J. Chem. Phys. 1984. V. 81. № 8. P. 3684. https://doi.org/10.1063/1.448118
- 18. *Parrinello M.*, *Rahman A.* // J. Chem. Phys. 1982. V. 76. № 5. P. 2662. https://doi.org/10.1063/1.448118
- 19. *Владимиров Г.К.* "Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома С с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении" Дис. ... канд. биол. наук. М.: РНИМУ, 2018.
- 20. *Kagan V.E.*, *Bayır H.A.*, *Belikova N.A. et al.* // Free Radic. Biol. Med. 2009. V. 46. № 11. P. 1439. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004