

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 538.911

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА С С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ

© 2022 г. П. Д. Короткова^{1,*}, А. А. Юрченко², В. И. Тимофеев^{3,4}, Д. Д. Подшивалов^{1,4},
А. Р. Гусельникова², А. Б. Шумм^{1,5}, Ю. А. Владимиров^{1,2,3}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

⁴ КК НБИКС-природоподобных технологий, Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁵ Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, Россия

*E-mail: korotkovapol@gmail.com

Поступила в редакцию 22.08.2021 г.

После доработки 17.09.2021 г.

Принята к публикации 17.09.2021 г.

Методом молекулярной динамики промоделировано взаимодействие цитохрома С (Цит с) из сердца лошади с липидным бислоем, состоящим из молекул тетраолеилкардиолипина. Показано, что молекула Цит с способна проникать внутрь такого липидного бислоя. Описаны стадии данного процесса, а также конформационные изменения, которые претерпевает молекула Цит с при взаимодействии с бислоем. Полученные данные помогут понять молекулярный механизм апоптоза.

DOI: 10.31857/S0023476122030110

ВВЕДЕНИЕ

Структура комплекса цитохрома С (Цит с) с липидным бислоем изучается давно вследствие ее важности для понимания механизмов апоптоза. Первая гипотеза о структуре такого комплекса была высказана в 1977 г. [1] и заключалась в том, что комплекс представляет собой молекулу Цит с и прилегающий участок липидного бислоя мембраны. Эта гипотеза в дальнейшем развивалась и использовалась в ряде работ [2–5]. Вначале Цит с присоединяется к отрицательным фосфатным группам на поверхности мембраны, содержащей кардиолипин, благодаря электростатическому взаимодействию с лизиновыми аминокислотными остатками [1, 5–8]. Существуют три сайта на поверхности Цит с, в основном представленные аминокислотными остатками лизина [8–11]. Эти сайты получили названия А, С и L. Сайт А включает в себя остатки Lys72, Lys73, Lys86 и Lys87, сайт С состоит из одного остатка аминокислоты — Asn52, а сайт L включает в себя аминокислотные остатки Lys22, Lys25, Lys27, His26 и His33. Сайты А и L взаимодействуют с липидными структурами в основном через электростатические взаимодействия, в то время как сайт С делает это через водородные связи [2].

До последнего времени многие авторы, рассматривающие свойства комплекса Цит с с кардиолипином, считали, что белок не проникает в глубину липидного бислоя мембран, а в лучшем случае лишь прогибает мембрану, а прочность связи обусловлена [1] “заякорением” белка путем проникновения в его толщу одной или двух жирнокислотных цепей. При этом изменения конформации все же должны происходить, так как иначе не появится ферментативная активность. Согласно [12] изменения конформации значительнее: Цит с расплывается на поверхности липидного слоя мембраны.

В [13] на основании данных, полученных с помощью исследования методом малоуглового рассеяния осадка, состоящего из комплекса Цит с с кардиолипином, предложили совершенно другую схему строения комплекса, в соответствии с которой молекула Цит с в состоянии расплавленной глобулы находится в центре наносферы и окружена монослоем из молекул кардиолипина. Предложенная структура наносферы подразумевает возможность ее проникновения в липидный бислой клеточных и митохондриальных мембран благодаря своей гидрофобной поверхности, образуя “вздутие” на мембране [14]. Предположение сделано на основании данных, полученных на

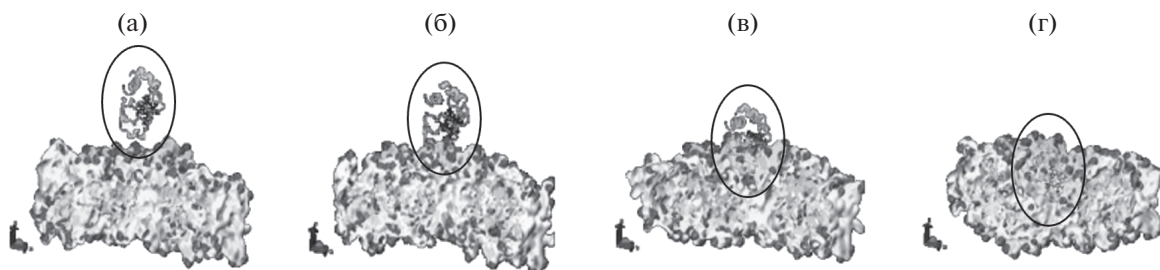


Рис. 1. Стадии погружения молекулы Цит *c* из сердца лошади в бислой, состоящий из тетраолеилкардиолипина. Над бислоем изображена вторичная структура молекулы Цит *c*, она выделена овалом.

модельных системах кристаллических осадков и ленгмюровских монослоев комплекса Цит *c* и кардиолипина [14].

В настоящей работе методом молекулярной динамики (МД) получена модель процесса формирования наносферы на молекулярном уровне.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Построение начальной системы. Начальная модель системы, включающая в себя липидный бислой и молекулу Цит *c*, была построена с использованием программных пакетов PackMol [15] и AmberTools19 [16], после чего преобразована в формат GROMACS [17] с использованием программы АСРУРЕ [18]. Для построения топологии гема применяли параметры, полученные в [19]. Для моделирования использовали силовое поле amber14sb [20]. В качестве молекул липидов были взяты 256 молекул тетраолеилкардиолипина.

МД-моделирование. Моделирование проводили с помощью программы GROMACS 2020.3 [17]. В качестве силового поля выбрано поле ff14SB [20], так как в нем существенно улучшена точность моделирования боковых цепей аминокислотных остатков по сравнению с ff99SB [20]. В качестве модели воды выбрана модель TIP3P, как наиболее подходящая для использования с силовым полем ff14SB. Ячейку заполняли молекулами воды. Кроме того, в систему добавляли 0.15 М KCl, а также несколько ионов K для уравнивания заряда системы. На первом этапе проводили минимизацию энергии с шагом 1 фс до максимальной силы 1000.0 кДж/моль⁻¹ нм⁻¹. Далее система была уравновешена при температуре 310 К и давлении 1 атм путем моделирования в NVT и NTP (100 пс в каждом) соответственно. Температуру и давление в системе контролировали с использованием модифицированного термостата Берендсена [21] и баростата Паринелло–Рахмана [22] с временными константами $\tau_{t,t} = 0.1$ пс и $\tau_{t,p} = 2$ пс соответственно. Расчет продуктивной МД проводили в изотермо-изобарическом ансамбле с шагом в 2 фс. Алгоритм LINCS [23] использовали для ограничения связей с участием атомов водо-

рода. Дальнедействующие электростатические взаимодействия рассчитывали с использованием схемы суммирования по Эвальду [24]. Радиусы действия сил Ван-дер-Ваальса и кулоновских взаимодействий были усечены до 1.4 нм, что является наиболее оптимальным для используемого силового поля [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получена динамическая модель взаимодействия Цит *c* из сердца лошади и бислоя, состоящего из молекул тетраолеилкардиолипина (рис. 1). Первая стадия (рис. 1а) заключается в приближении глобулы Цит *c* к данному бислою. Вторая стадия (рис. 1б) представляет собой присоединение посредством электростатических взаимодействий одного из лизиновых кластеров Цит *c* к бислою. Далее (рис. 1в) происходит погружение молекулы Цит *c* в бислой из тетраолеилкардиолипина, что сопровождается конформационными изменениями как в молекуле Цит *c*, так и в бислое. На рис. 1г изображен комплекс Цит *c* с тетраолеилкардиолипином в равновесном состоянии. Отметим, что после приближения молекулы Цит *c* к бислою на расстояние ~ 4 Å весь дальнейший процесс погружения происходит относительно быстро и занимает ~ 11 нс.

Молекула Цит *c* при взаимодействии с бислоем тетраолеилкардиолипина претерпевает конформационные изменения: происходит разрыв координационной связи между метионином-80 и железом гема (рис. 2). По-видимому, произошел переход молекулы Цит *c* в состояние “растопленной глобулы” [25].

Полученные результаты позволяют окончательно завершить затянувшуюся дискуссию о структуре данного комплекса, является он мембрано-связанным Цит *c* или наносферой, встроенной в липидный бислой, в пользу последнего предположения [13, 25–27]. Однако оно было существенно конкретизировано и в известной степени изменено. В данной гипотезе предполагалось, что заранее сформированная наносфера Цит *c*–кардиолипин не совсем понятным обра-

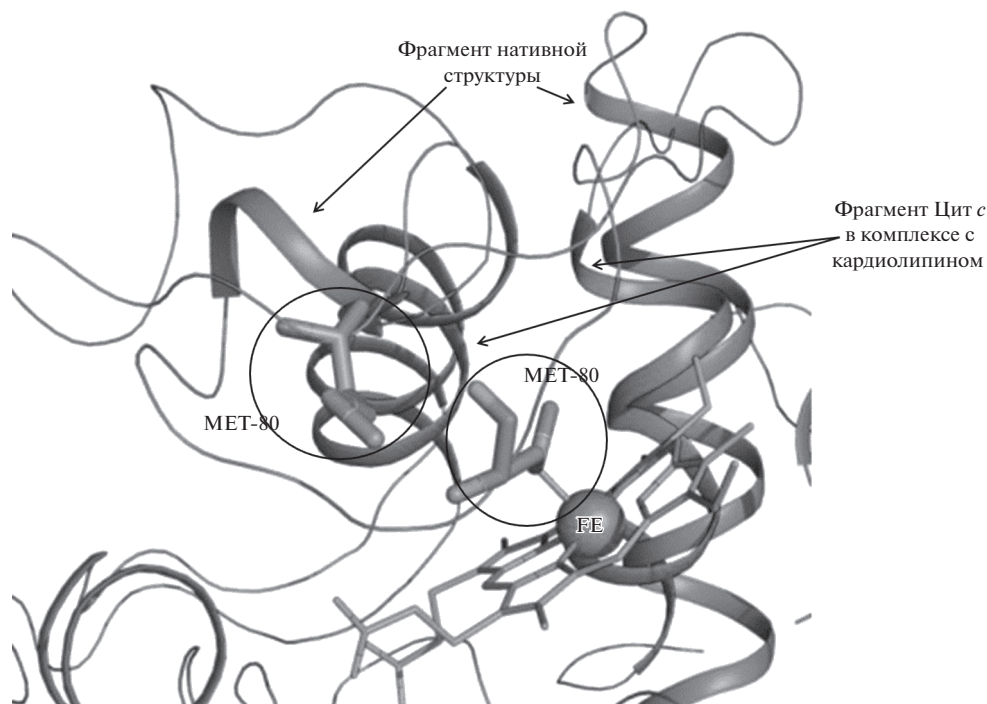


Рис. 2. Наложение кристаллической структуры Цит *c* из сердца лошади (PDB ID: 1hrc) на структуру Цит *c* в комплексе с монослоем тетраолеилкардиолипина, полученную методом молекулярной динамики. На рисунке показаны участки альфа-спиралей интактного Цит *c*, а также Цит *c* в комплексе с бислоем тетраолеилкардиолипина. Гем изображен тонкими линиями и его координаты совпадают для двух наложенных структур Цит *c*. Железо гема отмечено буквами FE. Метионины в 80-м положении (MET-80) полипептидной цепи Цит *c* изображены палочками, правый из них относится к интактному цит *c*, а левый – к структуре цит *c* в комплексе с бислоем тетраолеилкардиолипина. Наложение проводилось программой PyMol по C-alpha атомам Цит *c*.

зом оказывается внутри жидкого и гидрофобного липидного слоя мембраны, так что на обеих поверхностях мембраны образуется пузырь (так называемый bubble). Сам липидный бислои при этом как бы расщепляется на два [26]. Оказалось, что образование наносферы не предшествовало ее внедрению в липидный бислои, как предполагалось ранее, а произошло в момент самого внедрения благодаря тому, что фрагменты молекулы белка диффундировали сквозь цепочки фосфолипидных молекул. Вращательная подвижность участков полипептидной цепи и боковых групп аминокислотных остатков Цит *c* придает белковой глобуле свойства, характерные не для твердого тела, а для капли жидкости. Эта жидкая капля, не смешиваясь с липидным бислоем, тоже жидким, внедряется внутрь участка мембраны и остается там после установления окончательной стабильной структуры комплекса Цит *c*-кардиолипина. Таким образом, с использованием метода МД подтверждена сформулированная ранее гипотеза наносферы, а также построена модель такой наносферы на молекулярном уровне.

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

1. Brown L.R., Wuthrich K. // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1977. V. 468. P. 389. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(77\)90290-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90290-5)
2. Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A. et al. // *Free Radical Biol. Med.* 2009. V. 46. P. 1439. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004>
3. Sinibaldi F., Howes B.D., Piro M.C. et al. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2010. V. 15. P. 689. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0636-z>
4. Mandal A., Hoop C.L., DeLucia M. et al. // *Biophys. J.* 2015. V. 109. P. 1873. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.016>
5. Hanske J., Toffey J.R., Morenz A.M. et al. // *PNAS.* 2012. V. 109. P. 125. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112312108>
6. Quinn P.J., Dawson R.M.C. // *Biochem. J.* 1969. V. 115. P. 65. <https://doi.org/10.1042/bj1150065>

7. *Sinibaldi F., Fiorucci L., Patriarca A. et al.* // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 6928.
<https://doi.org/10.1021/bi800048v>
8. *Sinibaldi F., Howes B.D., Droghetti E. et al.* // Biochemistry. 2013. V. 52. P. 4578.
<https://doi.org/10.1021/bi400324c>
9. *Rytömaa M., Kinnunen P.K.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 1770.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42094-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42094-1)
10. *Rytömaa M., Kinnunen P.K.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 3197.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3197>
11. *Kawai C., Prado F.M., Nunes G.L. et al.* // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 34709.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M412532200>
12. *Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N. et al.* // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 4998.
<https://doi.org/10.1021/bi0525573>
13. *Владимиров Ю.А., Ноль Ю.Ц., Волков В.В.* // Кристаллография. 2011. Т. 56. № 4. С. 596.
14. *Marchenkova M.A., Dyakova Y.A., Tereschenko E.Y. et al.* // Langmuir. 2015. V. 31. P. 12426.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03155>
15. *Martínez L., Andrade R.E., Birgin G. et al.* // J. Comput. Chem. 2009. V. 30. P. 2157.
<https://doi.org/10.1002/jcc.21224>
16. *Case D.A., Cheatham T.E., 3rd, Darden T. et al.* // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1668.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
17. *Abraham M.J., Murtolad T., Schulz R. et al.* // SoftwareX. 2015. V. 1. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
18. *Da Silva A.W.S., Vranken W.F.* // BMC Res. Notes. 2012. V. 5. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367>
19. *Giammona D.A.* “An examination of conformational flexibility in porphyrins and bulky-ligand binding in myoglobin”. Diss. University of California, Davis, 1984.
20. *Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K. et al.* // J. Chem. Theory Comput. 2015. V. 11. P. 3696.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
21. *Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F. et al.* // J. Chem. Phys. 1984. V. 181. P. 3684.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
22. *Parrinello M., Rahman A.* // J. Chem. Phys. 1982. V. 76. P. 2662.
<https://doi.org/10.1063/1.443248>
23. *Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M.* // J. Comput. Chem. 1997. V. 18. P. 1463.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
24. *Darden T., York D., Pedersen L.* // J. Chem. Phys. 1993. V. 98. P. 10089.
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
25. *Hirota S., Ueda M., Hayashi Y. et al.* // J. Biochem. 2012. V. 152. P. 521.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvs098>
26. *Vladimirov Y.A., Proskurnina E.V., Alekseev A.V.* // Biochemistry (Moscow). 2013. V. 78. P. 1086.
<https://doi.org/10.1134/S0006297913100027>
27. *Vladimirov G.K., Vikulina A.S., Volodkin D. et al.* // Chem. Phys. Lipids. 2018. V. 214. P. 35.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.05.007>