

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 538.911

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА С С КАРДИОЛИПИНОМ

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

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

⁴ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

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

*E-mail: yurchekoanastasiaaa@yandex.ru

**E-mail: korotkovapol@gmail.com

Поступила в редакцию 09.10.2021 г.

После доработки 09.10.2021 г.

Принята к публикации 14.10.2021 г.

Методом молекулярной динамики промоделировано взаимодействие цитохрома С (Цит с) из сердца лошади с молекулами кардиолипина. Показано, что молекула Цит с образует комплекс с молекулами кардиолипина. Описаны стадии формирования комплекса Цит с–кардиолипин, взаимодействия молекулы Цит с с молекулами кардиолипина, конформационные изменения молекулы Цит с при формировании комплекса Цит с–кардиолипин. Полученные данные помогут понять механизм функционирования Цит с.

DOI: 10.31857/S0023476122030262

ВВЕДЕНИЕ

Цитохром С (Цит с) – это небольшой белок, содержащий в своем составе гем С [1, 2]. Цит с имеет две функции: является участником дыхательной цепи [3], а также одним из активаторов апоптоза – запрограммированной клеточной гибели. Известно, что взаимодействие Цит с с кластерами кардиолипина в составе внутренней мембраны митохондрий является одной из ключевых стадий процесса апоптоза [4–7]. В [8, 9] показано, что молекулы кардиолипина образуют комплекс с Цит с, а также высказывались предположения о строении данного комплекса [10, 11], однако на молекулярном уровне данный комплекс описан не был. Вместе с тем такой комплекс гидрофобен и способен катализировать реакции образования свободных радикалов как в водной среде, так и в гидрофобном окружении. Этот процесс приводит к перекисидации липидов мембран митохондрий, что приводит к запуску каскада реакций апоптоза и гибели клеток [12, 13]. Было показано, что при действии комплекса Цит с–кардиолипин на культуры раковых клеток активируется апоптоз и гибнут клетки, в том числе резистентные к обычным противораковым препаратам [14]. В настоящее время в связи с раз-

витием компьютерной техники, а также все большей доступностью суперкомпьютеров метод молекулярной динамики (МД) можно использовать для изучения достаточно больших систем, таких как белок-белковые комплексы и комплексы белков с билипидными мембранами на молекулярном уровне [15–17]. Имеются также работы по молекулярному моделированию ионного тока через ионные каналы, которые представляют собой трансмембранные белки или белковые комплексы [18]. Чтобы определить на молекулярном уровне структуру комплекса Цит с с кардиолипином, в настоящей работе исследована молекулярная динамика Цит с, помещенного в водное окружение с добавлением молекул кардиолипина. Описаны динамика формирования и свойства комплекса Цит с–кардиолипин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Построение начальной модели системы проведено с использованием программных пакетов PackMol [19] и AmberTools19 [20]. Для построения топологии гема использовали параметры, полученные в [21].

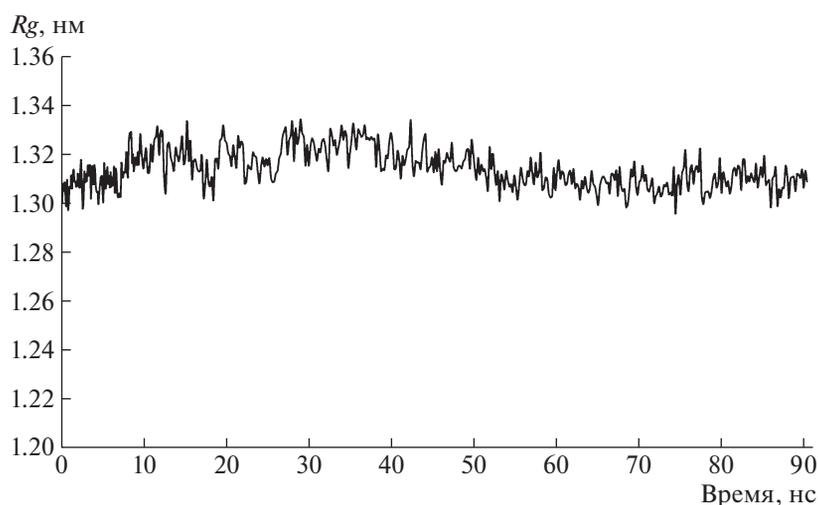


Рис. 1. График зависимости радиуса инерции молекулы Цит с от времени.

Моделирование МД проводили с помощью программы Amber18 [20]. В качестве силового выбрано поле ff14SB [22]. В качестве модели воды выбрана модель TIP3P, как наиболее подходящая для использования с силовым полем ff14SB. В систему добавили 0.15 М KCl, а также несколько ионов для нейтрализации заряда системы. Для релаксации структуры и избежания стерических клэшей выполнили минимизацию потенциальной энергии. Давление и температура в системе были уравновешены до 1 атм и 310 К путем запуска моделирования с ограничениями в NVT- и NPT-ансамблях (шесть этапов, 25–50 пс). После этого ограничение на подвижность атомов было снято, и уравновешивание продолжалось еще 2 нс. Давление и температуру в системе контролировали с использованием термостата Берендсена [23] и баростата Паринелло–Рахмана [24]. Продуктивное 90 нс моделирование МД для каждой из систем проводили в изотермо-изобарическом ансамбле с шагом в 2 фс. Ван-дер-ваальсовы и кулоновские взаимодействия были усечены до 1.4 нм, что является наиболее оптимальным для используемого силового поля [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначальный анализ траекторий включал в себя расчет зависимости среднеквадратичного отклонения радиуса инерции молекулы Цит с (рис. 1) и среднеквадратичных смещений (RMSF) C α -атомов Цит с (рис. 2). Рисунок 1 показывает, что радиус инерции существенно не изменяется в процессе моделирования, что говорит о том, что молекула Цит с не меняет свою компактность на промоделированной траектории. Рисунок 2 показывает, что молекула Цит с весьма подвижна на участке, представленном аминокислотными

остатками 20–30, и стабильна на остальных участках. Участок 20–30 представляет собой неупорядоченную петлю, не включающую в себя в отличие от других неупорядоченных петель в составе молекулы Цит с аминокислотных остатков, связанных с железом гема координационными связями. Вероятно, с этим связана подвижность данной петли.

В [25] показано, что в определенных условиях Цит с может менять свою конформацию, переходя в состояние так называемой “расплавленной глобулы”. Кроме того, присутствие в растворе кардиолипина может служить фактором перехода молекулы цитохрома в состояние расплавленной глобулы [26]. Переход Цит с в состояние расплавленной глобулы связывают с аксиальными аминокислотными остатками, координирующими железо гема [27]. В Цит с из сердца лошади координация гема осуществляется Met-80. На рис. 3 изображен график зависимости расстояния между серой Met-80 и железа гема от времени. Интересно, что, хотя окончательного разрыва координационной связи не происходит, расстояние между серой Met-80 и атомом железа гема колеблется в широком диапазоне, достигая на 47-й нс моделирования 4.8 Å. Это может свидетельствовать о начале перехода молекулы Цит с в состояние расплавленной глобулы.

Динамику формирования комплекса Цит с–кардиолипид можно условно разбить на четыре стадии. Изначально (рис. 4а) молекула цитохрома окружена липидами в произвольном порядке, однако через 3.6 нс (рис. 4б) уже заметны сформированные из молекул липида структуры. Видно, что большинство молекул липида находится около молекулы цитохрома, однако структура, которую они формируют, нестабильна и неоднородна. Также заметны пять небольших структур липидов

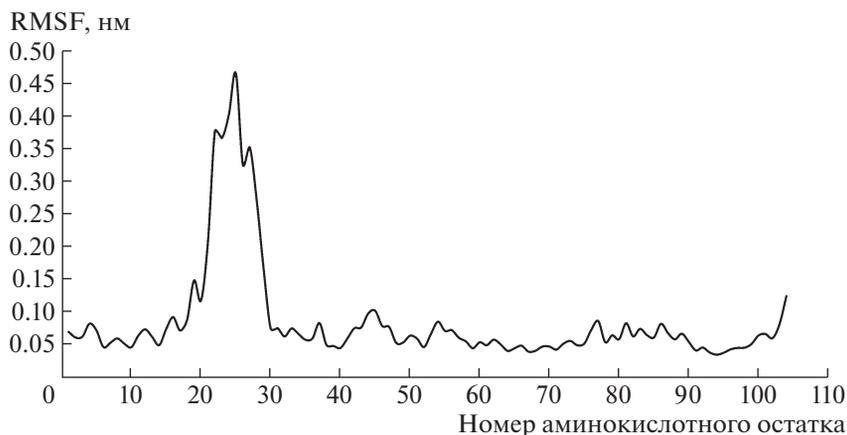


Рис. 2. Среднеквадратичные флуктуации Cα-атомов (RMSF) молекулы Цит с.

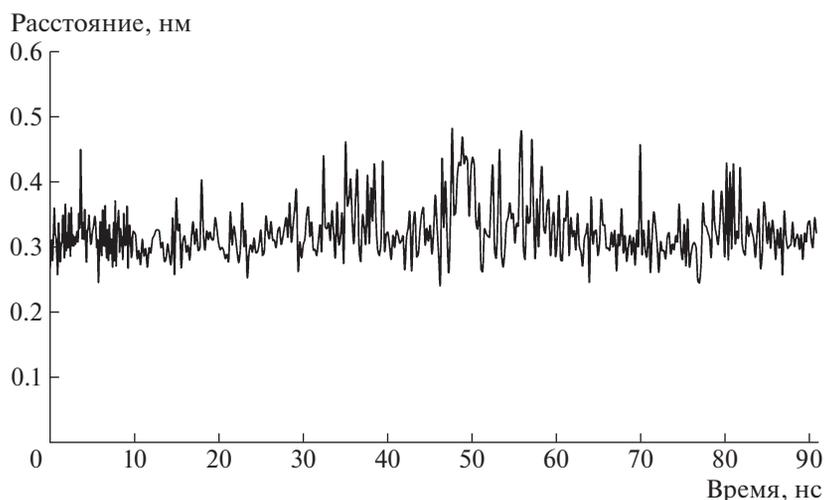


Рис. 3. График зависимости расстояния между железом гема и атомом серы метионина 80 в молекуле Цит с от времени.

от одной до восьми молекул кардиолипина в каждой. Самая большая из них содержит восемь молекул липида, еще одна — три, а остальные по одному. Молекулы липида, находящиеся около цитохрома, еще не сформировали энергетически выгодную структуру, о чем свидетельствует тот факт, что полярные головки липидов иногда расположены внутри липидной мицеллы. Начиная с 40 нс (рис. 4в) основная структура из липидов немного изменяется, она становится более плоской по сравнению со структурой, рассмотренной ранее. Также все полярные головки липидов с этого момента расположены снаружи мицеллы. Количество небольших структур липидов уменьшилось с пяти до четырех, самая большая из них все еще состоит из восьми липидов. Начиная с 54-й нс (рис. 4г) основная липидная мицелла стабилизировалась в комплексе с молекулой цитохрома. Кроме того, структура, состоящая из восьми липидов, прикрепилась к цитохрому с противоположной

от основной липидной мицеллы стороны. Отметим, что молекула Цит с не претерпевает существенных конформационных изменений (рис. 5).

В [28, 29] высказано предположение, что молекулы кардиолипина взаимодействуют с молекулой Цит с из сердца лошади преимущественно за счет лизиновых кластеров на поверхности молекулы цитохрома. В настоящей работе показано, что молекулы кардиолипина взаимодействуют со следующими положительно заряженными аминокислотными остатками на поверхности цитохрома: Lys7, Lys8, Lys22, Lys25, Lys27, Arg38, Lys53, Lys55, Lys72, Lys73, Lys79, Lys86, Lys87 и Arg91, что соответствует ранее выдвинутым предположениям, а также показывает важность аргининов во взаимодействии молекулы Цит с с кардиолипином.

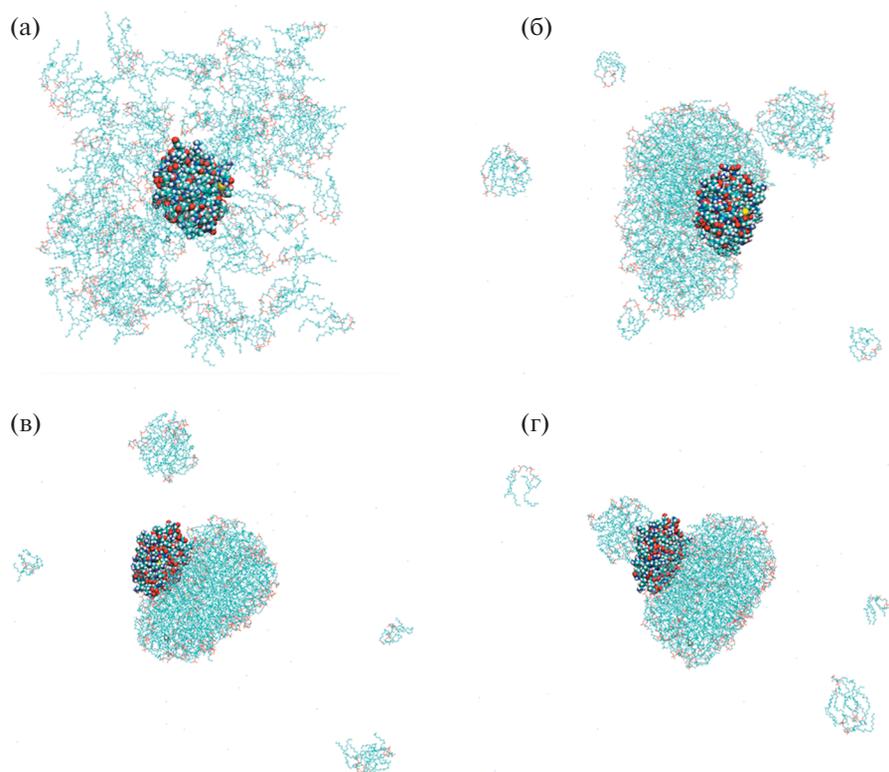


Рис. 4. Моделируемая система в начальном состоянии (а), на 3.6 (б), 40 (в) и на 54 нс (г). Сферами изображена молекула Цит с, линиями – молекулы кардиолипина.

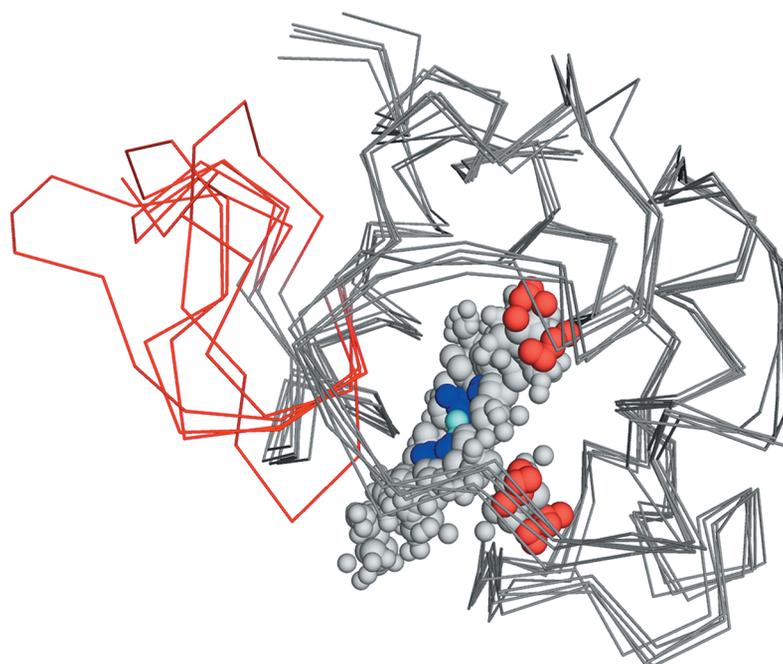


Рис. 5. Сравнение конформации молекулы Цит с в начальном состоянии, на 10, 30, 60 и 90-й нс. Красным отмечена подвижная петля 20–30. Сферами показаны гемы.

Данное исследование необходимо не только для расшифровки механизма процесса, важнейшего для жизни клеток и организма в целом, но

может иметь и непосредственное практическое значение для медицины. Известно, что действие существующих противораковых лекарственных

средств основано главным образом на стимуляции апоптоза или ферроптоза в раковых клетках. В [14] продемонстрирована способность каталитически реакционноспособного комплекса Цит *c* с кардиолипином индуцировать апоптоз и убивать раковые клетки в культуре. Было показано, что комплекс Цит *c* с кардиолипином продуцирует липопероксидные радикалы в двух реакциях: путем разложения липидных гидропероксидов и перекисного окисления липидов под действием перекиси водорода. Антиоксиданты ингибировали образование липидных радикалов. Именно комплекс Цит *c* с кардиолипином, а не сам Цит *c* резко повышал уровень апоптоза и гибель клеток в двух клеточных линиях: чувствительных к лекарственным средствам (A2780) и доксорубин-резистентным (A2780-Adr) клеткам [14]. Поскольку комплексы ферментов с липидами являются составными элементами клеток млекопитающих, то воздействие этих комплексов или их аналогов на раковые (или бактериальные) клетки может стать способом создания лекарственных препаратов, к которым у чужеродных клеток или микроорганизмов не вырабатываются механизмы защиты.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paul K.G. // *Acta Chem. Scand.* 1950. V. 4. P. 239. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.04-0239>
2. 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](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90200-6)
3. Pierron D., Wildman D.E., Hüttemann M. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1817. № 4. P. 590. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2011.07.007>
4. Santucci R., Sinibaldi F., Cozza P. et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 136. P. 1237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.180>
5. Liu X., Kim C.N., Yang J. et al. // *Cell.* 1996. V. 86. № 1. P. 147. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80085-9)
6. Zhivotovsky B., Orrenius S., Brustugun O.T. et al. // *Nature.* 1998. V. 391. № 6666. P. 449. <https://doi.org/10.1038/35060>
7. Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A. et al. // *Free Radical Biol. Med.* 2009. V. 46. № 11. P. 1439. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004>
8. Vladimirov Y.A., Nol Y.T., Volkov V.V. // *Crystallography Reports.* 2011. V. 56. № 4. P. 553. <https://doi.org/10.1134/S1063774511040250>
9. Marchenkova M.A., Dyakova Yu.A., Tereschenko E.Yu. et al. // *Langmuir.* 2015. V. 31. № 45. P. 12426. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03155>
10. Ascenzi P., Coletta M., Wilson M.T. et al. // *IUBMB Life.* 2015. V. 67. № 2. P. 98. <https://doi.org/10.1002/iub.1350>
11. Ascenzi P., Ciaccio C., Sinibaldi F. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 404. № 1. P. 190. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.091>
12. Ascenzi P., Polticelli F., Marino M. et al. // *IUBMB Life.* 2011. V. 63. № 3. P. 160. <https://doi.org/10.1002/iub.440>
13. Ascenzi P., Santucci R., Coletta M. et al. // *Biophys. Chem.* 2010. V. 152. № 1–3. P. 21. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.09.008>
14. Vladimirov Y.A., Sarisozen C., Vladimirov G.K. et al. // *Pharm Res.* 2017. V. 34. № 6. P. 1264. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2143-1>
15. Ulmschneider J.P., Ulmschneider M.B. // *Acc. Chem. Res.* 2018. V. 51. № 5. P. 1106. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00613>
16. Patra M.C., Kwon H.K., Batoool M. et al. // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 489. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00489>
17. Комолов А.С., Петренко Д.Е., Тимофеев В.И. // *Кристаллография.* 2021. Т. 66. № 6. С. 907. <https://doi.org/10.31857/S0023476121060187>
18. Shaïtan K.V., Li A., Tershkina K.B. et al. // *Biofizika.* 2007. V. 52. № 3. P. 301. <https://doi.org/10.1134/S0006350907030086>
19. Martínez L., Andrade R., Birgin E.G. et al. // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 30. № 13. P. 2157. <https://doi.org/10.1002/jcc.21224>
20. Case D.A., Cheatham T., Darden T. et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1668. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
21. 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.
22. 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>
23. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F. et al. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. № 8. P. 3684. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
24. Parrinello M., Rahman A. // *J. Chem. Phys.* 1982. V. 76. № 5. P. 2662. <https://doi.org/10.1063/1.443248>
25. Kataoka M., Hagihara Y., Mihara K. et al. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 229. № 3. P. 591. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1064>
26. Hanske J., Toffey J.R., Morenz A.M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. V. 109. № 1. P. 125. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112312108>
27. Hamada D., Kuroda Y., Kataoka M. et al. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 256. № 1. P. 172. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0075>
28. Brown L.R., Wüthrich K. // *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* 1977. V. 468. № 3. P. 389. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(77\)90290-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(77)90290-5)
29. Sinibaldi F., Howes B.D., Droghetti E. et al. // *Biochemistry.* 2013. V. 52. № 26. P. 4578. <https://doi.org/10.1021/bi400324c>