

На правах рукописи

Дюба Артём Владимирович

**СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ И КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА ЦИТОХРОМ c -
ОКСИДАЗЫ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВКЛАДОВ ГЕМОВ a И a_3**

Специальность 03.01.02 - “биофизика”

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена на Факультете биоинженерии и биоинформатики и в Научно-исследовательском институте Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:

Константинов Александр Александрович

доктор биологических наук, заведующий лабораторией электронного транспорта отдела молекулярной энергетики микроорганизмов НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты:

Андреев Игорь Михайлович

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории мембран растительных клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук»

Пицальников Роман Юрьевич

кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории лазерной спектроскопии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Защита состоится на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские Горы 1/24, МГУ, Биологический факультет, аудитория «Новая».

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте <http://www.bio.msu.ru/dissertations/view.php?ID=763>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук

М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Цитохром *c*-оксидаза (ЦО) участвует в важнейшем процессе аэробного дыхания и действует на конечном участке дыхательной цепи митохондрий и аэробных бактерий, перенося электрон от цитохрома *c* к O_2 и используя разность их окислительно-восстановительных потенциалов для создания трансмембранной разности электрохимических потенциалов ионов водорода. Расшифровка рабочего цикла ЦО является одной из самых актуальных задач молекулярной биоэнергетики.

В ЦО электрон передается на O_2 по цепочке кофакторов: цитохром *c* → Cu_A → гем *a* → гем a_3 → Cu_B → O_2 . Гемы *a* и a_3 химически идентичны, но отличаются по спиновому состоянию и координации гемового железа. Гем a_3 и Cu_B формируют «бизерный центр», в котором происходит восстановление O_2 до двух молекул воды с захватом 4-х H^+ из внутренней водной фазы. Кроме того, ЦО транслоцирует протоны через мембрану со стехиометрией $1H^+/e^-$. Для понимания сопряжения транспорта e^- и H^+ требуется проследить взаимное влияние редокс-состояния металлических центров и рК отдельных аминокислотных групп в протонных каналах. Поэтому нужно иметь возможность избирательно следить за состоянием отдельных редокс-кофакторов, и в первую очередь — гемов *a* и a_3 .

Гемы имеют интенсивные и узкие полосы поглощения в области 400-650 нм, положение и форма которых являются маркерами редокс- и спинового состояния гемов. Однако в ЦО полосы поглощения гемов *a* и a_3 сильно перекрываются. Наиболее интенсивные полосы (полосы $Core$) гемов восстановленной ЦО образуют единый асимметричный пик (Рис. 1А). Несмотря на широкое применение абсорбционной спектроскопии в исследованиях механизма работы ЦО, спектры поглощения отдельных гемов a^{2+} и a_3^{2+} в области $Core$ до сих пор не были определены. В частности, не выяснено, к какому из гемов относится коротковолновое плечо на спектре восстановленной ЦО. Кроме того, отсутствуют прямые экспериментальные данные о вкладе гема a_3 в спектр ЦО в области α - и β -полос («видимой области»), где преобладает поглощение гема *a*.

Сопряженный подход, — спектроскопия кругового дихроизма (КД) в области поглощения гемов, — будучи перспективен с точки зрения изучения структуры и

механизма работы ЦО, без отсутствия понимания происхождения КД ЦО применяется ограниченно. Создание теоретической модели КД ЦО позволило бы описать параметры электронных переходов в гемах и разработать инструмент слежения за состоянием белкового окружения гемов.

Отдельной важной задачей стало исследование взаимодействия ЦО с Ca^{2+} . Связывание Ca^{2+} с ЦО избирательно сдвигает спектр поглощения гема *a* [Wikström, Saari 1975], что было использовано нами в качестве одного из подходов к реконструкции индивидуального спектра поглощения гема a^{2+} . С другой стороны, недавно обнаружено, что присоединение Ca^{2+} в особом центре связывания катионов ингибирует активность ЦО [Vygodina et al., 2013, 2014]. Было интересно выяснить, сопровождается ли вызываемый Ca^{2+} спектральный сдвиг гема *a* действием на перенос электронов через этот кофактор.

Цель работы:

Цель настоящей работы заключалась в экспериментальном определении индивидуальных вкладов гемов *a* и *a₃* в спектры поглощения и кругового дихроизма цитохром *c*-оксидазы из сердца быка, а также в анализе полученных спектров путем их разложения на отдельные электронные и электронно-колебательные переходы.

Основные задачи исследования:

1. С помощью нескольких независимых подходов, включая анализ спектрального сдвига, вызываемого ионами Ca^{2+} , и избирательное фотовыцветание, определить форму абсолютных спектров поглощения восстановленных гемов *a* и *a₃* в полосе Сорe.

2. Определить разностный спектр «восстановленный минус окисленный» для гема *a₃* в области γ - и α -полос поглощения в покоящейся и активированной формах фермента, отличающихся состоянием кислород-редуктазного центра.

3. Выяснить, связан ли спектральный сдвиг полосы поглощения гема *a* под действием Ca^{2+} с изменением скорости переноса электронов через гем *a*.

4. Исследовать оптическую активность цитохром *c*-оксидазы в разных состояниях окисления. На основе трехмерной структуры цитохромоксидазы

построить модель сопряженных осцилляторов, включающую геммы и окружающие их ароматические аминокислотные остатки, и с ее помощью исследовать факторы, определяющие сигнал кругового дихроизма цитохромоксидазы в области полосы Сорс поглощения гемов.

5. Используя построенную модель, определить параметры отдельных электронных переходов в полосе Сорс каждого из гемов.

Научная новизна

Для определения спектральных свойств отдельных гемов a и a_3 впервые применены оригинальные подходы: анализ избирательного сдвига полосы поглощения гема a^{2+} при связывании Ca^{2+} и селективное фотовыцветание гемов a и a_3 в ЦО типа aa_3 и ba_3 . Подобраны условия, позволившие разделить во времени фазы восстановления гемов a и a_3 с помощью метода быстрого смешивания, используя в качестве восстановителя высокие концентрации гексааммиаката рутения (RuAm) в присутствии избытка дитионита. Предложенными методами определены формы индивидуальных абсолютных спектров поглощения гемов a^{2+} и a_3^{2+} в области полосы Сорс, а в области α -полосы — определена форма абсолютного спектра гема a^{2+} и впервые экспериментально получен разностный спектр «восстановленный минус окисленный» для гема a_3 . Установлены параметры отдельных электронных переходов в гемах a и a_3 . Показано, что коротковолновое плечо полосы Сорс на спектре поглощения восстановленной ЦО обусловлено поглощением гема a_3^{2+} , а не гема a^{2+} , как было принято считать ранее.

Исследования быстрой кинетики восстановления ЦО позволили впервые выявить существенный вклад «видимой меди» Cu_A в абсорбционный спектр ЦО сердца быка в области β -полос поглощения гемов.

Впервые предложена модель, связывающая спектры КД ЦО с трехмерной структурой фермента. Показано, что сигнал КД ЦО в области полосы Сорс объясняется диполь-дипольным взаимодействием гемов друг с другом и с окружающими ароматическими аминокислотными остатками.

Несколькими независимыми методами подтверждено расщепление полосы Сорс гема a^{2+} . При моделировании спектров КД показано, что диполь-дипольное

взаимодействие способствует расщеплению электронных переходов полосы *Soret*.

Впервые установлено, что связывание ионов Ca^{2+} ингибирует поступление электронов на гем *a* и перенос электрона с гема *a* на гем *a₃*.

Научно-практическая значимость работы

Данная работа позволяет лучше понять и интерпретировать спектральные свойства ЦО *aa₃* из сердца быка и *ba₃* из *Thermus thermophilus*. Результаты углубляют современные представления о спектрах низко- и высокоспиновых гемов и представляют интерес для специалистов в области спектроскопии поглощения гемопротеидов и, в особенности, терминальных оксидаз, а также для исследователей, использующих метод абсорбционной спектроскопии для изучения гем-содержащих ферментов. Предложенный метод избирательного фотовыцветания, примененный в данной работе к оксидазам *aa₃* и *ba₃*, может быть полезен при изучении других мультигемовых белков. Модели сопряженных осцилляторов, аналогичные описанной в данной работе, могут быть использованы при изучении КД белков, пептидов и нуклеиновых кислот.

Положения, выносимые на защиту

1. С помощью нескольких независимых подходов разделены перекрывающиеся спектры поглощения восстановленных гемов *a* и *a₃* в полосе *Soret* цитохром *c*-оксидазы. Полученные разными методами формы спектров согласуются между собой.

2. Формы индивидуальных полос поглощения восстановленных гемов *a* и *a₃* не соответствуют общепринятым в литературе. Найдены возможные причины ошибок в предшествующих работах.

3. Спектр поглощения каждого из восстановленных гемов может быть описан вкладами двух чисто электронных переходов, расщепленных по энергии на ~ 10 нм. В отличие от спектра гема *a*, спектр гема *a₃* содержит вклад дополнительной коротковолновой полосы, предположительно описывающей совокупность вибронных спутников.

4. Разделение фаз восстановления гемов *a* и *a₃* с помощью методов быстрой кинетики позволило впервые получить экспериментально разностный спектр

(восстановленный минус окисленный) гема a_3 ; форма спектра существенно отличается для активированной и неактивированной цитохромоксидазы.

5. Сдвиг спектра поглощения гема a , вызываемый присоединением ионов Ca^{2+} в специальном центре связывания катионов, сопровождается замедлением переноса электронов через этот редокс-центр.

6. Разработана модель, позволяющая рассчитать спектр КД цитохромоксидазы в полосе Соре на основании спектра поглощения и трехмерной структуры фермента. Оптическая активность фермента может быть количественно объяснена диполь-дипольным взаимодействием гемов друг с другом и белковым окружением. Моделирование кругового дихроизма подтверждает расщепление электронных переходов в восстановленном геме a .

7. Изменения поглощения в области 470-580 нм, сопровождающие восстановление гема a , содержат заметный вклад видимой меди " Cu_A ", обычно считающейся бесцветной в этом диапазоне.

Апробация. Результаты диссертационной работы представлены на 16-ой, 17-ой и 18-ой Европейских конференциях биоэнергетиков (Варшава, 2010, Фрайбург, 2012, Лиссабон, 2014), международных конференциях «Математика. Компьютер. Образование» (Дубна/Пушино, 2008, 2009, 2010), 17-й конференции студентов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2010) и 79-й Гарденовской конференции «Выделение и восстановление кислорода — общие принципы» (Инсбрук, 2016).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 18 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах из «Перечня ВАК РФ».

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает 209 страниц машинописного текста, 8 таблиц, 66 рисунков, и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Приложения». Список цитированной литературы включает 244 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Содержит 4 главы. В первой главе разбирается строение ЦО, ее редокс-цикл, а также приводятся данные о движении протонов внутри фермента. Во второй главе обсуждаются спектры поглощения порфиринов в их взаимосвязи с химической структурой, и приводится номенклатура полос поглощения на спектре ЦО (Рис. 1). Разъясняется, что в α -полосу и чисто электронную часть В-полосы дают вклад по два электронных x, y -перехода, дипольные моменты которых располагаются в плоскости порфиринового кольца перпендикулярно друг другу. В симметричных гемах x, y -переходы вырождены по энергии, однако в гемах ЦО вырождение может сниматься. Приводятся возможные причины подобного расщепления. В третьей главе рассматриваются спектры КД ЦО и других гемопротеидов, обсуждается их взаимосвязь со структурой и методы расчета. В четвертой главе разбирается взаимодействие ЦО с Ca^{2+} .

Материалы и методы

В данном разделе описаны объекты исследования, процедуры и состав сред для приготовления препаратов и проведения экспериментов, условия регистрации спектров поглощения и КД, схема установки для экспериментов по фотовыцветанию гемов с помощью фемтосекундной спектроскопии (эксперименты проведены в лаборатории д-ра Мартена Васа, Политехническая Школа, Палезо, Франция), а также характеристики установки SX20 (Applied Photophysics, Великобритания), — спектрофотометра с быстрым смешиванием и регистрацией спектров на фотодиодной матрице, использованного для разделения фаз восстановления гемов a и a_3 . Описано программное обеспечение, применявшееся для обработки данных, в том числе созданное нами.

Результаты

Раздел “Результаты” включает 2 главы, посвященные, соответственно, индивидуальным спектрам поглощения восстановленных гемов a и a_3 ЦО и спектрам КД ЦО.

Глава 1. Определение абсолютных спектров поглощения восстановленных гемов a и a_3 ЦО

В главе описываются индивидуальные спектры поглощения гемов восстановленной ЦО. Формы абсолютных спектров получены с помощью двух независимых подходов: 1) анализ селективного сдвига спектра поглощения гема a при связывании Ca^{2+} и 2) избирательное фотовыцветание гемов в оксидазах типа aa_3 и ba_3 .

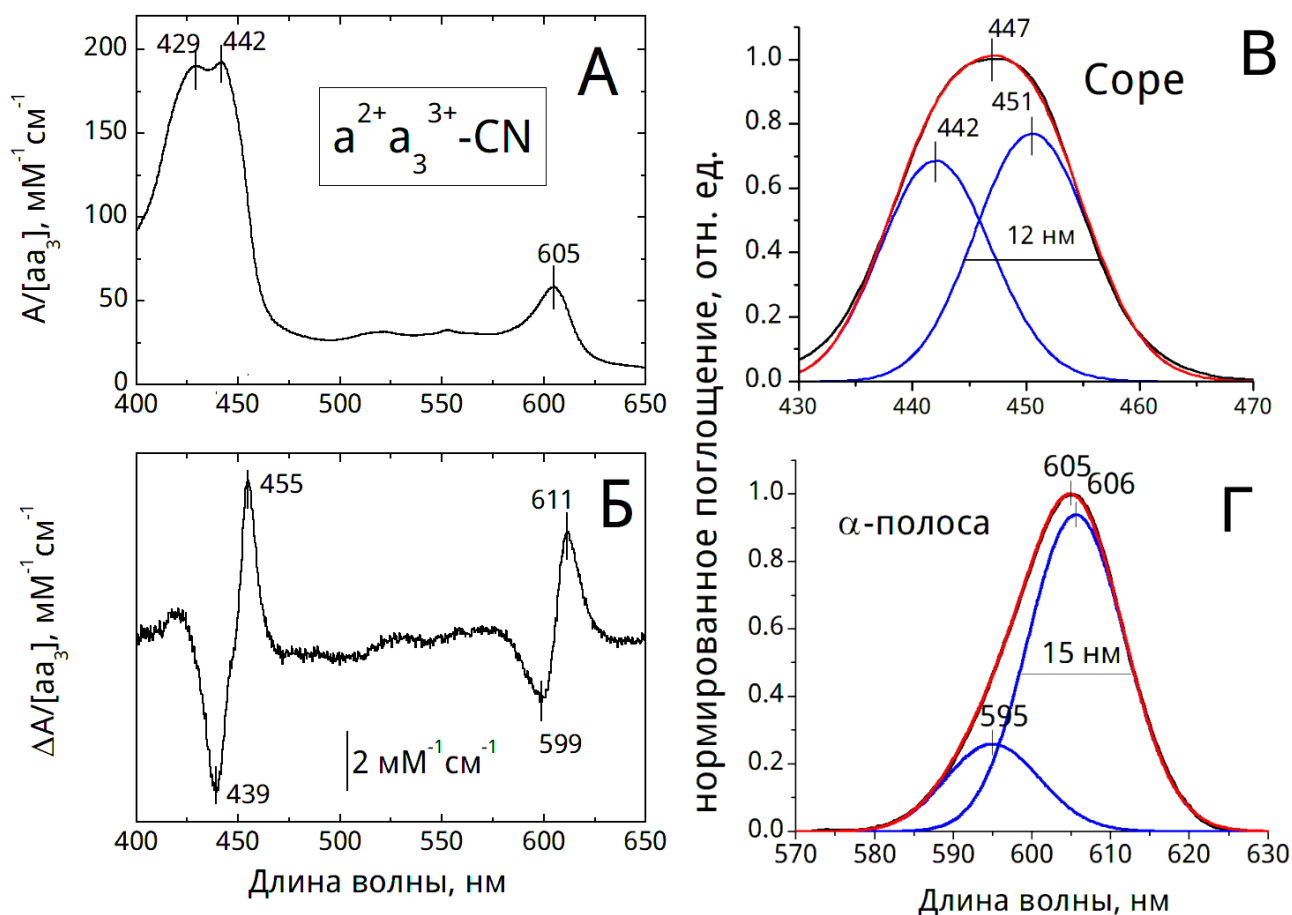


Рис. 2. Реконструкция формы абсолютного спектра гема a^{2+} . А: спектр поглощения комплекса $a^{2+}a_3^{3+}$ -CN. Б: разностный спектр действия Ca^{2+} . В и Г: первообразные спектрального сдвига в области полосы Soret и α -полосы, соответственно. Здесь и далее синими линиями показаны гауссовы компоненты, а красной линией — их сумма.

Реконструкция абсолютного спектра гема a^{2+} по сдвигу, вызванному Ca^{2+}

Связывание Ca^{2+} в катионсвязывающем центре ЦО из сердца быка приводит к избирательному малому (~ 1 нм) красному сдвигу полос поглощения гема a , не затрагивая спектр гема a_3 [Wikström, Saari 1975]. Поэтому первообразная от разностного спектра действия Ca^{2+} дает форму абсолютного спектра гема a , свободную от вклада гема a_3 .

В этих опытах использовался комплекс смешанной валентности $a^{2+}a_3^{3+}$ -CN, на спектре поглощения которого (Рис. 2А) α -полоса имеет максимум при 605 нм, а полоса Соре — два максимума при 429 и 442 нм, обусловленных, соответственно, вкладом гема a_3^{2+} в комплексе с CN^- и гема a^{2+} . Разностный спектр, вызываемый добавлением Ca^{2+} к комплексу $a^{2+}a_3^{3+}$ -CN (Рис. 2Б) характеризуется узкими S-образными сигналами в области α - и γ -полос поглощения гема a^{2+} . Первообразная в соответствующих диапазонах длин волн дает форму исходных α - и γ -полос поглощения гема a^{2+} (Рис. 2В и Г). Обе полосы хорошо аппроксимируются суммой двух гауссовых компонент, центры которых разнесены на 11 нм (595 нм и 606 нм) в α -полосе и на 9 нм (442 нм и 451 нм) в полосе Соре, что свидетельствует о расщеплении электронных х,у-переходов. Реконструированная форма спектра гема a^{2+} в полосе Соре достаточно симметрична и не содержит коротковолнового плеча.

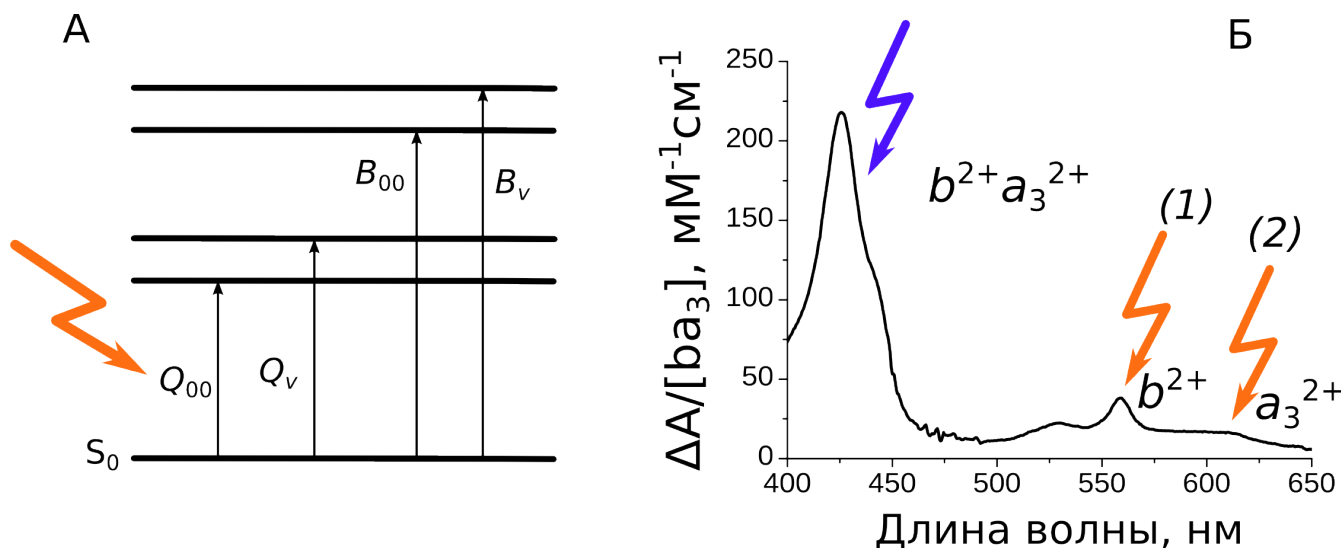


Рис. 3. Схема регистрации фотовыцветания. А: упрощенная схема электронных переходов в Q- и V-полосах. Б: схема селективного возбуждения гемов b и a_3 в ЦО ba_3 . Возбуждающие импульсы (оранжевые стрелки) имеют спектральный профиль с центром в области α -полосы гема b (1) или a_3 (2), сканирующий импульс (синяя стрелка) регистрирует спектральные изменения в полосе Соре.

Селективное фотовыцветание гемов a и a_3

Формы абсолютных спектров гемов a^{2+} и a_3^{2+} в полосе Соре были независимо определены в экспериментах по селективному фотовыцветанию ЦО aa_3 - и ba_3 -типа. Поскольку электронные переходы α - и γ -полос осуществляются с одного и того же основного электронного состояния (Рис. 3А), возбуждение образца восстановленной ЦО короткими (порядка 100 фс) лазерными импульсами в области α -полосы вызывает временное уменьшение абсорбции (фотовыцветание), как в α -, так и в γ -полосе. Фотовыцветание в полосе Соре регистрируется сканирующим импульсом, следующим непосредственно за возбуждающим (Рис. 3Б).

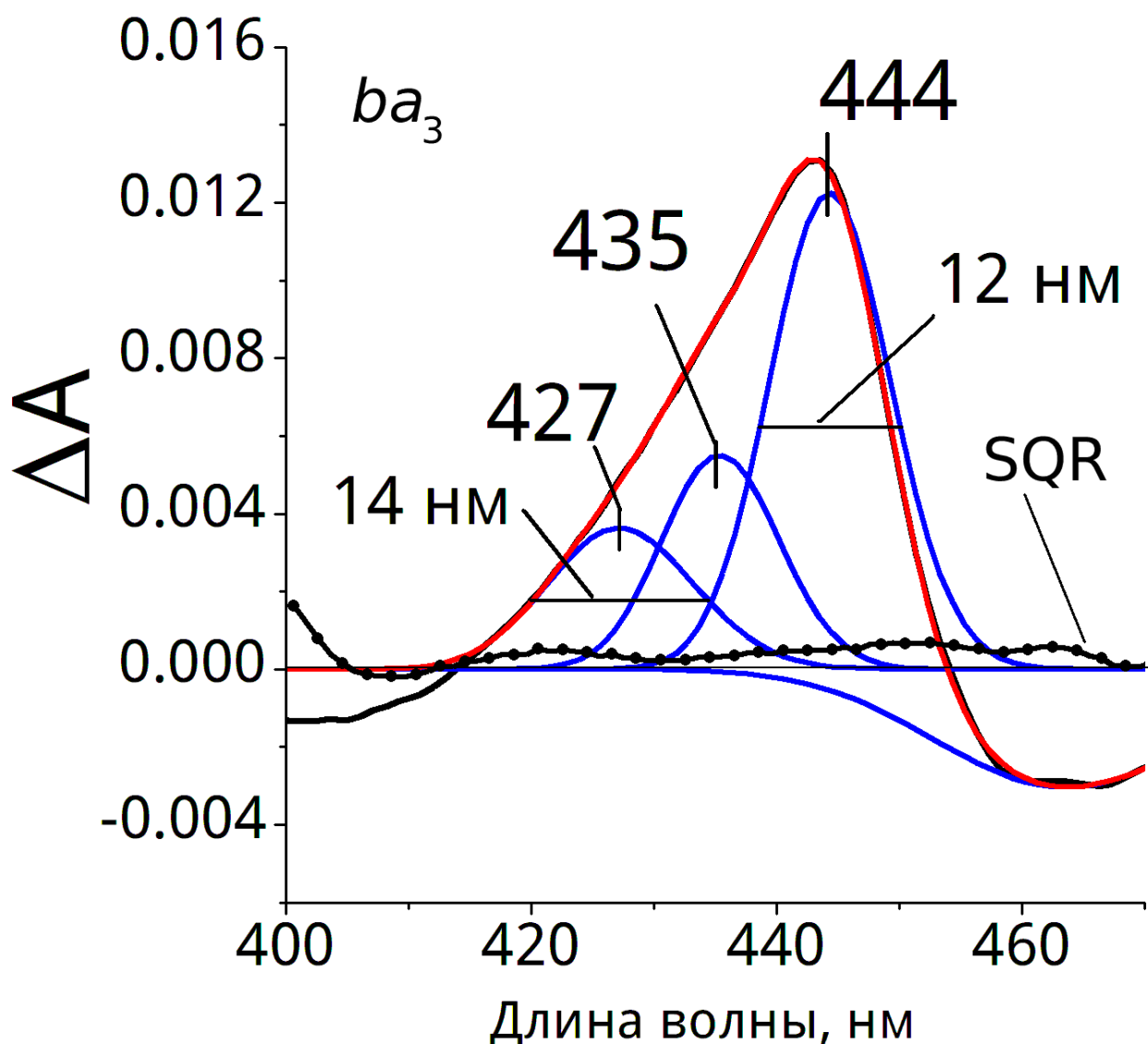


Рис. 4. Спектр фотовыцветания ЦО ba_3 при возбуждении импульсом 623 нм. Кружками отмечен спектр фотовыцветания SQR, содержащей 2 гема b , при возбуждении тем же импульсом.

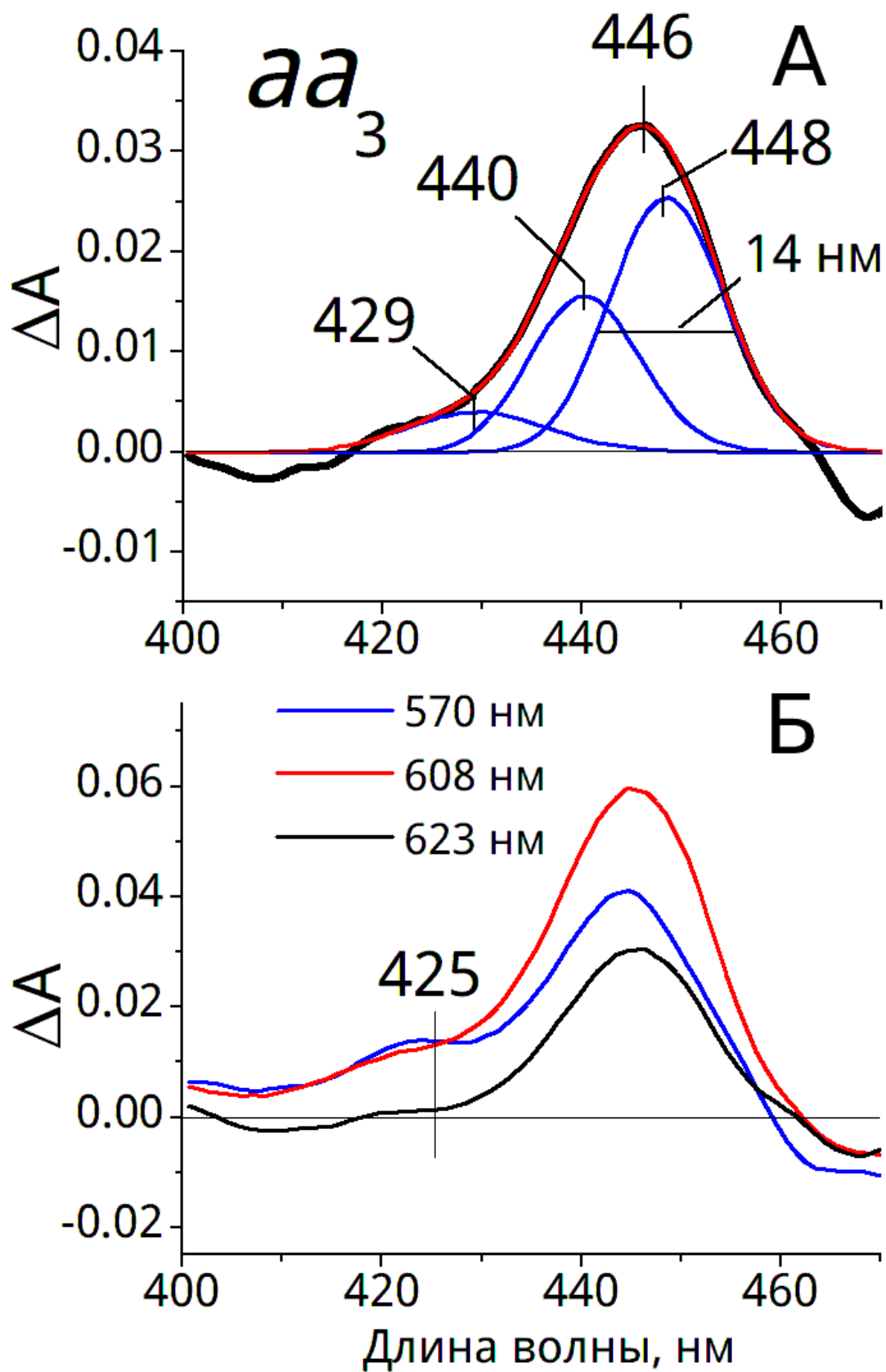


Рис. 5. Спектры фотовыцветания ЦО *aa*₃. А: возбуждение импульсом 623 нм. Б: возбуждение импульсами 623, 608 и 570 нм.

В восстановленной ЦО ba_3 из *Thermus thermophilus* α -полосы гемов b^{2+} при 558 нм и a_3^{2+} при 614 нм хорошо отделены друг от друга (Рис. 3Б), поэтому импульсы при разных длинах волн избирательно возбуждают гем b^{2+} или a_3^{2+} . Спектр фотовыцветания ЦО ba_3 при импульсе 623 нм, возбуждающем гем a_3 в 25 раз эффективнее, чем гем b , приведен на Рис. 4. Спектр несимметричен, и кроме основного пика при ~ 444 нм видны вклады коротковолновых компонент при ~ 435 и ~ 427 нм. При возбуждении таким же импульсом сукцинат: коэнзим Q-редуктазы (SQR) из *Bacillus subtilis*, содержащей только гемы b , полоса Соре не выцветает (рис. 4, отмечено кружками). Следовательно, коротковолновые компоненты в спектре фотовыцветания ba_3 не связаны с возбуждением гема b^{2+} , а принадлежат гему a_3^{2+} .

В восстановленной ЦО типа aa_3 из сердца быка импульс при 623 нм возбуждает гем a^{2+} примерно в два раза эффективнее, чем гем a_3^{2+} . Соответствующий спектр фотовыцветания (Рис. 5А) почти симметричен, за исключением небольшого коротковолнового плеча, вклад которого увеличивается при переходе к возбуждению при 608 нм и 570 нм, то есть при уменьшении избирательности возбуждения гема a_3^{2+} (Рис. 5Б). Однако селективность возбуждения отдельных гемов в ЦО aa_3 при любой длине волны все же недостаточно высока, и для получения «чистых» спектров фотовыцветания гемов a и a_3^{2+} мы провели процедуру одновременного разложения на гауссовы компоненты трех полученных спектров фотовыцветания, с отнесением компонент к отдельным гемам. Свободный от вклада a_3^{2+} спектр фотовыцветания гема a^{2+} (Рис. 6А) имеет симметричную форму, совпадающую с первообразной разностного спектра действия Ca^{2+} . «Чистый» спектр фотовыцветания гема a_3^{2+} (Рис. 6Б), напротив, несимметричен и содержит вклад коротковолновой полосы при ~ 422 нм, возможно, являющейся вибронным компонентом. В обоих случаях чисто электронные х,у-переходы в полосе Соре разнесены по энергии на 9 нм (гем a^{2+}) и 10 нм (гем a_3^{2+}).

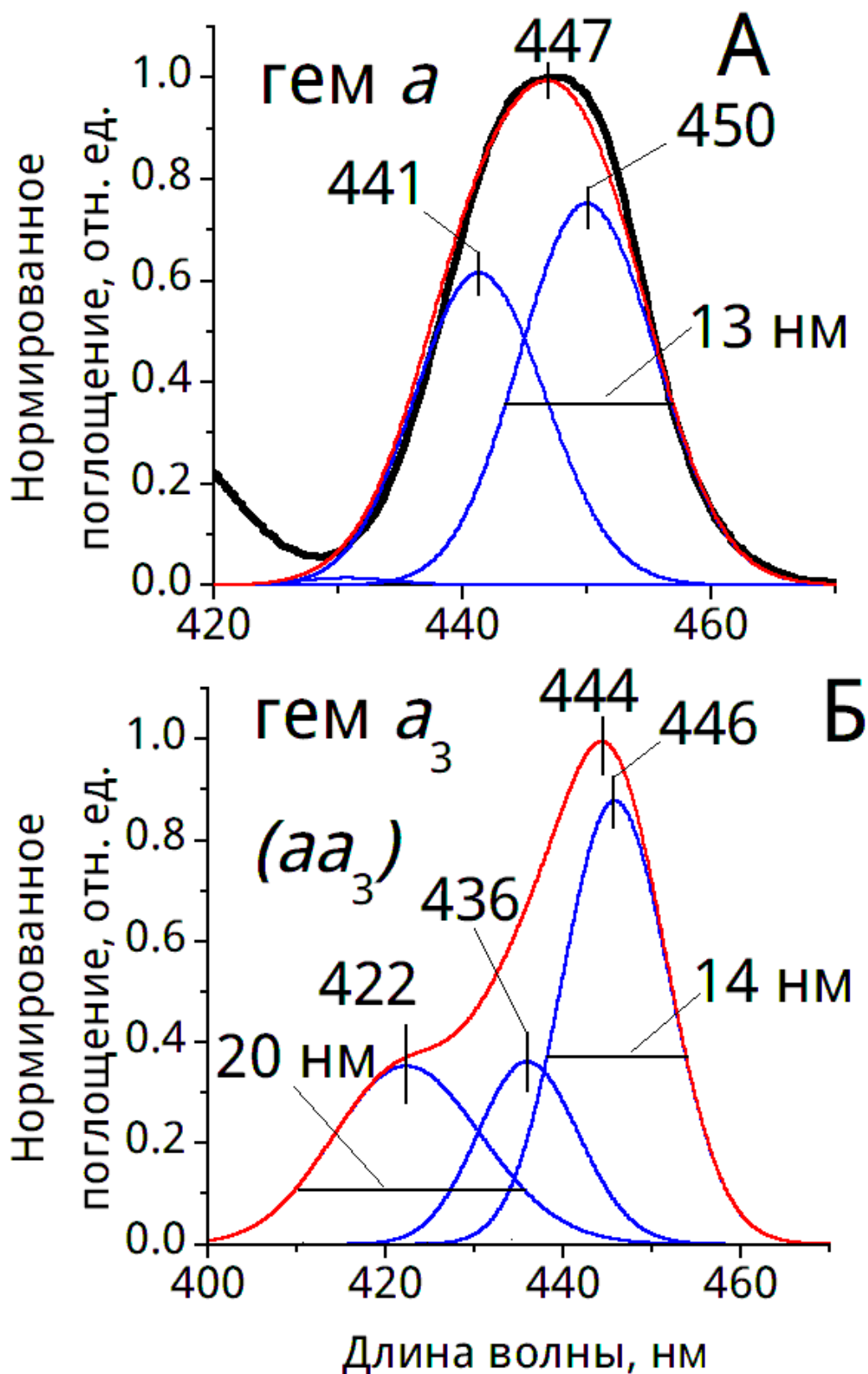


Рис. 6. «Чистые» спектры фотовыцветания гемов ЦО aa_3 (красные линии). А: спектр гема a^{2+} . Б: спектр гема a_3^{2+} . На рисунке (А) черной линией показана первообразная индуцированного Ca^{2+} спектрального сдвига полосы Соре гема a^{2+} .

Исследования кинетики восстановления ЦО

В области α -полосы поглощает в основном гем a , поэтому до последнего времени спектр гема a_3 в области α -полосы мог быть лишь прикидочно оценен на основании косвенных данных. Для прямого определения разностного спектра «восстановленный минус окисленный» гема a_3 мы исследовали кинетику восстановления ЦО. При достаточно быстром восстановлении ЦО внешним донором e^- восстановление гема a и Cu_A происходит много быстрее, чем перенос e^- к гему a_3 . В таких условиях фазы восстановления гема a и гема a_3 хорошо разделяются во времени, а спектры фаз соответствуют индивидуальным разностным спектрам гемов a и a_3 .

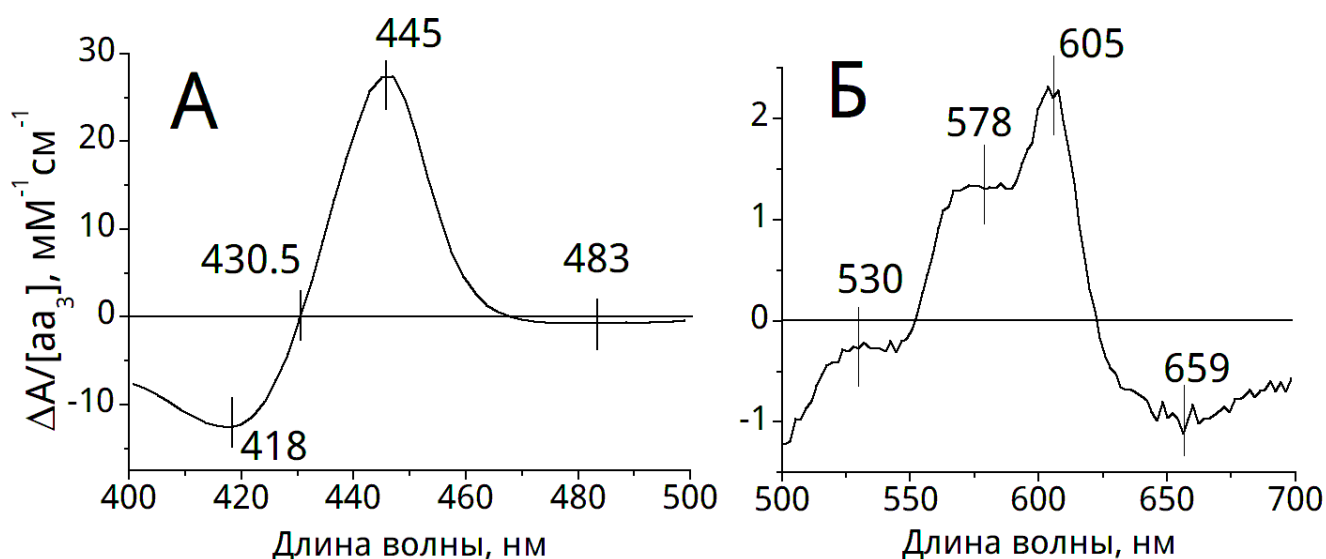


Рис. 8. Разностный спектр «восстановленный минус окисленный» гема a_3 . А: область полосы Soret. Б: область α - и β -полос. Спектры получены глобальным анализом эволюции спектров восстановления ЦО дитионитом в присутствии высокой концентрации (3 мМ) RuAm по модели одностадийного перехода $a^{2+}a_3^{3+} \rightarrow a^{2+}a_3^{2+}$ (см. текст).

При смешивании раствора, содержащего восстановленную ЦО и дитионит, с O_2 -содержащим буфером в присутствии высокой концентрации ($\sim 10^{-3}$ М) эффективного донора электронов RuAm происходит очень быстрое окисление ЦО кислородом, а затем ее ревосстановление RuAm. Прохождение цикла «восстановление-окисление» непосредственно перед записью кинетики переводит биядерный центр в однородное «активированное» состояние. Начальные окисление и ре-восстановление гема a^{2+} происходят за время смешивания, и дальнейшая регистрация спектров фиксирует

лишь стадию восстановления гема a_3 . Разностный спектр гема a_3 , полученный методом глобального анализа спектральных изменений, характеризуется в области Соре минимумом при 418 нм (исчезновение свободного a_3^{3+}), максимумом при 445 нм (образование a_3^{2+}) и изобестической точкой при ~ 430.5 нм, а в области α -полосы — довольно слабым максимумом при 605 нм (на порядок слабее, чем для гема a^{2+}), плечом при 578 нм (Рис. 8) и провалом около 660 нм.

Обычно считается, что ионы меди Cu_A и Cu_B «бесцветны» и не дают заметного вклада в поглощение ЦО в обычном диапазоне исследований ~ 400 -700 нм. Однако при анализе кинетики восстановления комплекса aa_3 -СN обнаружено, что в области 460-480 нм синхронно с восстановлением гема a^{2+} происходит выцветание широкой полосы, интенсивность и форма которой близки к ожидаемым для окисленной Cu_A .

Отдельным важным разделом работы явилось исследование взаимодействия цитохром c -оксидазы с ионами Ca^{2+} . Как было показано [Vygodina et al., 2013,2014], связывание Ca^{2+} вызывает частичное ингибирование цитохром c -оксидазной активности фермента, и этот новый эффект может иметь большое физиологическое значение в регуляции кальцием окислительного фосфорилирования. Оставалось неизвестным, на какие стадии переноса электронов действует кальций. Исследуя быструю кинетику восстановления и окисления ЦО, мы показали, что Ca^{2+} на 20-25% замедляет перенос электронов через гем a , снижая как скорость его восстановления, так и скорость его окисления гемом a_3 .

Глава 2. Круговой дихроизм цитохром c -оксидазы

В главе представлено исследование спектров КД ЦО в области поглощения гемов. Приведены экспериментальные спектры КД ЦО без лигандов в окисленном и восстановленном состоянии, а также комплексов с СО и CN^- различной валентности.

В силу плоской структуры гемы ЦО сами по себе должны иметь нулевой КД. Для объяснения спектров КД гемов в составе ЦО была построена модель сопряженных осцилляторов, позволяющая рассчитать спектр КД и поглощения на основе трехмерной структуры, известной из рентгеноструктурного анализа. Каждый электронный переход моделируется осциллирующим диполем и описывается энергией перехода, силой осциллятора и полушириной линии. Взаимодействие

диполей рассчитывается по законам классической электростатики. В модель включены чисто электронные переходы полосы Соре гемов a и a_3 , а также окружающих ароматических аминокислотных остатков.

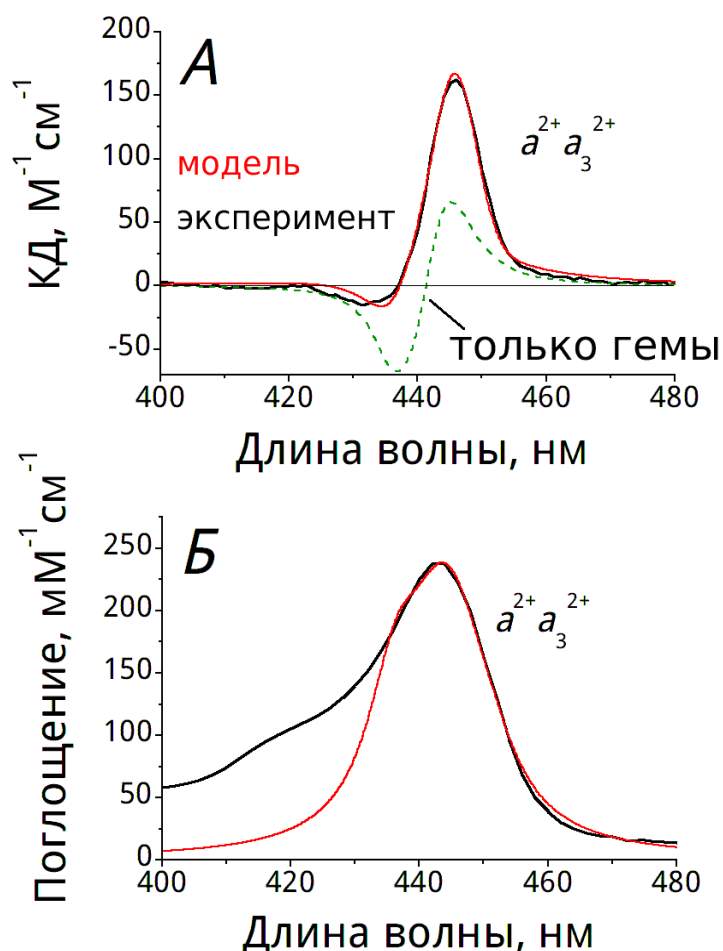


Рис. 9. Расчет спектров КД (А) и поглощения (Б) восстановленной ЦО сердца быка. Черные кривые — экспериментальные спектры, красные кривые — расчетные спектры системы, включающей гемы и ароматические остатки. Зеленым показан расчетный спектр КД для системы, включающей только гемы.

Согласно расчетам, одно лишь диполь-дипольное взаимодействие гемов a и a_3 не может описать наблюдаемые спектры КД (зеленая кривая на Рис. 9А), однако при учете взаимодействия с переходами ароматических остатков удается подобрать параметры электронных переходов гемов так, чтобы расчетные спектры совпадали с экспериментальными (Рис. 9). Значения энергий $B_{x,y}$ -переходов, подобранные для гема a^{2+} , соответствуют 436 нм и 451 нм, что подтверждает расщепление полосы Соре гема a^{2+} . По данным моделирования, расщепление полосы присуще самому гему a^{2+} , однако взаимодействие с гемом a_3 и ароматическими остатками вдвое усиливает его. Расчет

показывает, что состояние тирозина-244, играющего большую роль в работе ЦО, заметно влияет на спектры КД.

Обсуждение

В первой части «Обсуждения» показано, что полученные нами формы спектров гемов a и a_3 заметно расходятся с канонической точкой зрения. Критически рассмотрены подходы, использованные для этой цели ранее, и указаны возможные причины ошибок. Во второй и третьей частях обсуждаются вероятные причины расщепления полос $Sore$, соответственно, гемов a^{2+} и a_3^{2+} . В четвертой части рассматриваются возможные причины различия спектров поглощения гема a_3^{2+} в ЦО aa_3 и ba_3 , а также возможная корреляция спектра гема a_3^{2+} с состоянием биядерного центра. В заключительной части обсуждаются ограничения разработанной модели КД ЦО и оценивается потенциальное влияние не учтенных в ней факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были исследованы индивидуальные спектральные характеристики гемов a и a_3 цитохром c -оксидазы из сердца быка. В ходе работы определены формы индивидуальных полос восстановленных гемов a и a_3 в полосе $Sore$ и впервые экспериментально получена форма разностного спектра «восстановленный минус окисленный» гема a_3 в видимой области. Показано, что полосы $Sore$ каждого из восстановленных гемов a и a_3 состоят из двух невырожденных электронных переходов, однако полоса гема a_3 , в отличие от полосы гема a , несимметрична и включает вклад дополнительной коротковолновой полосы. Обнаружен вклад слабой полосы поглощения «видимой» Su_A в области 470-580 нм. Показано также, что связывание Ca^{2+} замедляет перенос электронов через гем a . Важным достижением работы является теоретическая модель, объясняющая спектры КД ЦО на основе трёхмерной структуры фермента.

Продолжением данной работы могли бы служить детальные исследования происхождения коротковолнового плеча полосы $Sore$ гема a_3^{2+} , экспериментальное определение факторов, приводящих к расщеплению полосы $Sore$ гемов a и a_3 , а также более детальные расчеты спектров КД цитохром c -оксидазы.

ВЫВОДЫ

1. С помощью нескольких независимых подходов: селективного сдвига спектра поглощения гема a под действием кальция, избирательного фотовыцветания гемов и разделения фаз восстановления гемов a и a_3 методами быстрой кинетики, — определены индивидуальные вклады гемов a и a_3 в полосу $Soret$ восстановленной цитохром c -оксидазы. Найденные разными методами формы спектров согласуются между собой, но противоречат канонической точке зрения, основанной на «классической» работе Ваннесте (Vanneste, Biochemistry, 1966).

2. Спектр гема a^{2+} в области $Soret$ имеет форму симметричного пика с максимумом 446 нм, представляющего собой огибающую двух близких по величине индивидуальных полос с центрами при 441-442 нм и 450-451 нм и шириной 12-13 нм, которым в видимой области соответствуют полосы при 595 и 606 нм. Полосы могут быть интерпретированы как электронные $V_{00x,y}$ -переходы.

3. Спектр гема a_3^{2+} в области $Soret$ имеет форму асимметричного пика с максимумом ~ 444 нм с коротковолновым плечом при ~ 425 нм, отсутствующим в спектре гема a^{2+} . Основной пик при 444 нм представляет собой огибающую двух полос разной интенсивности с максимумами при 446 нм и 436 нм и шириной 14 нм, которые могут быть интерпретированы как электронные $V_{00x,y}$ -переходы в порфириновом кольце; широкое плечо около 425 нм может представлять вибронные спутники V_{00} -переходов.

4. Прямо определен разностный спектр поглощения гема a_3 в видимой области, и показано, что форма его зависит от состояния, — активированного или покоящегося, — биядерного центра.

5. Изменения поглощения в видимой области, сопряженные с восстановлением гема a , содержат вклад одновременного восстановления «видимой меди» Cu_A .

6. Спектральный сдвиг гема *a*, вызываемый присоединением ионов Ca^{2+} в особом центре связывания катионов цитохром *c*-оксидазы, сопровождается замедлением переноса электронов через этот редокс-центр.

7. Разработана модель, позволяющая рассчитать спектр кругового дихроизма гемов цитохром *c*-оксидазы в окисленном и восстановленном состоянии на основании спектров поглощения и трехмерной структуры фермента. Происхождение сигнала кругового дихроизма цитохром *c*-оксидазы объясняется диполь-дипольным взаимодействием гемов между собой и с окружающими ароматическими аминокислотными остатками.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит Татьяну Владимировну Выгодину за помощь в получении препаратов ЦО и проведении экспериментов, Александра Миграновича Арутюняна за профессиональную помощь в вопросах спектроскопии КД, д-ра Тофика Сулимана за предоставление препарата ЦО *ba₃* и Наталью Вадимовну Ацаркину за участие в ряде экспериментов, плодотворное обсуждение работы и ценные замечания. Автор с глубокой благодарностью вспоминает ныне покойного Юрия Алексеевича Шаронова, познакомившего автора с программированием в MATLAB и внесшего большой вклад в разработку модели КД ЦО. Кроме того, автор выражает особую признательность д-ру Мартену Восу за возможность выполнить эксперименты по фемтосекундной спектроскопии в его лаборатории в Политехнической Школе, Палезо, Франция.

Наконец, автор глубоко признателен своему научному руководителю Александру Александровичу Константинову за всестороннюю поддержку при выполнении работы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Dyuba A.V., Vygodina T.V., Azarkina N.V., Konstantinov A.A. Calcium ions inhibit reduction of heme *a* in bovine cytochrome *c* oxidase. // FEBS Lett., 2015. Vol. 589, № 24. P. 3853–3858.

2. Kudryavtsev K.V., Ivantcova P.M., Muhle-Goll C., Churakov A.V., Sokolov M.N., Dyuba A.V., Arutyunyan A.M., Howard J.A.K., Yu Ch.-Ch., Guh J.-H., Zefirov N.S., Braese S. Menthols as Chiral Auxiliaries for Asymmetric Cycloadditive Oligomerization: Syntheses and Studies of β -Proline Hexamers. // Org. Lett., 2015. Vol. 17, № 24. P. 6178–6181.

3. Дюба А.В., Выгодина Т.В., Константинов А.А. Реконструкция абсолютного спектра поглощения восстановленного гема // Биохимия. 2013. Том 78, № 12. С. 1715–1723.

4. Выгодина Т.В., Дюба А.В., Константинов А.А. Влияние ионов кальция на перенос электронов между гемами *a* и *a*₃ в цитохром *c*-оксидазе // Биохимия. 2012. Том 77, № 8. С. 1095–1104.

5. Dyuba A.V., Arutyunyan A.M., Vygodina T.V., Azarkina N.V., Kalinovich A.V., Sharonov Yu.A., Konstantinov A.A. Circular dichroism spectra of cytochrome *c* oxidase. // Metallomics. 2011. Vol. 3, № 4. P. 417–432.

Тезисы и сборники трудов конференций:

1. Dyuba A.V., Vygodina T.V., Azarkina N.V., Soulimane T., Vos M.H., Konstantinov A.A. Individual absolute absorption spectra of cytochrome *c* oxidase hemes *a*²⁺ and *a*₃²⁺ resolved by femtosecond pump-probe spectroscopy. // Proceeding of the 79th Harden Conference: Oxygen Evolution and Reduction - Common Principles. 2016. P. 16.

2. Zalevsky A.O., Dyuba A.V., Golovin A.V. Unraveling CD spectra of G-quadruplexes // Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology MCCMB'15. 2015. P. 145.

3. Dyuba A.V., Zalevsky A.O., Golovin A.V. Calculated circular dichroism spectra of homo- and heteropolar G-quadruplexes // Proceedings of ИТП RAS Conference & School "Information Technology and Systems 2015." 2015. P. 127–129.

4. Залевский А.О., Захаров М.П., Дюба А.В., Головин А.В. Экспресс-анализ сложных топологий нуклеиновых кислот методом спектроскопии кругового дихроизма // Материалы 38-й конференции "Информационные технологии и системы (ИТиС'14)." 2014. С. 29–30.

5. Dyuba A.V., Vygodina T.V., Arutyunyan A.M., Konstantinov A.A. Revisiting

individual absorption spectra of reduced hemes a and a_3 in bovine-heart cytochrome c oxidase // Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 2014. Vol. 1837, Supp. P. e97–e98.

6. Dyuba A.V., Arutyunyan A.M., Vygodina T.V., Konstantinov A.A. Modeling the circular dichroism and absorption spectra of complexes F_I and F_{II} of cytochrome c oxidase // Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 2012. Vol. 1817. P. S107.

7. Dyuba A.V., Vygodina T.V., Azarkina N.V., Arutyunyan A.M., Sharonov Yu.A., Kalinovich A.V., Konstantinov A.A. Circular dichroism of cytochrome c oxidase: Modeling spectra using classical polarizability theory // Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 2010. Vol. 1797. P. 94–95.

8. Дюба А.В. Спектры кругового дихроизма цитохром c -оксидазы и их интерпретация на основе классической теории оптической активности // «Ломоносов – 2010. Секция «Биология». Тезисы докладов. 2010. С. 21.

9. Дюба А.В. Применение классической теории оптической активности к моделированию спектров поглощения и кругового дихроизма цитохром c - оксидазы // Математика. Компьютер. Образование. Тезисы Конференции. Выпуск 17. 2010.

10. Дюба А.В., Красильников П.М., Шаронов Ю.А. Моделирование спектров кругового дихроизма цитохром c -оксидазы с позиций классической теории поляризуемости // Математика. Компьютер. Образование. Сборник научных трудов. 2009. С. 123.

11. Дюба А.В., Красильников П.М., Шаронов Ю.А. Интерпретация и моделирование спектров кругового дихроизма цитохром c -оксидазы // Математика. Компьютер. Образование. Тезисы конференции. Выпуск 16. 2009.

12. Дюба А.В., Красильников П.М. Расчет электронных спектров фрагментов гемов a и a_3 цитохром c -оксидазы // Математика. Компьютер. Образование. Сборник научных трудов. Выпуск 15. 2008. С. 8.

13. Дюба А.В. Теоретическое исследование спектров кругового дихроизма цитохром c -оксидазы // Математика. Компьютер. Образование. Тезисы конференции. Выпуск 15. 2008. С. 166.

