

Изучение взаимодействия мутантных вариантов цитохрома *c*

с окислительно-восстановительными партнёрами

Острове́рхова Т.В., Пепелина Т.Ю., Черткова Р.В.

Студент, аспирант, сотрудник

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
Институт биоорганической химии имени М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН,
Москва, Россия
tato-tato@ya.ru*

Наряду с функцией переноса электрона в дыхательной цепи цитохром *c* проявляет антиоксидантную активность в отношении активных форм кислорода (АФК). Целью данной работы являлось создание мутантных вариантов цитохрома *c*, лишенных дыхательной функции, но сохранивших антиоксидантную. Мутантный вариант цитохрома *c*, неспособный к переносу электрона от убихинон-цитохром *c* оксидо-редуктазы (комплекс III) на цитохром *c* – оксидазу (комплекс IV), является потенциальной основой для создания тест-систем, определяющих АФК.

Ранее нами были предложены два варианта цитохрома *c*, несущих двойную мутацию: 1) K86W/K87C и 2) K86E/K87E. Введение данных мутаций в ген цитохрома *c* в составе экспрессионного плазмидного вектора pBPCYC1 осуществлялся методом сайт-направленного мутагенеза с использованием QuikChange™ Mutagenesis Kit (Stratagene, США). Векторная система pBPCYC1, разработанная Pollock et al, 1998 и модифицированная нами, позволяет проводить ко-экспрессию гена цитохрома *c* с геном дрожжевой гем-лиазы. Препаративную экспрессию мутантных вариантов проводили в клетках *E.coli* штамма JM 109 при 37°C в питательной среде SB в течение 24 часов. Выделение белка из супернатанта, полученного в результате разрушения клеток на установке «French Press» и центрифугирования, осуществляли согласно модифицированной двухстадийной схеме, разработанной ранее Abdullaev et al, 2002. На первом этапе проводили катионообменную хроматографию на сорбенте Mono S. В ходе хроматографии были отмечены изменения свойств мутантного варианта цитохрома *c* с заменами K86E/K87E. Уменьшение суммарного положительного заряда белка привело к тому, что этот белок слабо связывался с анионными группами сорбента. Дальнейшую очистку белка проводили с помощью адсорбционной хроматографии (гидроксиапатит). Наиболее чистые фракции объединяли, трижды диализовали против 10 мМ NH₄HCO₃ и лиофилизировали.

Окислительно-восстановительные свойства полученных мутантов исследовались на препаратах митопластов, полученных из печени крысы. Сукцинат цитохром *c* - редуктазную активность измеряли с помощью спектрофотометрического метода при 550 нм. Константа Михаэлиса (K_M) для K86W/K87C уменьшилась в 10 раз, что указывает на повышение сродства комплекса III к мутантной форме; при этом каталитическая активность комплекса III снизилась в 2,6 раза. K_M для K86E/K87E увеличилась в 10 раз, что указывает на ухудшение сродства комплекса III к мутантной форме; при этом каталитическая активность комплекса III не изменилась. Цитохром *c* – оксидазная активность измерялась полярографическим методом. Было показано, что K_M для K86W/K87C и активность комплекса IV не изменились, в то время как K_M для K86E/K87E увеличилась в 10 раз, что указывает на ухудшение сродства комплекса IV к этим мутантным формам; при этом каталитическая активность комплекса IV снизилась в 2,5 раза. Таким образом, изменение заряда на противоположный в 86 и 87 положениях цитохрома *c* привело к ухудшению сродства комплексов III и IV к полученному мутанту.

В настоящее время осуществляется работа по введению в ген мутантного варианта K86E/K87E дополнительных мутаций, направленных на максимальное выключение сайтов связывания с комплексами III и IV.