

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Семенова Марина Андреевна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО БЕЛКА НЕЙРОГЛОБИНА С ЦИТОХРОМОМ C**

Специальность – 1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в лаборатории инженерии белка отдела биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент

Черткова Рита Валерьевна

Официальные оппоненты:

Топунов Алексей Федорович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Горин Дмитрий Александрович, доктор химических наук, профессор по специальности биофизика, профессор Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологии»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук (Институт белка РАН)

Защита состоится «14» октября 2026 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117437, г. Москва, вн.тер. г муниципальный округ Коньково, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
д.ф.-м.н. В.А. Олейников**



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

На настоящий момент известно множество заболеваний, этиология которых неразрывно связана с нарушениями регуляции апоптотических процессов, что приводит к клеточной гибели. К таким патологиям относятся ишемии и гипоксии различного генеза, некоторые нейродегенеративные заболевания (болезни Альцгеймера и Гентингтона), инсульт, травмы спинного мозга, дегенерация сетчатки и др. Следует отметить, что большая часть упомянутых выше патологических состояний занимает лидирующие позиции среди основных причин смертности населения по данным Всемирной организации здравоохранения. Очевидна необходимость изучения естественных молекулярных механизмов цитопротекции, в частности, нейропротекции, для последующей разработки терапевтических препаратов на основе молекул, обладающих защитными свойствами.

Нейроглобин (Ngb) – небольшой гемсодержащий белок из семейства глобинов, преимущественно локализованный в нейрональных клетках. Ngb обладает нейропротекторной функцией, которая, согласно одной из гипотез, реализуется при его взаимодействии с цитохромом *c* (Cyt *c*), транслоцирующимся из митохондрий в цитоплазму во время инициации программируемой гибели клеток – апоптоза. По всей видимости, Ngb способен регулировать Cyt *c*-зависимый путь апоптоза и предотвращать запуск каспазного каскада, блокируя апоптоз нейронов. Следовательно, Ngb является перспективным объектом изучения, как с фундаментальной, так и с практической точки зрения – в качестве потенциальной основы препаратов для терапии широкого спектра заболеваний, ассоциированных с клеточной гибелью. Однако разработка подходов к рациональному дизайну терапевтических препаратов невозможна без детального понимания механизмов антиапоптотического действия Ngb, которые на настоящий момент изучены слабо. Диссертационная работа направлена на исследование молекулярных механизмов взаимодействия Ngb с Cyt *c*, лежащего в основе нейропротекторного действия Ngb. Помимо очевидной фундаментальной значимости расширения знаний о механизмах функционирования гемсодержащих белков, строения и свойствах их белок-белковых комплексов, данное исследование позволит в дальнейшем активно использовать Ngb в разработке новых научно-технологических подходов в биомедицине. Таким образом, исследование механизмов нейропротекции Ngb, реализующихся за счет взаимодействия с Cyt *c*, является очень актуальным.

Цель исследования и задачи

Целью работы является исследование молекулярного механизма взаимодействия нейропротекторного белка Ngb с Cyt *c* с применением методов спектроскопии комбинационного рассеяния.

В соответствии с целью работы были сформулированы следующие **задачи**:

1. Разработать схему экспрессии, выделения и очистки рекомбинантного Ngb человека в виде водорастворимой холоформы в бактериальной системе продукции.
2. Исследовать конформационные изменения гемовых групп Ngb и Cyt *c* как в изолированном виде, так и в составе предполагаемого комплекса методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и гигантского КР (ГКР).

3. Получить панели мутантных форм Ngb и Cyt c с заменами в предполагаемом интерфейсе их связывания и исследовать влияние данных замен на взаимодействие Ngb и Cyt c методами КР-спектроскопии.

Научная новизна

В рамках работы впервые предложено использовать метод спектроскопии КР для исследования молекулярного механизма взаимодействия нейропротекторного белка Ngb с Cyt c. На основе данного метода была разработана новая методика, благодаря которой получены принципиально новые данные о конформационных изменениях гемовых групп и их белкового микроокружения, происходящих при переносе электрона от Ngb к Cyt c. Были сконструированы и получены панели мутантных форм Ngb и Cyt c с аминокислотными заменами в предполагаемом интерфейсе их взаимодействия. Выявлено нарушение окислительно-восстановительной (редокс-) реакции между изучаемыми белками при внесении мутаций E60K в Ngb и K25E, T78S/K79P и K8E/K27E/K72E/K86E/K87E в Cyt c. На основании полученных данных предложен вероятный молекулярный механизм взаимодействия Ngb с Cyt c, состоящий из четырех стадий.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость данного исследования состоит в расширении знаний о свойствах и функциях гемсодержащих белков, в частности, Ngb и Cyt c. Показана значимость конформационных изменений гемовых групп, происходящих при переносе электрона между гемсодержащими белками. Результаты работы демонстрируют непосредственное влияние точечных аминокислотных замен на эффективность белковых редокс-взаимодействий.

Практическая значимость заключается в том, что разработанные методики получения рекомбинантных форм Ngb и изучения редокс-взаимодействия Ngb и Cyt c могут быть использованы в дальнейших исследованиях функциональной активности как Ngb, так и других гемсодержащих белков. Более того, понимание механизмов нейропротекторного действия Ngb обладает существенным потенциалом практического применения в качестве основы для рационального дизайна биомедицинских препаратов с помощью методов белковой инженерии. Подобные препараты будут чрезвычайно востребованы в качестве терапевтических средств патологических состояний – нейродегенеративных заболеваний, инсультов, ишемий и гипоксий различного генеза. Результаты данного исследования могут открыть новые перспективы и в других активно развивающихся областях применения гемсодержащих редокс-белков, например, для создания детекторов и сенсорных систем, а также в биомолекулярной электронике.

Личный вклад автора

Личный вклад Семеновой М.А. заключается в планировании и выполнении экспериментальной части работы с использованием методов молекулярной биологии, биохимии, белковой биоинженерии, а также ряда физико-химических методов, анализе литературных и экспериментальных данных. Автор принимал непосредственное участие в разработке методик, написании публикаций и представлении полученных результатов на международных и всероссийских конференциях.

Основные положения, выносимые на защиту

- Показано, что между окисленным Cyt c и восстановленным Ngb происходит специфическая реакция переноса электрона, сопровождающаяся смещением гема Cyt c

в гемовой впадине, изменением его конформации со скрученной на плоскую, а также повышением подвижности пирролов и метильных радикалов.

- Предложен постадийный молекулярный механизм взаимодействия нейропротекторного белка Ngb с Cyt *c*: I. сближение белковых молекул преимущественно за счет электростатических взаимодействий и формирование реакционного комплекса; II. Переход гемов в конформации, способствующие переносу электрона; III. Перенос электрона от гема Ngb на гем Cyt *c*; IV. Диссоциация реакционного комплекса.

Апробация результатов исследования

По материалам диссертационной работы было опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах, а также 7 тезисов конференций.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 174 источника. Работа изложена на 119 страницах и содержит 46 рисунков и 12 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

На момент выполнения диссертации исследования взаимодействия Ngb с Cyt *c* являются единичными и несколько противоречивыми, что обусловлено рядом методологических и технических сложностей. При этом очевидна актуальность и научная значимость исследования механизмов нейропротекторной функции Ngb с использованием альтернативных методов и подходов. В данной работе впервые применены методы спектроскопии резонансного КР для изучения конформационных и редокс-перестроек гемовых групп Ngb и Cyt *c* при их белок-белковом взаимодействии. Более того, было исследовано влияние точечных мутаций на формирование предполагаемого комплекса Ngb-Cyt *c*.

1. Разработка схемы биосинтеза в бактериальной системе, выделения и очистки рекомбинантного Ngb человека

Исследование молекулярного механизма взаимодействия гемсодержащих белков Ngb и Cyt *c* подразумевает наличие очищенных белковых препаратов с известными физико-химическими свойствами в достаточных количествах. Поэтому на первом этапе была поставлена задача разработать и оптимизировать систему биосинтеза (в *E. coli*), выделения и очистки рекомбинантного Ngb. Важно подчеркнуть, что данный этап работы является основой для получения как Ngb WT, так и его мутантных форм. Эффективная система продукции рекомбинантного Cyt *c* и его мутантных форм была разработана ранее в лаборатории инженерии белка (ГНЦ ИБХ РАН), в которой выполнена настоящая диссертационная работа. Данная система продукции основана на экспрессионном векторе pVP(CYC1/CYC3), в котором ген Cyt *c* коэкспрессируется с геном холоцитохром *c*-синтазы, что позволяет нарабатывать гемсодержащую холоформу белка в *E. coli*.

Штамм *E. coli* SHuffle T7 выбран для экспрессии гена Ngb человека (в составе плазмидного вектора pET-17b-Ngb) с целью получения белка с дисульфидной связью Cys46-Cys55 и повышения эффективности правильного сворачивания Ngb. Системы продукции Ngb, описанные в литературе, основаны на использовании стандартных

штаммов *E. coli* серии BL21(DE3), не продуцирующих, в отличие от SHuffle T7, ферментов, способствующих замыканию дисульфидных связей. Стоит отметить, что, как правило, исследователи предпочитали работать с формами Ngb без дисульфидной связи Cys46-Cys55. Однако для исследований белок-белковых взаимодействий было решено получить Ngb с корректно замкнутой дисульфидной связью Cys46-Cys55, модулирующей его функциональную активность, а также опосредовано влияющей на селективность встраивания гемовой группы (каноническая/обратная ориентации) в молекулу Ngb в ходе сворачивания белка.

Культивирование клеток штамма-продуцента при 28°C в течение 24 ч в питательной среде ТВ в отсутствие индуктора экспрессии обеспечило высокий уровень наработки водорастворимой холоформы Ngb (рис. 1, а, дорожка 2 и б, врезка).

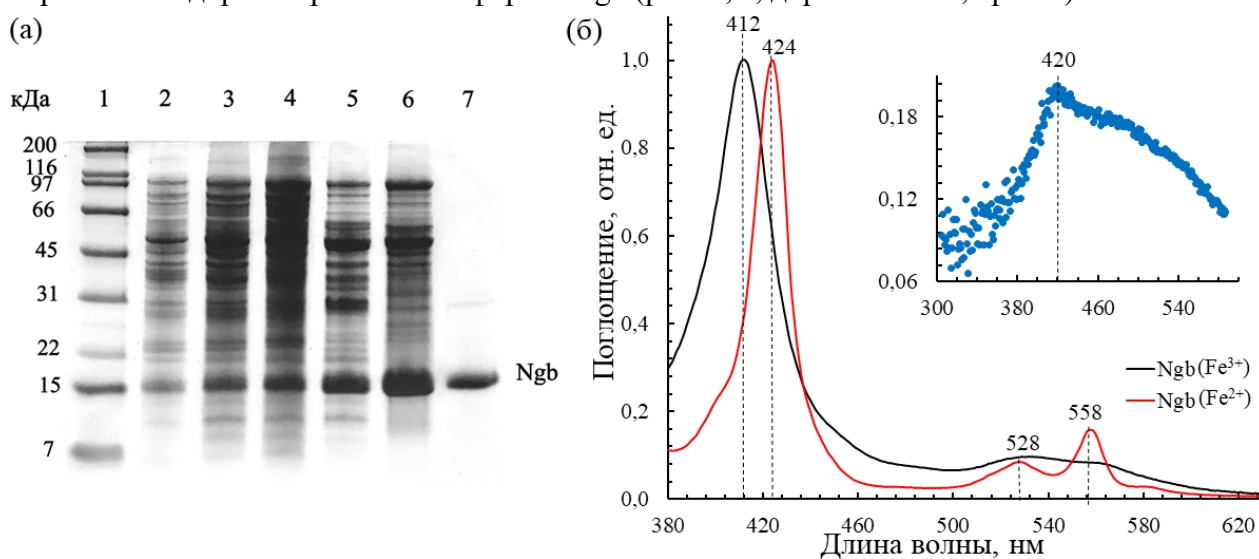


Рис. 1. (а) Электрофоретический анализ в 12%-ном SDS-ПААГ:1 – стандарт молекулярных масс 7–200 кДа (Bio-Rad, США); суммарный белок: 2 – клеток штамма-продуцента Ngb; 3 – клеточного лизата; 4 – осадка после высаливания; 5 – фракций с Ngb после анионообменной хроматографии; 6 – фракций с Ngb после концентрирования; 7 – очищенный препарат Ngb после гель-фильтрации. (б) Спектры поглощения в УФ-видимой области окисленной и восстановленной форм рекомбинантного Ngb. На врезке – разностный спектр поглощения штамма-продуцента Ngb и нетрансформированного штамма (*E. coli*).

Схема выделения и очистки водорастворимой холоформы Ngb состоит из стадий гомогенизации биомассы клеток штамма-продуцента с последующим центрифугированием (рис. 1, а, дорожка 3), высаливания Ngb из клеточного лизата сульфатом аммония до 60%-ного насыщения (рис. 1, а, дорожка 4), анионообменной хроматографии на колонке с сорбентом MP HQ (рис. 1, а, дорожка 5), концентрирования Ngb высаливанием (рис. 1, а, дорожка б), гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-75 (рис. 1, а, дорожка 7). Разработанная система позволяет получать до 20 мг итогового препарата Ngb с 1 л культуры штамма-продуцента, что в 2,5 раз больше, либо сопоставимо с выходами Ngb в предложенных ранее системах. Степень очистки и гомогенность препаратов Ngb оценивали с помощью гель-электрофоретического анализа (рис. 1, а, дорожка 7) и спектрофотометрически в УФ-видимой области (рис. 1, б). Спектры поглощения Ngb отличались характерной формой с интенсивным пиком в области Соре (рис. 1, б), что подтверждает наличие гема в структуре белка.

Таким образом, была разработана эффективная система продукции водорастворимой холоформы рекомбинантного Ngb человека, с помощью которой были получены препаративные количества Ngb, необходимые для проведения всех экспериментов, описанных в данной работе.

2. Исследование физико-химических свойств рекомбинантного Ngb человека

Дальнейшее исследование функциональной активности Ngb подразумевает соответствие свойств полученного препарата Ngb нативным. Поэтому было проведено изучение рекомбинантного Ngb с помощью ряда физико-химических методов.

Спектры КД регистрировали совместно с н.с. Игнатовой А.А. в лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул (ГНЦ ИБХ РАН). КД-спектры Ngb в дальней УФ-области соответствуют спектрам преимущественно α -спирального белка (рис. 2, а). Существенной зависимости характера спектров КД от концентрации белка выявлено не было (рис. 2, а), а рассчитанные на основе спектров составы вторичной структуры имели близкие значения (табл.). В литературе описано уменьшение количества α -спиралей более чем в два раза в зависимости от концентрации Ngb, что связывали с накоплением димеров Ngb. Отсутствие этого эффекта в полученных образцах свидетельствует о преимущественно мономерном состоянии молекул Ngb. Вторичная структура Ngb в присутствии восстановителя дисульфидных связей ТСЕР (табл.) отличалась небольшим повышением содержания неупорядоченной структуры и β -поворота с одновременным снижением содержания α -спиралей. Замыкание дисульфидной связи Cys46–Cys55 приводит к реорганизации CD-петли из β -поворота и неупорядоченной структуры в α -спираль, следовательно, полученные данные косвенно свидетельствуют о наличии дисульфидной связи в Ngb.

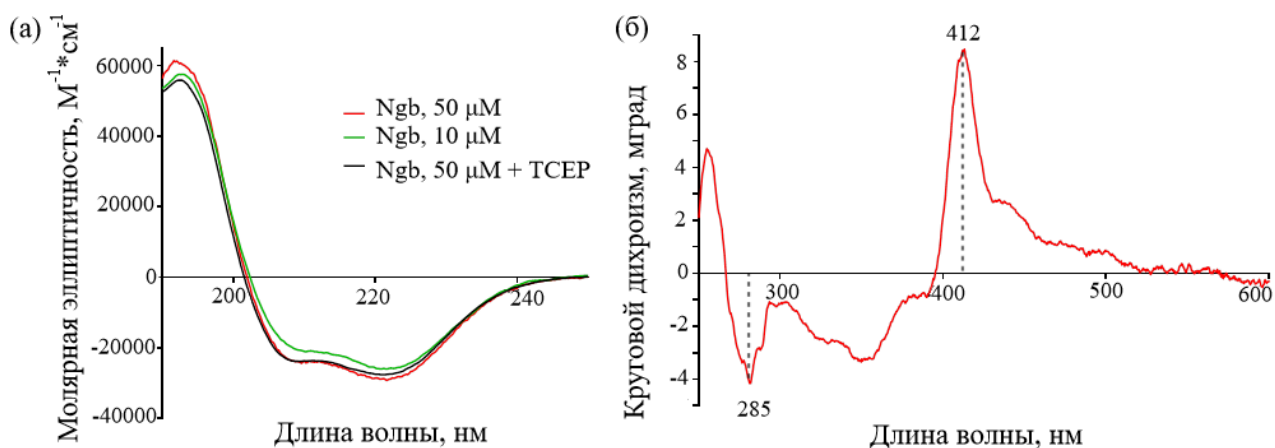


Рис. 2. Спектры КД рекомбинантного Ngb: (а) в дальней УФ-области; (б) в ближней УФ-видимой области.

Таблица. Анализ вторичной структуры рекомбинантного Ngb.

Образец	α -спираль, %	β -слой, %	β -поворот, %	Неупорядоченная структура, %	NRMSD
Ngb (50 μ M)	72,8	2,2	8,0	17,1	0,02
Ngb (10 μ M)	70,3	3,6	8,9	17,2	0,01
Ngb (50 μ M) + ТСЕР	69,1	2,6	9,1	19,2	0,01

На спектре КД в ближней УФ-видимой области (рис. 2, б) пик с максимумом при 285 нм имеет отрицательное значение, а значит Ngb не связан с внешними лигандами. Пик с максимумом при 412 нм имеет положительное значение, что свидетельствует о преобладании молекул Ngb с канонической ориентацией гема.

Таким образом, полученные данные соответствуют известным для кристаллической структуры Ngb человека особенностям, а также косвенно свидетельствуют о наличии дисульфидной связи Cys46–Cys55 в Ngb.

Одномерный ^1H - и двумерный $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектры ЯМР (рис. 3) зарегистрированы д.ф.-м.н., г.н.с. Бочаровым Э.В. в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии (ГНЦ ИБХ РАН). Характерная дисперсия ЯМР-сигналов соответствует гемсодержащему α -спиральному белку, который свернут предположительно в нативную конформацию.

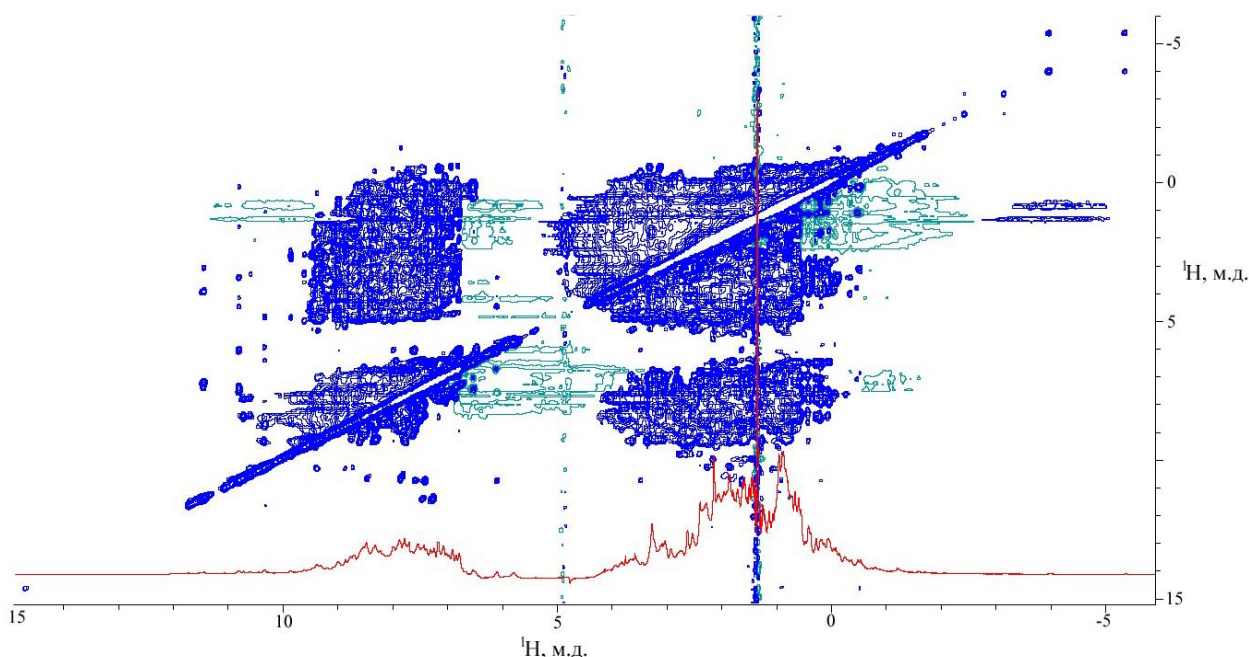


Рис. 3. Одномерный ^1H - и двумерный $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектры рекомбинантного Ngb.

Эксперименты с использованием **методов масс-спектропии** проведены к.х.н., с.н.с. Зиганшиным Р.Х., в группе масс-спектропии (ГНЦ ИБХ РАН). В нативном Ngb человека два а.о. Cys55 и Cys46 образуют дисульфидную связь, тогда как образование дисульфидных связей с участием третьего а.о. Cys120 считается стерически невозможным (Hamdane et al., 2004). Метод хромато-масс-спектрометрического анализа применен для подтверждения наличия Cys55–Cys46 связи в структуре рекомбинантного Ngb. С помощью трипсинолиза получены Cys-содержащие пептиды Ngb, модифицированного хлорацетамидом (в отсутствие или в присутствии TCEP). В отсутствие TCEP содержание пептида Cys120–Arg130 на 1-2 порядка выше содержания пептидов: Gln48–Cys55–Arg66 и Gln48–Cys55–Lys67, что свидетельствует об участии Cys55 в образовании дисульфидных связей. В присутствии TCEP дисульфидные связи восстанавливаются и Cys55 становится свободным: содержание пептидов Cys120–Arg130 ниже на 1-2 порядка по сравнению с содержанием пептидов Gln48–Cys55–Arg66 и Gln48–Cys55–Lys67.

Таким образом, были исследованы физико-химические свойства рекомбинантного Ngb человека, подтверждены вторичная структура с преобладанием α -спиралей, наличие гема и корректно замкнутой дисульфидной связи в составе белковых молекул. Более того, полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанная система продукции

Ngb позволяет сократить количество димеров Ngb, по сравнению с системами, предложенными ранее. Следовательно, наработанный рекомбинантный Ngb подходит для исследования его функциональной активности при взаимодействии с Cyt *c*.

3. Молекулярный механизм взаимодействия нейроглобина с цитохромом *c*

Спектроскопия резонансного КР ранее не применялась для изучения взаимодействия Ngb с Cyt *c*. Однако данный метод можно по праву считать одним из наиболее перспективных для выяснения деталей молекулярных механизмов взаимодействия Ngb с Cyt *c*, в ходе которого происходит перенос электрона с гема Ngb на гем Cyt *c*. Использование лазера с длиной волны возбуждения при 532 нм позволяет получать резонансные КР-спектры с хорошо разрешенными характеристическими пиками гемовых групп. Важно подчеркнуть, что гемы Ngb и Cyt *c* относятся к разным типам - *b* и *c*, поэтому их КР-спектры имеют пики, которые позволяют различать сигнал от гема каждого из белков при регистрации их совместного спектра. Одним из преимуществ метода является возможность использовать небольшие количества белка для исследований – достаточно 15-30 мкл раствора белка с концентрацией 0,25-1 мМ. Следует, однако, отметить, что метод КР-спектроскопии позволяет получить качественные либо полуколичественные данные, тогда как рассчитать количественные характеристики белок-белковых взаимодействий – константы скорости реакции и диссоциации комплекса – не представляется возможным. Тем не менее, определенные КР-пики гемовых групп претерпевают изменения в зависимости от редокс-состояния гемового железа. Анализ этих изменений позволит не только зарегистрировать перенос электрона как таковой, но также получить уникальные данные о конформационных изменениях гемовых групп и их белкового микроокружения, происходящих во время редокс-взаимодействия Ngb и Cyt *c*.

Все эксперименты с использованием методов КР и ГКР спектроскопии проводили совместно с к.б.н., м.н.с. Бочковой Ж.В. и к.б.н., в.н.с. Браже Н.А. в лаборатории биофизики клетки кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

3.1. Характеристические особенности спектров КР и ГКР Ngb и Cyt *c*

На спектрах КР и ГКР рекомбинантных Ngb и Cyt *c* выявлены характерные пики, связанные с колебаниями атомов в восстановленном и окисленном гемах (рис. 4). Гемсодержащие белки в окисленном состоянии обладают КР-сигналом низкой интенсивности, поэтому были использованы плазмонные серебряные наноструктурированные поверхности для его усиления. Часть пиков присутствует на спектрах и Ngb, и Cyt *c*, с некоторыми смещениями в положении максимума для отдельных пиков. К таким пикам относятся: 750 см⁻¹ (колебания всех связей в геме), 1127–1130 см⁻¹ (колебания метильных радикалов), 1168–1170 см⁻¹ (асимметричные колебания пиррольных колец), 1365–1375 см⁻¹ (симметричные колебания пиррольных колец), 1586 см⁻¹ и 1640 см⁻¹ (колебания метиновых мостиков). Эти пики характерны для КР-спектров гемов различных типов, т.к. соотносятся с колебаниями основных структурных элементов гемовой группы, одинаковых для гемов типа *b* и *c*. Пик симметричных колебаний пирролов является чувствительным к редокс-состоянию гемового железа, наблюдается сдвиг на 6–7 см⁻¹ в более высокочастотную область при

переходе железа из восстановленного состояния в окисленное (рис. 4). Пик с максимумом при 1640 см^{-1} также является чувствительным к редокс-состоянию гемсодержащих белков и его интенсивность существенно снижается вплоть до исчезновения на КР-спектрах восстановленных форм белков (рис. 4, а, в). Интенсивности пиков с положениями максимумов $750, 1130, 1342\text{ см}^{-1}$ для Ngb (рис. 4, а, б) и $750, 1127\text{ см}^{-1}$ для Cyt *c* увеличиваются при восстановлении белков (рис. 4, в, г). Кроме того, пики Cyt *c* в области $570\text{--}690\text{ см}^{-1}$ характерны только для его восстановленной формы (рис. 4, в). Наличие характеристических КР/ГКР-пиков для гемов разных типов определяется их небольшими структурными отличиями. Пики на спектрах Ngb с максимумами при 1306 и 1342 см^{-1} (рис. 4, а, б) присущи только гемам *b*, что позволяет отличить КР/ГКР-спектры Ngb от КР/ГКР-спектров Cyt *c*. На КР/ГКР-спектрах Cyt *c* присутствуют отличительные пики, характерные только для гема *c*: $570, 610, 648, 690\text{ см}^{-1}$ (колебания метиновых мостиков, пироллов и C-S связей в восстановленном Cyt *c*) и 1313 см^{-1} (рис. 4, в, г).

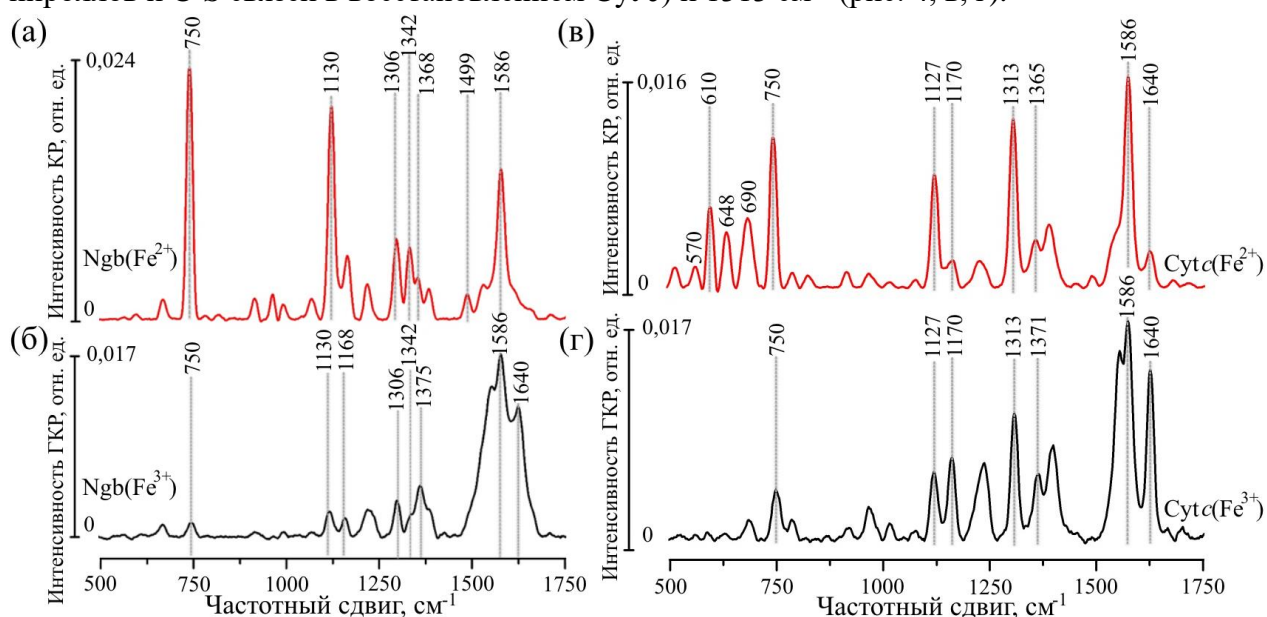


Рис. 4. Спектры КР и ГКР при лазерном возбуждении 532 нм : (а) восстановленного Ngb; (б) окисленного Ngb; (в) восстановленного Cyt *c*; (г) окисленного Cyt *c*. Спектры нормированы на суммарную интенсивность соответствующего спектра.

Таким образом, были выявлены общие и отличительные особенности КР/ГКР спектров редокс-форм Ngb и Cyt *c*. Данные спектральные особенности использованы на последующих этапах исследования для отслеживания конформационных и редокс-изменений гемовых групп при регистрации спектров от смеси Ngb и Cyt *c*.

3.2. Конформационные изменения гемовых групп и белкового микроокружения при взаимодействии Ngb и Cyt *c*

В ходе исследования редокс-взаимодействия между Ngb и Cyt *c* разработана новая методика с использованием КР-спектроскопии (рис. 5). Суть методики заключалась в регистрации двух наборов измерений – экспериментального и контрольного, после чего путем вычитания контрольного спектра из экспериментального были получены разностные КР-спектры, которые подвергались дальнейшему анализу. Данный подход позволил нивелировать технические трудности получения стабильной восстановленной формы Ngb, связанные с высокой скоростью автоокисления Ngb ($0,23\pm 0,03\text{ мин}^{-1}$, Tejero et al., 2015).

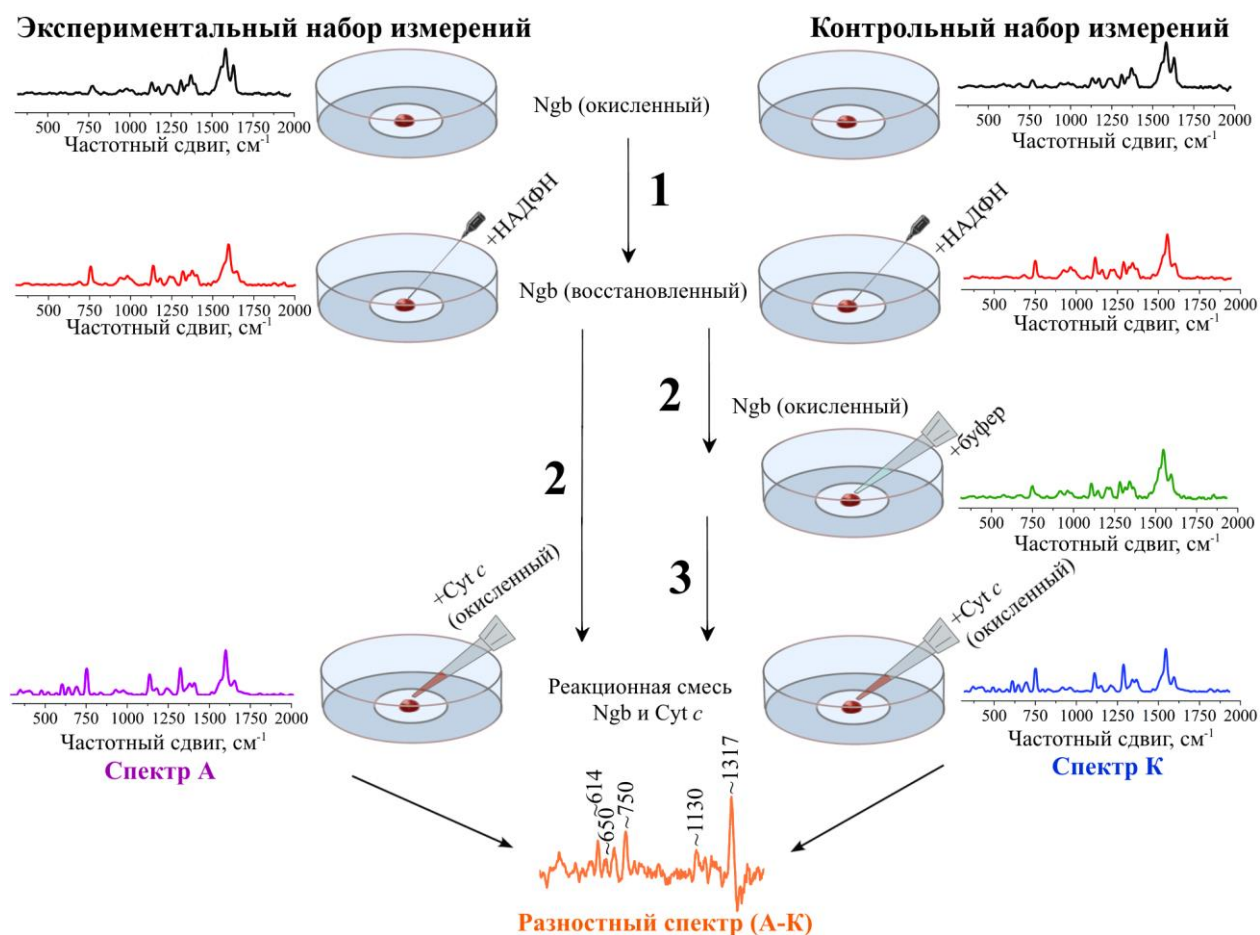


Рис. 5. Схема разработанной методики исследования редокс-реакции между Ngb и Cyt c.

Вначале были зарегистрированы КР-спектры окисленного Ngb (рис. 5, черные спектры). Далее, после добавления восстановителя НАДФН, наблюдали увеличение интенсивности пиков при 750 и 1130 см^{-1} и уменьшение интенсивности пика 1640 см^{-1} (рис. 5, красные спектры), что свидетельствует о восстановлении Ngb. При добавлении буфера к контрольному раствору происходило реокисление Ngb, которое регистрировали по обратным изменениям пиков при 750 , 1130 и 1640 см^{-1} (рис. 5, зеленый спектр). После добавления в реакционную смесь окисленного Cyt c наблюдали появление пиков в области 610 - 690 см^{-1} , характерных для его восстановленной формы, и исчезновение пика при 1342 см^{-1} , характерного для восстановленной формы Ngb (рис. 5, спектры А и К). Данные спектральные изменения свидетельствуют о том, что в реакционной смеси происходит процесс восстановления Cyt c и одновременного окисления Ngb. При этом в контрольной смеси восстановление Cyt c возможно только от остатков восстановителя, тогда как в экспериментальной смеси Cyt c может восстанавливаться также и от Ngb. Следовательно, при вычитании спектра К из спектра А получается спектр, соответствующий конформационным изменениям гемовых групп в ходе реакции переноса электрона с Ngb на Cyt c, т.е. используемый подход позволяет нивелировать возможный вклад остатков восстановителя.

Разностный КР-спектр оказался ненулевым, т.е. экспериментальный набор измерений не равен контрольному (рис. 5, 6), значит между окисленным Cyt c и восстановленным Ngb действительно происходит специфическая реакция переноса электрона. Более того, на основании спектральных особенностей полученных спектров можно судить о конформационных изменениях гема Cyt c, происходящих при данном

взаимодействии. В связи с тем, что спектры восстановленных гемов имеют более высокую интенсивность, по сравнению со спектрами окисленных гемов, спектры А и К, а также разностный спектр (А-К) характеризуется преимущественно пиками, характерными для спектра восстановленного Cyt *c*. Пик при 650 см^{-1} соответствует повышению вероятности колебаний C-S связей и свидетельствует о смещении гема в гемовой впадине. Кроме того, повышение вероятности колебаний C_б-CH₃ групп (1130 см^{-1}) и симметричных колебаний пиррольных колец ($614, 698\text{ см}^{-1}$) ассоциировано с повышением конформационной подвижности гемовой группы. Пик с максимумом при 750 см^{-1} соответствует колебаниям всех связей в геме, при этом известно, что он чувствителен к конформационным изменениям гемовых групп. Относительно высокий разностный пик при 1317 см^{-1} означает повышение вероятности колебаний метиновых мостиков, а значит и вероятности плоской конформации гема. Плоская конформация гема Cyt *c* считается более благоприятной для эффективного переноса электрона и ассоциирована с повышением редокс-потенциала Cyt *c* по сравнению со скрученной (Sun et al., 2014; Takano et al., 2020).

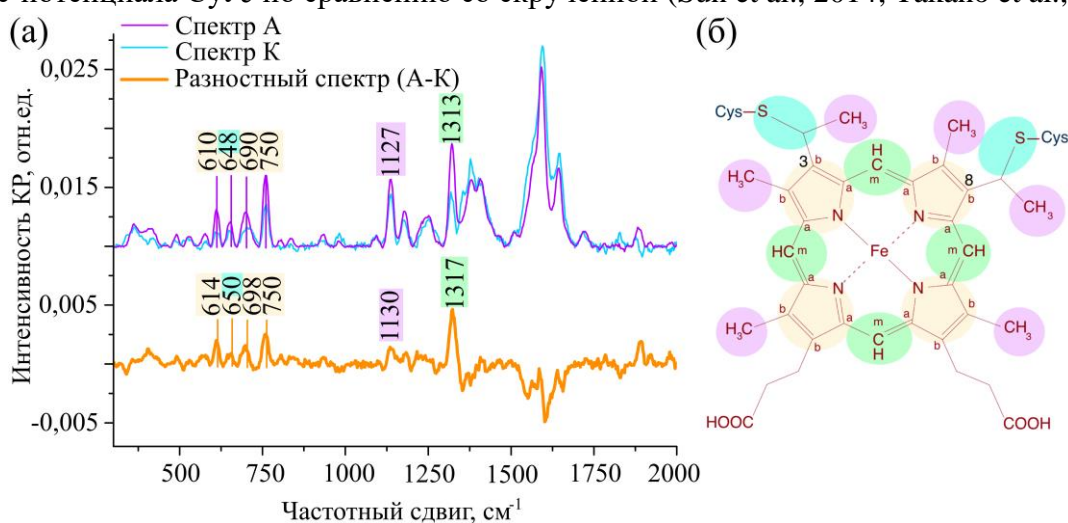


Рис. 6. (а) Наложение КР-спектров экспериментальной (спектр А) и контрольной (спектр К) смеси Ngb с Cyt *c* и итоговый разностный спектр (А-К). Спектры нормированы на суммарную интенсивность соответствующего спектра. (б) Гем *c*, цветом обозначены группы атомов, колебания которых регистрируются на спектрах (а).

Таким образом, показано, что между окисленным Cyt *c* и восстановленным Ngb происходит специфическая реакция переноса электрона, сопровождающаяся смещением гема Cyt *c* в гемовой впадине, изменением его конформации со скрученной на плоскую, а также повышением подвижности пирролов и метильных радикалов.

4. Влияние аминокислотных замен на взаимодействие Ngb и Cyt *c*

Считается, что редокс-взаимодействие Cyt *c* и Ngb происходит с образованием короткоживущего реакционного комплекса (константа диссоциации $10\text{-}45\text{ }\mu\text{M}$). Структура комплекса неизвестна, но существуют модели, полученные с помощью методов биоинформатики. В результате анализа литературных данных сконструированы панели мутантных форм Ngb (E60K, E87K, K67E, K95E, E60K/E87K) и Cyt *c* (K25E, K72E, K25E/K72E) с заменами а.о. в предполагаемом интерфейсе взаимодействия белков.

Выбранные для настоящего исследования аминокислотные замены вызывают локальное изменение заряда на противоположный и могут стать причиной нарушений электростатических взаимодействий между белками (рис. 7).

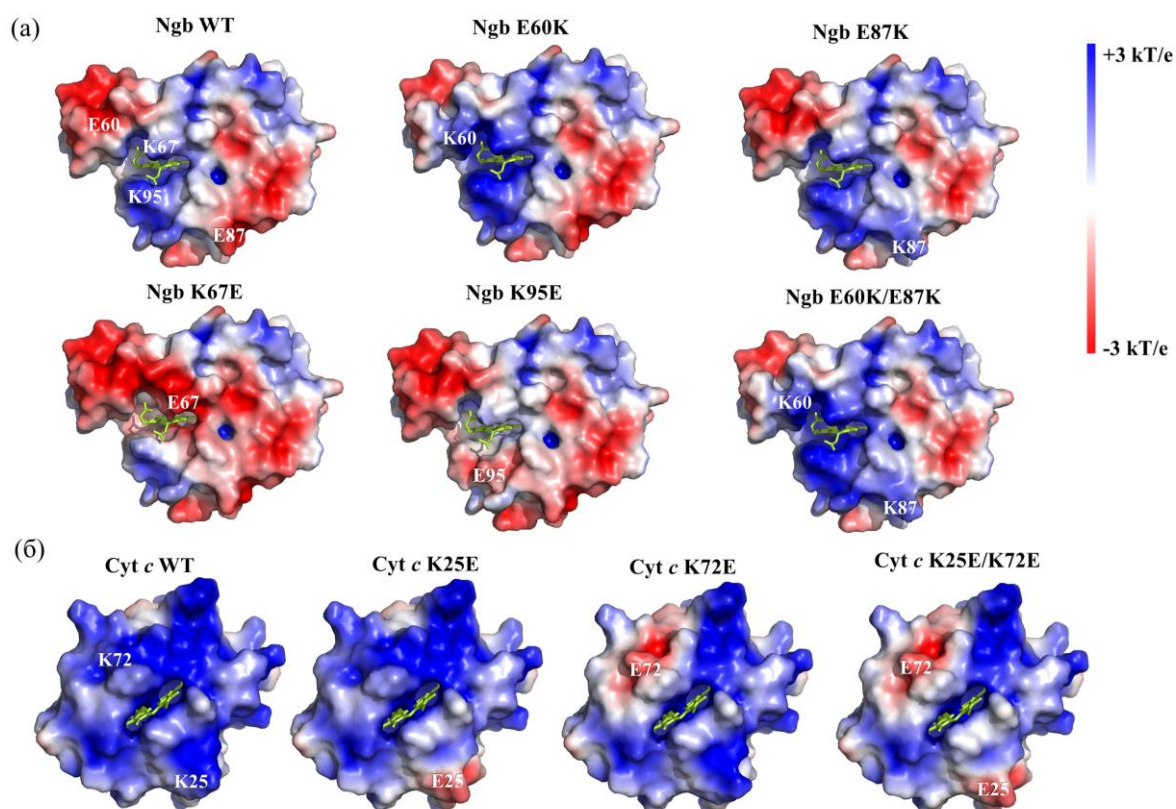


Рис. 7. Поверхности электростатических потенциалов (а) *Ngb* WT (ID PDB: 4MPM) и его мутантных форм; (б) *Cyt c* WT (ID PDB: 1HRC) и его мутантных форм. Гемы обозначены зеленым. Изображения получены в программе PyMOL, электростатические потенциалы рассчитаны с помощью программного модуля APBS и представлены в соответствии со шкалой (kT/e).

А.о. *Ngb* Glu60 предположительно образует ионную связь с Lys72 *Cyt c*, а Glu87 *Ngb* с Lys25 *Cyt c*. А.о. *Ngb* Lys67 и Lys95 предположительно образуют водородные связи, либо участвуют в гидрофобных взаимодействиях с а.о. Ile81, Ala83 и Gln16 *Cyt c*. Замены а.о. *Ngb* Lys67, Lys95 и Glu60 также интересны с точки зрения возможного влияния на конформационные характеристики гемовой группы *Ngb*, т.к. они находятся в белковом микроокружении гема (рис. 8).

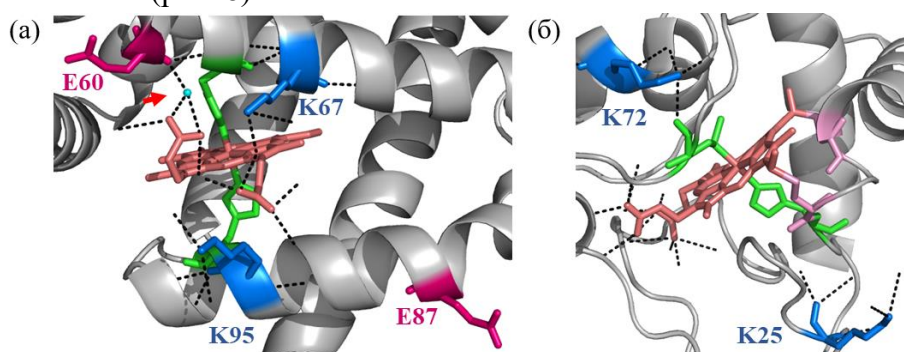


Рис. 8. Расположение мутлируемых а.о. относительно гемовых групп (а) *Ngb* (ID PDB: 4MPM) и (б) *Cyt c* (ID PDB: 1HRC). Гемы обозначены лососевым цветом. Зеленым отмечены а.о., занимающие аксиальные координационные позиции гема (His96 и His64 *Ngb*; His18 и Met80 *Cyt c*). Бледно-розовым отмечены а.о. *Cyt c* Cys14 и Cys17, ковалентно связанные с гемовой группой. Водородные связи, которые формируются мутлируемыми а.о. и гемом, представлены в виде прерывистых линий. Красная стрелка указывает на молекулу воды, через которую контактируют Glu60 и гем *Ngb*. Изображения получены в программе PyMOL.

Стоит добавить, что любые внесенные мутации могут привести к нарушению структуры и функции белков, обладающих, к тому же, высококонсервативной аминокислотной последовательностью. Поэтому все полученные в данном исследовании мутантные белки были охарактеризованы с помощью ряда физико-химических методов, в том числе, с помощью метода спектроскопии КР/ГКР.

4.1. Получение мутантных форм *Ngb* и *Cyt c* с заменами в предполагаемом интерфейсе их взаимодействия

Методом сайт-направленного мутагенеза сконструированные мутации были введены в гены, кодирующие *Ngb* и *Cyt c* и находящиеся в составе плазмидных векторов pET-17b-*Ngb* и pVP(CYC1/CYC3), соответственно. Мутантные формы белков нарабатывали и очищали с помощью систем продукции, разработанных для белков дикого типа.

На спектрах поглощения зарегистрированы сдвиги максимального положения пика в области Core на 1-3 нм для форм *Ngb* с мутациями E60K и K95E (рис. 9). На спектрах восстановленных *Ngb* E60K и E60K/E87K присутствует выраженный Q-пик с максимумом при 582 нм, который практически отсутствует на спектрах *Ngb* WT и других мутантных форм *Ngb*. Такие спектральные изменения связывают с переходом железа гема в высокоспиновое состояние. Для мутантных форм *Cyt c* спектральных отличий выявлено не было, спектры полностью повторяют таковые для *Cyt c* WT.

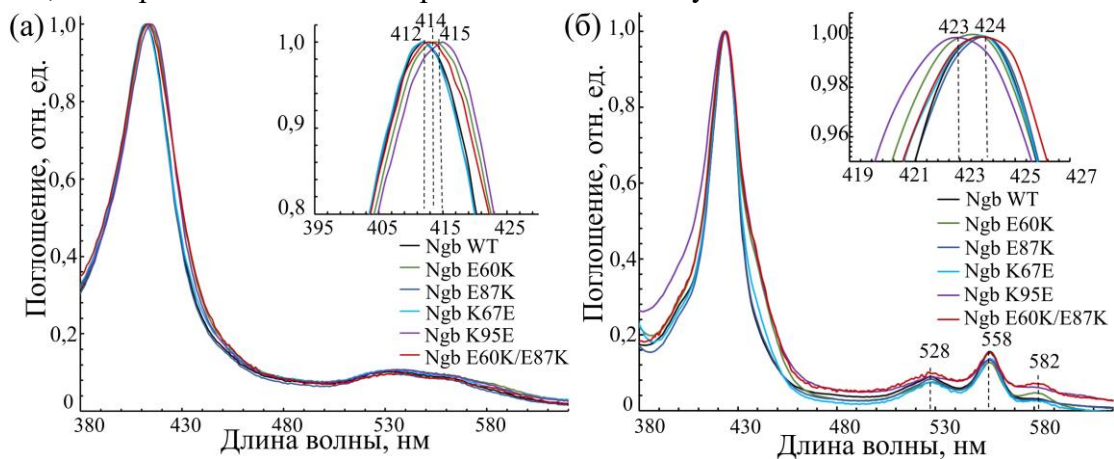


Рис. 9. Спектры поглощения *Ngb* и его мутантных форм в УФ-видимой области: (а) окисленных форм; (б) восстановленных форм.

Спектры КД форм *Ngb* регистрировали совместно с н.с. Игнатовой А.А. в лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул (ГНЦ ИБХ РАН). Существенных отличий во вторичной структуре мутантных форм *Ngb* по сравнению с *Ngb* WT выявлено не было (рис. 10, а). Следует, однако, отметить, что для *Ngb* K67E наблюдали некоторое повышение амплитуды спектра КД (рис. 10, а), а также повышение содержания α -спиралей (на 5%) с одновременным снижением содержания β -поворота (на 3,5%), что может свидетельствовать о некоторой тенденции к изменению вторичной структуры по сравнению с *Ngb* WT.

Спектры ИК регистрировали совместно с к.б.н., с.н.с. Паршиной Е.Ю. в лаборатории биофизики клетки кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Все спектры имели схожую форму и содержали пики, характерные для α -спиральных белков, при этом существенных спектральных отличий мутантных форм *Ngb* от *Ngb* WT выявлено не было (рис. 10, б). Таким образом, согласно

данным КД и ИК-спектроскопий вторичная структура мутантных форм Ngb существенно образом не отличается от таковой Ngb WT.

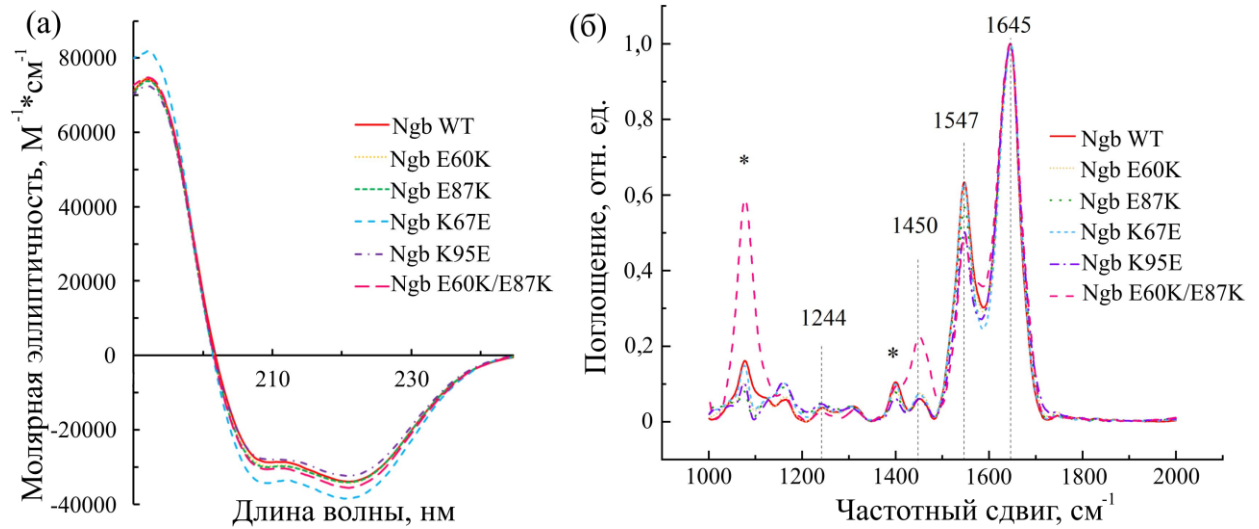


Рис. 10. (а) КД-спектры Ngb WT и его мутантных форм в дальней УФ-области; (б) ИК-спектры (спектры поглощения ATR-FTIR) Ngb WT и его мутантных форм. Звездочкой отмечены пики, соответствующие пикам в спектре буфера, которые не были удалены вычитанием из спектров белковых растворов.

Помимо описанных выше мутантных форм Cyt c, исследовано взаимодействие Ngb с мутантными формами Cyt c, сконструированными ранее в лаборатории инженерии белка (ГНЦ ИБХ РАН) (рис. 11).

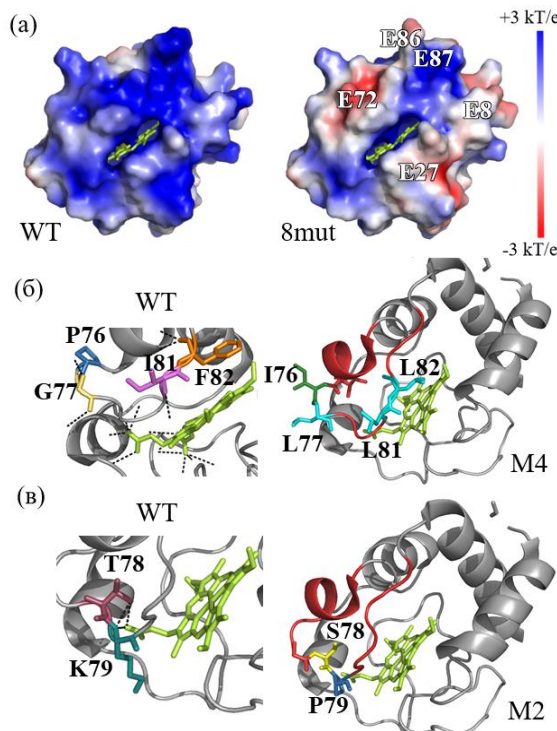


Рис. 11. Мутантные формы Cyt c в сравнении с Cyt c WT (ID PDB: 1HRC), гемы обозначены зеленым. (а) Поверхность электростатических потенциалов Cyt c WT и 8mut. Электростатические потенциалы рассчитаны с помощью программного модуля APBS и представлены в соответствии со шкалой (kT/e). На поверхности Cyt c 8mut отмечены замены а.о. Lys на а.о. Glu. Мутурируемые а.о. в белковом микроокружении гема и структура (б) Cyt c M4 и (в) Cyt c M2. Водородные связи, которые формируются мутурируемыми а.о. и гемом, представлены в виде прерывистых линий, Ω-петля 3 выделена красным. Изображения получены в программе PyMOL.

Cyt c 8mut – это мутантная форма с заменами а.о. Lys на Glu (K8E/K27E/K72E/K86E/K87E) в универсальном сайте взаимодействия Cyt c, дополненными заменами а.о. Glu на Lys (E62K/E69K/E90K) с целью частичной компенсации общего поверхностного заряда белка (рис. 11, а). Важно отметить, что Cyt c 8mut практически утратил функцию переносчика электронов в ЭТЦ митохондрий. Две

другие формы Cyt *c* имеют замены в Ω-петле 3 (а.о. 70–85) – T78S/K79P (M2) и P76I/G77L/I81L/F82L (M4) (рис. 11, б и в). Мутантные формы Cyt *c* M2 и M4 были сконструированы ранее с целью получения белков с отличающимися конформационными характеристиками гемовой группы. Кроме того, Lys27, Lys72, Lys79, Lys86, Pro76, Ile81 и Phe82 относятся к предполагаемому интерфейсу взаимодействия с Ngb. Таким образом, исследование взаимодействия Ngb с данными мутантными формами Cyt *c* представляет существенный интерес.

Мутантные формы Cyt *c* 8mut, M2, M4 нарабатывали и очищали согласно протоколу для Cyt *c* WT. Спектры поглощения имели некоторые отличия от Cyt *c* WT, которые могут быть связаны как с изменением спина гемового железа, так и с изменениями белкового микроокружения гемовой группы (рис. 12).

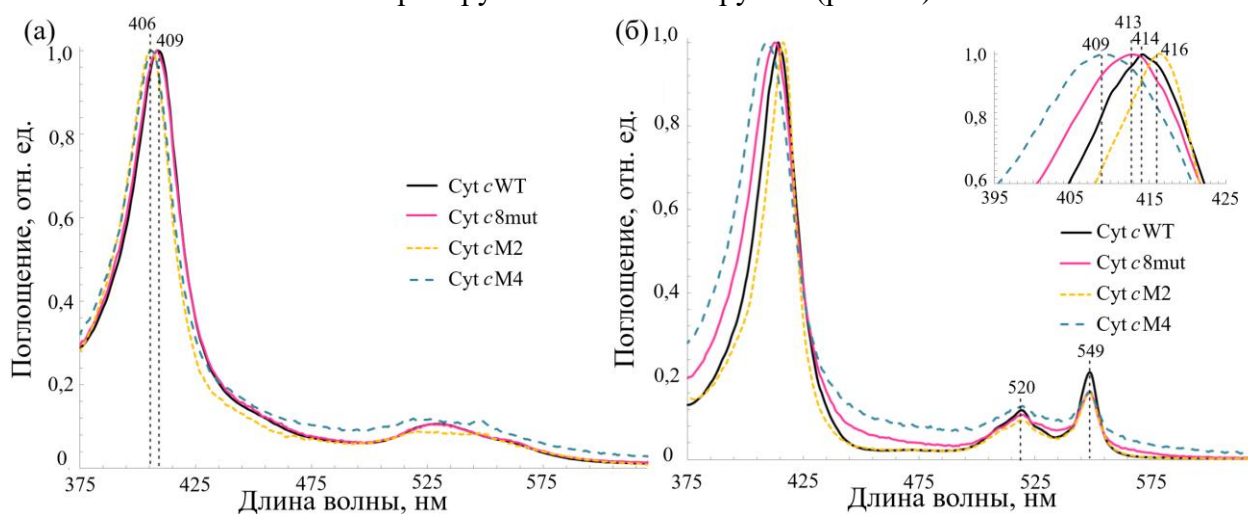


Рис. 12. Спектры поглощения Cyt *c* и его мутантных форм в УФ-видимой области: (а) окисленных форм; (б) восстановленных форм.

Таким образом, сконструированы мутантные гены и наработаны препаративные количества мутантных форм Ngb и Cyt *c*, которые были использованы для изучения влияния аминокислотных замен на образование реакционного комплекса и перенос электрона между данными гемсодержащими белками.

4.2. Конформационные изменения гемовых групп в мутантных формах Ngb и Cyt *c*

Перенос электрона при взаимодействии Ngb и Cyt *c* происходит с гема на гем, поэтому важно понимать, приводят ли внесенные мутации к изменению конформационных свойств гемовой группы и ее белкового микроокружения. С помощью сравнительного анализа спектров КР/ГКР можно оценить следующие конформационные параметры (Chertkova et al., 2017; Brazhe et al., 2023): I. **Конформационная подвижность гема** (колебания пироллов, 1168 или 1170 cm^{-1} и 1586 cm^{-1}); II. **Жесткость белкового микроокружения** (колебания боковых метильных радикалов, 1130 или 1127 cm^{-1}); III. **Вероятность нахождения гема в плоской конформации** (колебания метиновых мостиков, 1640 cm^{-1}). Пики с максимальными положениями при 1368 , 1375 cm^{-1} (Ngb) и 1365 , 1371 cm^{-1} (Cyt *c*) используются для нормировки, что позволяет учесть различия в интенсивности тех или иных пиков на спектрах окисленных и восстановленных гемов.

Показано, что соотношение интенсивности пиков $1640/1375$ значительно ниже для всех мутантных форм Ngb в окисленной форме (рис. 13, а), что свидетельствует о пониженной вероятности плоской конформации гема мутантных форм Ngb. Соотношения

интенсивности пиков 1168/1375, 1130/1375 окисленного Ngb K95E значимо снижены по сравнению с Ngb WT (рис. 13, б, в). Следовательно, для данной мутантной формы характерна повышенная жесткость белкового микроокружения гемовой группы и пониженная способность гема к изменению конформации. Соотношения интенсивности пиков 1586/1368, 1168/1368, 1130/1368 для восстановленных мутантных форм Ngb, за исключением Ngb E87K, были ниже (рис. 13, г-е), что также свидетельствует в пользу пониженной конформационной лабильности гемовой группы мутантных форм Ngb в восстановленном состоянии.

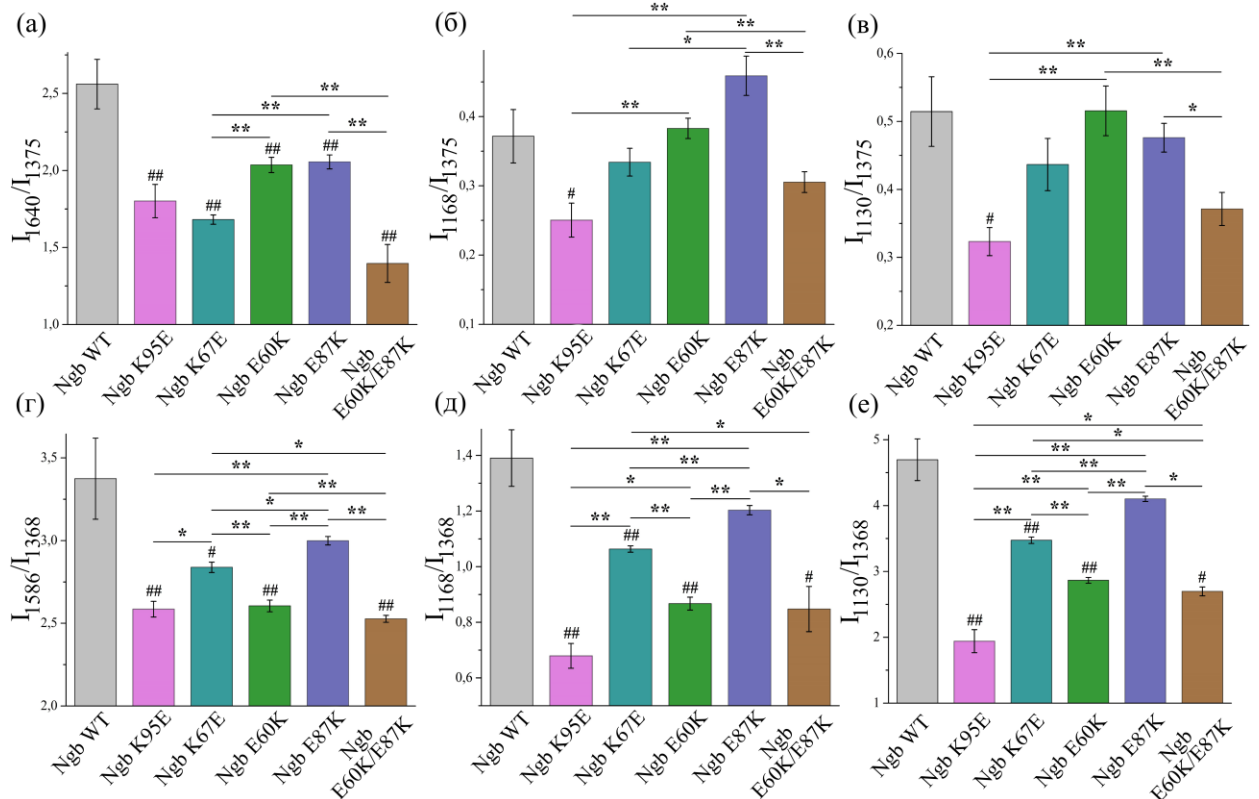


Рис. 13. Соотношения интенсивностей отдельных пиков спектров ГКР окисленных форм Ngb (а) 1640/1375; (б) 1168/1375; (в) 1130/1375 и спектров КР восстановленных форм Ngb (г) 1586/1368; (д) 1168/1368; (е) 1130/1368. Отмечены ошибки среднего, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ для мутантных форм Ngb в сравнении с Ngb WT, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ для мутантных форм Ngb, сравниваемых между собой (непараметрический U-критерий Манна-Уитни), $n = 5$.

Выявлено, что соотношение интенсивности пиков 1640/1371 окисленного Cyt c K25E в два раза выше такового для Cyt c WT и двух других мутантных форм (рис. 14, а), т.е. Cyt c K25E характеризуется повышенной вероятностью плоской конформации гема. Соотношение интенсивности пиков 1170/1371 снижено у окисленных Cyt c K25E и Cyt c K25E/K72E (рис. 14, б), т.е. есть вероятность снижения конформационной подвижности их гемовых групп. Все окисленные и восстановленные мутантные Cyt c не отличались от Cyt c WT по параметру, характеризующему жесткость белкового микроокружения (рис. 14, в, е). Конформационный параметр 1170/1365 снижен у всех мутантных Cyt c, при этом наиболее выраженные изменения зарегистрированы для Cyt c K25E/K72E (рис. 14, д).

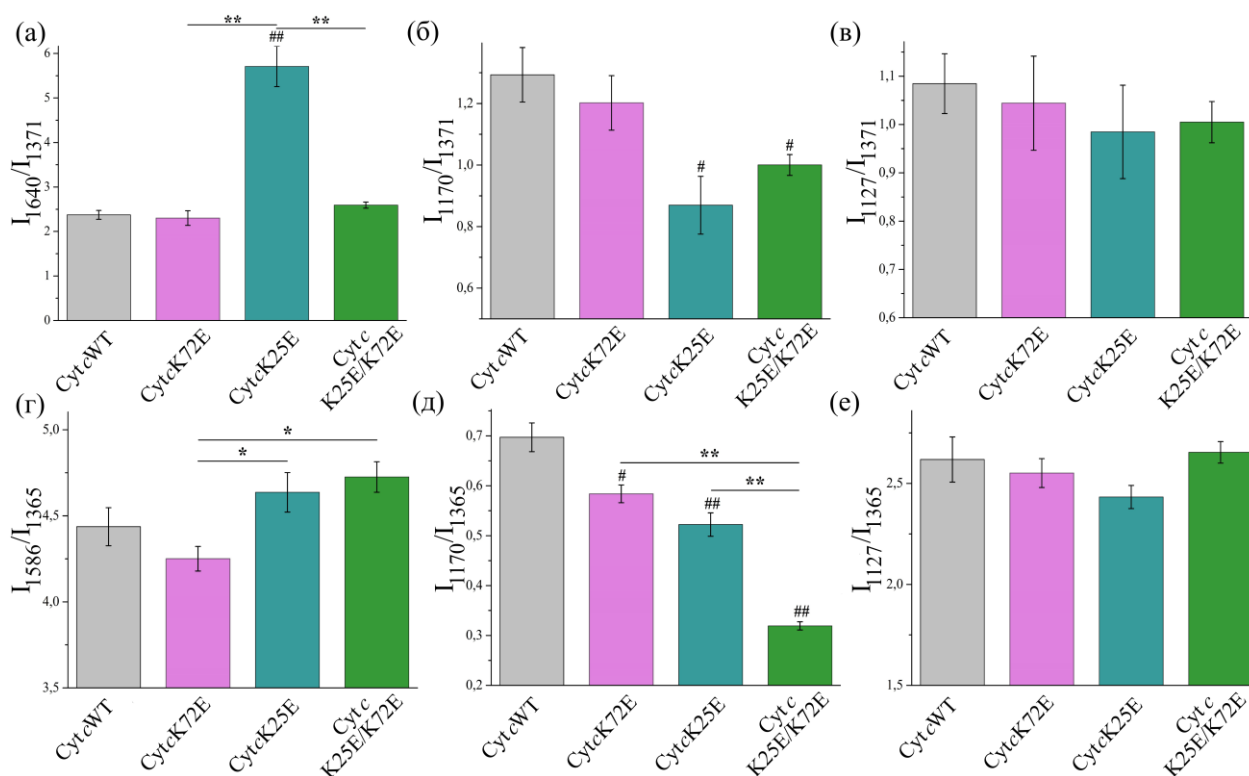


Рис. 14. Соотношения интенсивностей отдельных пиков спектров ГКР окисленных форм *Cyt c* (а) 1640/1371; (б) 1170/1371; (в) 1127/1371 и спектров КР восстановленных форм *Cyt c* (г) 1586/1365; (д) 1170/1365; (е) 1127/1365. Отмечены ошибки среднего, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ для мутантных форм *Cyt c* в сравнении с *Cyt c* WT, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ для мутантных форм *Cyt c*, сравниваемых между собой (непараметрический U-критерий Манна-Уитни), $n = 5$.

Показано, что вероятность плоской конформации гема значительно снижена у *Cyt c* M2 по сравнению с другими формами *Cyt c* (рис. 15, а). Соотношение интенсивностей пиков 1170/1371 снижено для всех мутантных форм (рис. 15, б), а значит, конформационная подвижность их гемов также снижена. Подвижность метильных радикалов гема снижена только в случае *Cyt c* 8mut (рис. 15, в), что свидетельствует о повышении жесткости белкового микроокружения, по сравнению с *Cyt c* WT.

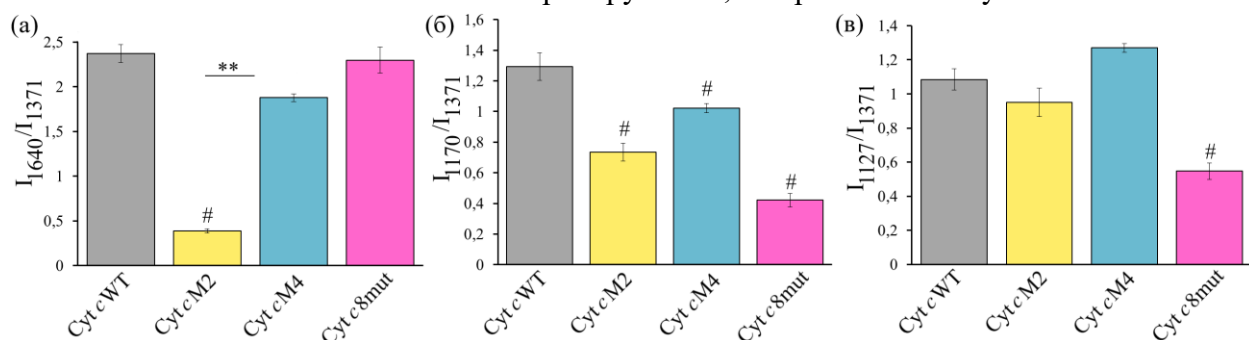


Рис. 15. Соотношения интенсивностей отдельных пиков спектров ГКР окисленных форм *Cyt c* (а) 1640/1371; (б) 1170/1371; (в) 1127/1371. Отмечены ошибки среднего, # $p < 0,05$ для мутантных форм *Cyt c* в сравнении с *Cyt c* WT, ** $p < 0,01$ для мутантных форм *Cyt c*, сравниваемых между собой (непараметрический U-критерий Манна-Уитни), $n = 5$.

Таким образом, на основе спектральных данных КР/ГКР мутантных форм *Ngb* и *Cyt c* выявлены конформационные изменения их гемовых групп, которые могут повлиять на эффективность редокс-реакций. Все мутантные формы *Ngb*, за исключением *Ngb* E87K, отличаются по ряду конформационных параметров от *Ngb* WT. Среди мутантных форм

Cyt *c* стоит выделить Cyt *c* K25E, M2 и 8mut как наиболее отличающиеся от Cyt *c* WT по исследуемым конформационным параметрам.

4.3. Влияние аминокислотных замен на редокс-взаимодействие Ngb и Cyt *c*

С помощью разработанной методики (рис. 5) получены разностные спектры различных редокс-пар Ngb и Cyt *c* (рис. 16).

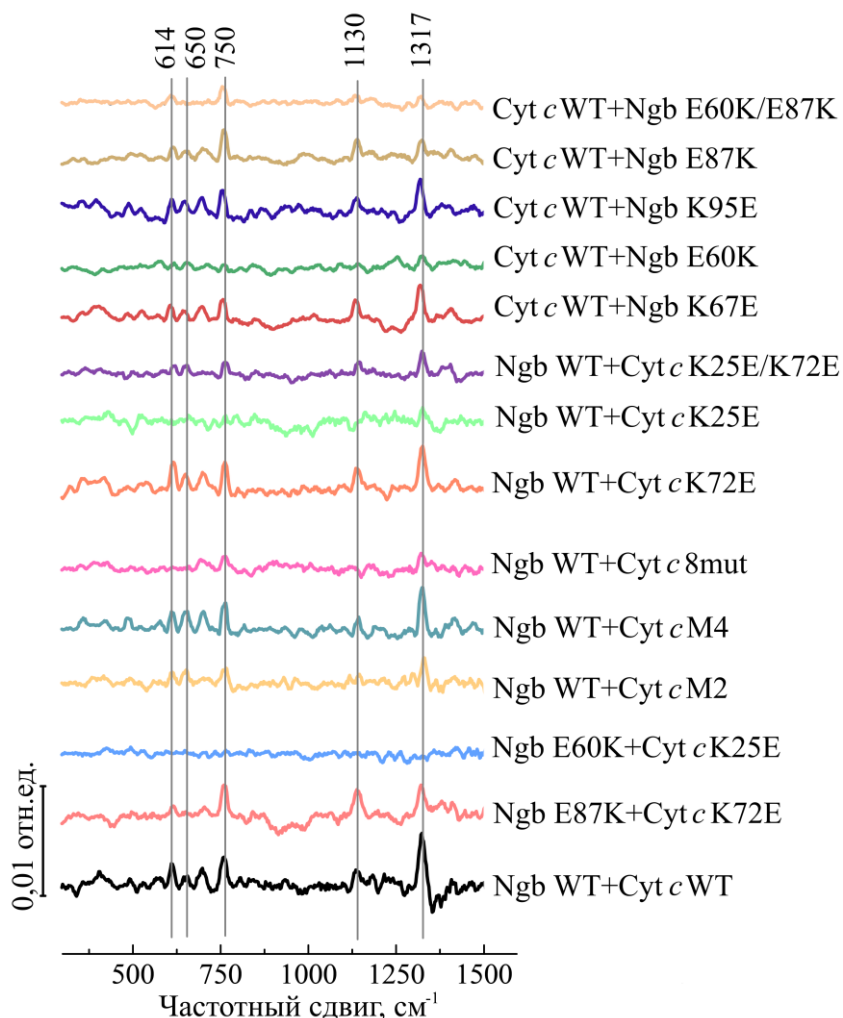


Рис. 16. Разностные КР-спектры редокс-пар Cyt *c* + Ngb. Спектры нормированы на суммарную интенсивность соответствующего спектра.

Разностные спектры редокс-пар Cyt *c* WT и мутантных форм Ngb: K67E, E87K и K95E, Ngb WT и мутантных форм Cyt *c*: K72E, M4, а также Cyt *c* K72E и Ngb E87K повторяют разностные спектры редокс-пары белков дикого типа по форме и содержат все основные характеристические пики. При этом разностные спектры редокс-пар Cyt *c* WT и мутантных форм Ngb: E60K и E60K/E87K, Ngb WT и мутантных форм Cyt *c*: K25E, K25E/K72E, M2 и 8mut, а также Cyt *c* K25E и Ngb E60K близки к шумовым спектрам с разной степенью выраженности отдельных пиков (рис. 16).

Для проведения сравнительного анализа разностных спектров рассчитаны амплитуды пиков (*d*-параметр) со следующими максимальными положениями: 614, 650, 750, 1130 и 1317 см^{-1} . Данные пики являются производными от пиков на КР-спектре восстановленного Cyt *c* (610, 648, 750, 1127 и 1313 см^{-1}), и, следовательно, их физические интерпретации одинаковы. Далее *d*-параметры каждого пика рассмотрены по отдельности (рис. 17, 18).

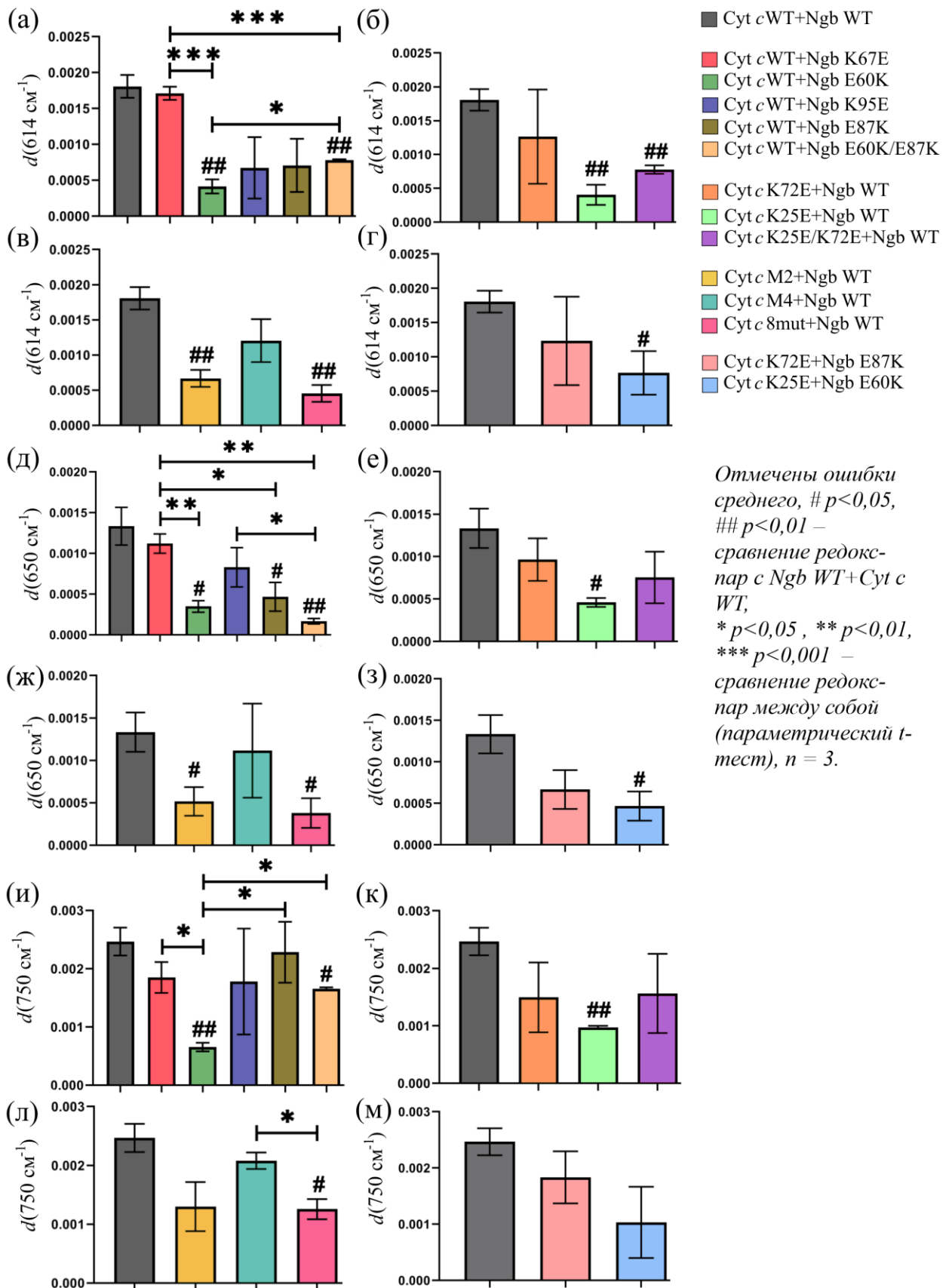


Рис. 17. Сравнительный анализ по d -параметрам (614 см^{-1} , 650 см^{-1} , 750 см^{-1}) разностных спектров редокс-взаимодействий: (а), (д), (и) Cyt c WT и мутантных форм Ngb; (б), (е), (к) Ngb WT и мутантных форм Cyt c с заменами в предполагаемом интерфейсе взаимодействия с Ngb; (в), (ж), (л) Ngb WT и мутантных форм Cyt c с

заменами в Ω -петле 3 и универсальном сайте взаимодействия Cyt c; (г), (з), (м) мутантных форм обоих белков Ngb и Cyt c.

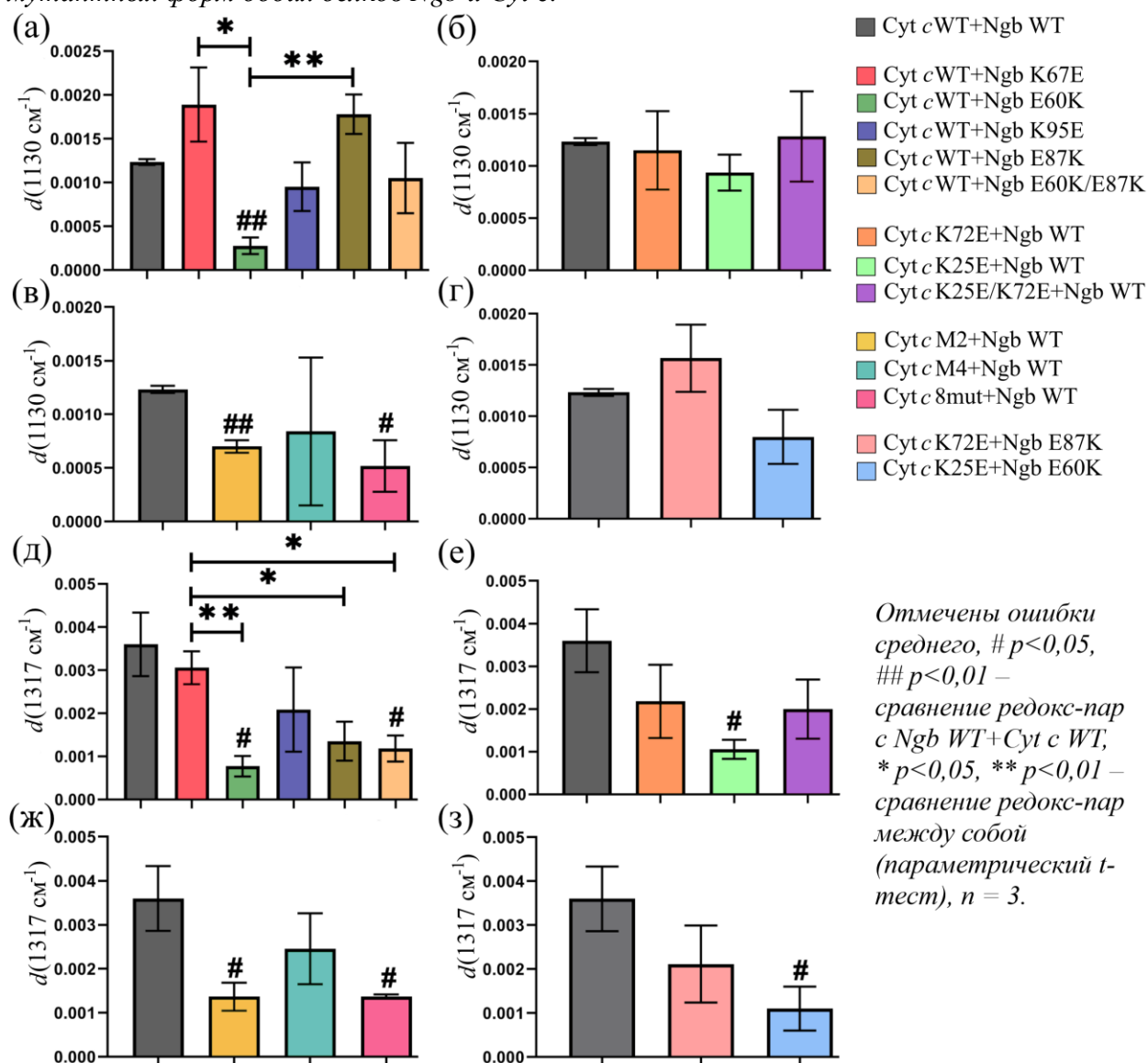


Рис. 18. Сравнительный анализ по d -параметрам (1130 см^{-1} , 1317 см^{-1}) разностных спектров редокс-взаимодействий (а), (д) Cyt c WT и мутантных форм Ngb; (б), (е) Ngb WT и мутантных форм Cyt c с заменами в предполагаемом интерфейсе взаимодействия с Ngb; (в), (ж) Ngb WT и мутантных форм Cyt c с заменами в Ω -петле 3 и универсальном сайте взаимодействия Cyt c; (г), (з) мутантных форм обоих белков Ngb и Cyt c.

Пик с максимумом при 614 см^{-1} соответствует колебаниям пирролов и связан с повышением конформационной лабильности гемовой группы. Зарегистрировано значимое снижение d -параметра (614 см^{-1}), рассчитанного для пар: Cyt c WT+Ngb E60K; Cyt c WT+E60K/E87K; Cyt c K25E+Ngb E60K; Ngb WT и мутантных форм Cyt c: K25E, K25E/K72E, M2 и 8mut (рис. 17, а-г), что свидетельствует об отсутствии изменений в колебаниях пирролов, которые необходимы для переноса электрона с Ngb на Cyt c.

Пик с максимумом при 650 см^{-1} характеризует растяжения и колебания C-S-связей и пирролов в восстановленном геме с. Значения d -параметра (650 см^{-1}) оказались сниженными для редокс-пар: Cyt c WT и мутантных форм Ngb: E60K, E87K, E60K/E87K; Cyt c K25E+Ngb E60K; Ngb WT и мутантных форм Cyt c: K25E, M2 и 8mut (рис. 17, д-з), что свидетельствует об отсутствии смещения гема в гемовой впадине и коррелирует с нарушением процесса переноса электрона.

Пик с максимальным значением при 750 см^{-1} чувствителен к изменениям конформации гема. Только для четырех редокс-взаимодействий наблюдалось снижение d -параметра (750 см^{-1}): Cyt *c* WT и мутантных форм Ngb E60K и E60K/E87K; Ngb WT и мутантных форм Cyt *c* K25E и 8mut (рис. 17, и-м). Наблюдаемое снижение d -параметра (750 см^{-1}) связано с уменьшением вероятности конформационных изменений гема, способствующих переносу электрона.

Кроме того, наблюдается снижение значения d -параметра (1130 см^{-1}) для трех редокс-пар: Cyt *c* WT+Ngb E60K; Ngb WT и мутантных форм Cyt *c* M2 и 8mut (рис. 18, а-г). Данный пик соответствует колебаниям метильных ($\text{C}_\beta\text{-CH}_3$) групп, и снижение d -параметра (1130 см^{-1}) ассоциировано со снижением конформационной лабильности гемовой группы, а, следовательно, и с нарушениями при процессах конформационных перестроек гемов под перенос электрона с гема на гем.

Значимое снижение d -параметра (1317 см^{-1}) зарегистрировано для следующих пар: Cyt *c* WT и мутантных форм Ngb E60K и E60K/E87K; Cyt *c* K25E и Ngb E60K; Ngb WT и мутантных форм Cyt *c* K25E, M2 и 8mut (рис. 18, д-з). Снижение d -параметра (1317 см^{-1}) означает снижение вероятности колебаний метиновых мостиков и вероятности плоской конформации гема. Плоская конформация гема ассоциирована с повышением эффективности реакций переноса электрона на гем Cyt *c*, а также его редокс-потенциала (Sun et al., 2014; Takano et al., 2020). Суммируя, по данному параметру можно судить о вероятности нахождения гема Cyt *c* в плоской конформации в ходе редокс-взаимодействия с Ngb и снижение d -параметра (1317 см^{-1}) означает нарушение данного взаимодействия.

Таким образом, для двух редокс-пар белков – Cyt *c* WT+Ngb E60K и Ngb WT+Cyt *c* 8mut – выявлены значимые отличия от пары Ngb WT+Cyt *c* WT по d -параметрам всех исследуемых разностных пиков. Еще для четырех белковых пар – Cyt *c* WT+Ngb E60K/E87K; Ngb WT+Cyt *c* K25E; Ngb WT+Cyt *c* M2; Ngb E60K+Cyt *c* K25E – выявлены значимые отличия по d -параметрам трех-четырёх разностных пиков. Для данных взаимодействий отсутствуют статистически значимые отличия по d -параметру (750 см^{-1}) и/или d -параметру (1130 см^{-1}), однако имеются отличия по d -параметру (614 см^{-1}). Это означает, что конформационные изменения гемовой группы нарушены, но, возможно, чуть в меньшей степени. Однако в совокупности со снижением вероятности плоской конформации (1317 см^{-1}) и отсутствия процессов смещения гема Cyt *c* в гемовой впадине (650 см^{-1}), процесс переноса электрона с Ngb на Cyt *c* в этих парах нарушается с высокой вероятностью. Нарушение редокс-взаимодействия в обсуждаемых белковых парах является следствием внесения мутаций в аминокислотные последовательности белков. Данные мутации могут приводить как к нарушениям электростатических взаимодействий (рис. 7, 11), так и к нарушению процессов принятия гемами оптимальных для переноса электрона конформаций за счет повышенной жесткости белкового микроокружения, сниженной подвижности метильных радикалов, метиновых мостиков и пирролов (рис. 13-15).

В случае двух редокс-пар – Cyt *c* WT+Ngb E87K и Ngb WT+Cyt *c* K25E/K72E – выявлены изменения только одиночных d -параметров (614 см^{-1} или 650 см^{-1}). Вероятно, существует некоторая тенденция к нарушению взаимодействия при внесении данных мутаций в аминокислотные последовательности исследуемых белков, при этом реакция переноса электрона все-таки протекает успешно. Наконец, для пяти пар

взаимодействующих белков не было выявлено значимых отличий от пары белков дикого типа: Cyt *c* WT+Ngb K95E; Cyt *c* WT+Ngb K67E; Ngb WT+Cyt *c* K72E; Ngb WT+Cyt *c* M4; Ngb E87K+Cyt *c* K72E. Таким образом, редокс-реакции между белками в данных парах происходят без нарушений, несмотря на внесенные мутации.

На основе полученных данных мутантные формы Ngb и Cyt *c* можно расположить в ряды по уменьшению способности к реакции переноса электрона между Ngb и Cyt *c*:

1. Cyt *c* WT≈K72E≈M4>K25E/K72E>M2≈K25E>8Mut
2. Ngb WT≈K67E≈K95E>E87K>E60K/E87K>E60K

Принимая во внимание все полученные результаты, был предложен постадийный молекулярный механизм взаимодействия нейропротекторного белка Ngb с Cyt *c* (рис. 19).

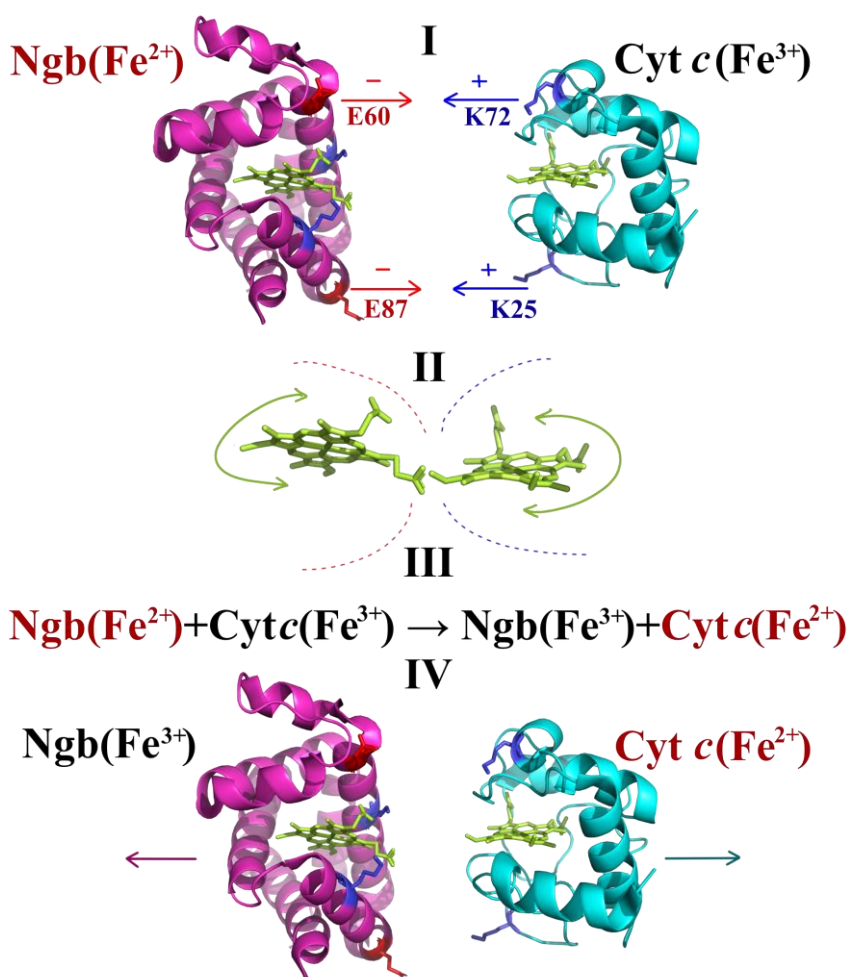


Рис. 19. Предполагаемый молекулярный механизм взаимодействия Ngb с Cyt *c*:

I. Сближение белковых молекул преимущественно за счет электростатических взаимодействий и формирование реакционного комплекса.
II. Переход гемов в конформации, способствующие переносу электрона: смещение гема Cyt *c* в гемовой впадине, изменение конформации со скрученной на плоскую, повышение подвижности пирролов и метильных радикалов.
III. Перенос электрона от Ngb на Cyt *c*.
IV. Диссоциация реакционного комплекса.

Таким образом, с помощью разработанной методики на основе КР-спектроскопии изучено влияние аминокислотных замен на взаимодействие Ngb и Cyt *c* и предложен постадийный механизм их белок-белкового взаимодействия. Сравнительный анализ по *d*-параметрам основных пиков на разностных КР-спектрах для редокс-пар Cyt *c* и Ngb позволил выявить нарушение редокс-реакции для Ngb WT с Cyt *c* K25E; M2; 8mut и Cyt *c* WT с Ngb E60K; E60K/E87K. Внесение данных мутаций могло привести к нарушению электростатических взаимодействий между белковыми молекулами, а также к нарушению конформационных перестроек гемов под перенос электрона. Следовательно, стадии I и II являются одинаково важными для эффективного редокс-взаимодействия Ngb и Cyt *c*.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и оптимизирована высокоэффективная схема биосинтеза, выделения и очистки рекомбинантного Ngb человека в виде водорастворимой холоформы. Физико-химическими методами подтверждено соответствие свойств рекомбинантного Ngb нативным.
2. На основе спектроскопии КР разработана новая методика, с помощью которой показано, что между гемами окисленного Cyt *c* и восстановленного Ngb протекает специфическая реакция переноса электрона, сопровождающаяся смещением гема Cyt *c* в гемовой впадине, повышением вероятности плоской конформации гема Cyt *c*, а также повышением подвижности пирролов и метильных радикалов гема.
3. Получена панель мутантных форм Ngb (E60K, E87K, K67E, K95E, E60K/E87K) и Cyt *c* (K25E, K72E, K25E/K72E) с заменами в предполагаемом интерфейсе взаимодействия этих белков. При помощи спектроскопии КР показано, что данные мутации Ngb (за исключением E87K) вызывают как снижение вероятности плоской конформации, так и снижение конформационной подвижности гема, а мутация K25E Cyt *c* приводит к повышению вероятности плоской конформации гема, но уменьшает его конформационную подвижность. Показано, что введение аминокислотных замен E60K (Ngb) и K25E (Cyt *c*) приводит к нарушению редокс-взаимодействия между Ngb и Cyt *c*.
4. На основе полученных экспериментальных данных предложен вероятный молекулярный механизм взаимодействия Ngb и Cyt *c*: I. Сближение белковых молекул за счет электростатических взаимодействий и формирование реакционного комплекса; II. Переход гемов в конформации, способствующие переносу электрона; III. Перенос электрона от гема Ngb на гем Cyt *c*; IV. Диссоциация реакционного комплекса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Bochkova Z.V.*, **Semenova M.A.***, Smirnova O.M., Maksimov G.V., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Chertkova R.V., Brazhe N.A. The molecular mechanism of redox interaction between neuroglobin and cytochrome *c*. // Int. J. Biol. Macromol. 2025. V. 318. P. 145040. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145040> **IF 8.5 (2024), Q1/Q1 (SJR/WOS)**
2. **Semenova M.A.***, Bochkova Z.V.*, Smirnova O.M., Maksimov G.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Brazhe N.A., Chertkova R.V. Charged amino acid substitutions affect conformation of neuroglobin and cytochrome *c* heme groups. // Curr. Issues Mol. Biol. 2024. V. 46. P. 3364–3378. <https://doi.org/10.3390/cimb46040211> **IF 3.0 (2024), Q2/Q3 (SJR/WOS)**
3. **Semenova M.A.***, Chertkova R.V.*, Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A. Molecular interactions between neuroglobin and cytochrome *c*: possible mechanisms of antiapoptotic defence in neuronal cells. // Biomolecules. 2023. V. 13. P. 1233. <https://doi.org/10.3390/biom13081233> **IF 4.8 (2024), Q1/Q1 (SJR/WOS)**
4. Chertkova R.V., Oleynikov I.P., Pakhomov A.A., Sudakov, R.V., Orlov V.N., **Semenova M.A.**, Arutyunyan A.M., Ptushenko V.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Vygodina T.V. Mutant cytochrome *c* as a potential detector of superoxide generation: effect of mutations on the function and properties. // Cells. 2023. V. 12. P. 2316. <https://doi.org/10.3390/cells12182316> **IF 5.2 (2024), Q1/Q2 (SJR/WOS)**
5. **Semenova M.A.**, Smirnova O.M., Ignatova A.A., Parshina E.Y., Maksimov G.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Chertkova R.V. Development of mutant forms of neuroglobin with substitutions in the interaction surface with cytochrome *c*. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 1483–1488. <https://doi.org/10.1134/S1068162023060274> **IF 1.7 (2024), Q3/Q3 (SJR/WOS)**

6. **Семенова М. А.**, Бочкова Ж. В., Смирнова О. М., Игнатова А. А., Паршина Е. Ю., Зиганшин Р. Х., Бочаров Э. В., Браже Н. А., Максимов Г. В., Кирпичников М. П., Долгих Д. А., Черткова Р. В. Разработка системы биосинтеза, выделения и очистки холоформы рекомбинантного нейроглобина и его физико-химическая характеристика // Биоорганическая химия. 2023. Т. 49. С. 319–330. <https://doi.org/10.31857/S013234232303020X> **IF 1.7 (2024), Q3/Q3 (SJR/WOS)**
7. Chertkova R.V., Firsov A.M., Brazhe N.A., Nikelshparg E.I., Bochkova Z.V., Bryntseva T.V., **Семенова М.А.**, Baizhumanov A.A., Kotova E.A., Kirpichnikov M.P., Maksimov G.V., Antonenko Y.N., Dolgikh D.A. Multiple mutations in the non-ordered red Ω -loop enhance the membrane-permeabilizing and peroxidase-like activity of cytochrome *c* // *Biomolecules*. 2022. V. 12. P. 665. <https://doi.org/10.3390/biom12050665> **IF 4.8 (2024), Q1/Q1 (SJR/WOS)**

* Авторы внесли равный вклад в работу

Тезисы докладов на конференциях:

1. **Семенова М.А.**, Бочкова Ж.В., Смирнова О.М., Браже Н.А., Максимов Г.В., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Разработка методики исследования взаимодействия гемсодержащих белков, сопровождающегося переносом электрона // XXXVII международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 10-13 февраля 2025. С. 23.
2. **Семенова М.А.**, Бочкова Ж.В., Смирнова О.М., Браже Н.А., Максимов Г.В., Кирпичников М.П., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Влияние аминокислотных замен в нейроглобине и цитохроме *c* на реакцию переноса электрона между ними. // VI Международная конференция ПОСТГЕНОМ'2024, XI Российский симпозиум БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ, Российско-китайский конгресс в области наук о жизни. Московская обл., ПСБ «Патриот», 29 октября – 2 ноября 2024. С. 315.
3. **Семенова М.А.**, Бочкова Ж.В., Смирнова О.М., Браже Н.А., Максимов Г.В., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Влияние аминокислотных замен в предполагаемом интерфейсе взаимодействия на протекание окислительно-восстановительной реакции между нейроглобином и цитохромом *c*. // XXXVI международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 7-9 февраля 2024. С. 30.
4. **Семенова М.А.**, Бочкова Ж.В., Смирнова О.М., Паршина Е.Ю., Бочаров Э.В., Браже Н.А., Максимов Г.В., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Характер взаимодействия нейроглобина и цитохрома *c*. // XXXI Международная конференция «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Крым, Ялта-Гурзуф, 28 мая – 7 июня 2023. С. 147–151.
5. **Семенова М.А.**, Бочкова Ж.В., Смирнова О.М., Игнатова А.А., Паршина Е.Ю., Зиганшин Р.Х., Бочаров Э.В., Браже Н.А., Максимов Г.В., Кирпичников М.П., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Конформационные и редокс-изменения гемопорфиринов при протекании окислительно-восстановительной реакции между нейроглобином и цитохромом *c*. // VII Съезд биофизиков России. Краснодар, 17-23 апреля 2023 С. 69-70.
6. **Семенова М.А.**, Смирнова О.М., Игнатова А.А., Бочаров Э.В., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Получение гемсодержащих белков нейроглобина и цитохрома *c* с мутациями в предполагаемом интерфейсе их взаимодействия. // 65-я Всероссийская научная конференция МФТИ. Москва, 3-8 апреля 2023 г. С. 27-28.
7. **Семенова М.А.**, Бочкова Ж.В., Смирнова О.М., Браже Н.А., Максимов Г.В., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Исследование взаимодействия гемсодержащих белков нейроглобина и цитохрома *c* методом спектроскопии комбинационного рассеяния. // XXXV международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 7-10 февраля, 2023. С.33.