

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.352

МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТИОННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ,
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ПЕРЕКИСНОМУ ОКИСЛЕНИЮ ЛИПИДОВ,
С МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНОЙ

А. М. Нестеренко^{1,2}, Е. Г. Холина³, К. Г. Лямзаев¹, А. Я. Мулкиджанян^{1,3,4}, Б. В. Черняк^{1,*}

Представлено академиком РАН В.П. Скулачевым 23.10.2018 г.

Поступило 23.10.2018 г.

Кардиолипин (CL) играет центральную роль в перекисном окислении липидов (ПОЛ) внутренней мембраны митохондрий. Это связано с тем, что содержание ненасыщенных жирных кислот в кардиолипине значительно выше, чем в других фосфолипидах. Окисление CL играет важную роль в регуляции различных внутриклеточных сигнальных путей, а чрезмерное его окисление способствует развитию различных патологий и, возможно, участвует в процессе старения. Митохондриально-направленные антиоксиданты, содержащие катион трифенилфосфония (TRP^+), эффективно защищают CL от окисления. Предполагается, что флуоресцентные зонды, чувствительные к ПОЛ на основе флуорофора C11-BODIPY и несущие остаток TRP^+ , могут избирательно регистрировать окисление CL. Для проверки этой возможности мы провели молекулярно-динамическое моделирование таких зондов в модельной митохондриальной мембране. Показано, что зонды располагаются в мембране на той же глубине, что и ненасыщенные связи в молекуле CL, чувствительные к окислению. Увеличение длины линкера, связывающего флуорофор и остаток TRP^+ , мало влияет на положение зонда в мембране, что указывает на возможность модификации линкера для повышения селективности зондов к CL.

Ключевые слова: флуоресцентный зонд, перекисное окисление, молекулярная динамика, кардиолипин, BODIPY, митохондриальная мембрана, митохондриально-направленные катионы.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524864509-513>

Митохондрии — один из основных источников активных форм кислорода (АФК) в клетке, а также один из наиболее важных мишеней окислительного повреждения. Внутренняя митохондриальная мембрана особенно чувствительна к перекисному окислению липидов (ПОЛ), поскольку фосфолипиды, содержащие ненасыщенные жирные кислоты, в ней находятся в прямом контакте с компонентами дыхательной цепи, которые продуцируют АФК. Перекисное окисление липидов во внутренней мембране митохондрий вызывает дисфункцию дыхательных

ферментов и повышение неселективной проницаемости мембраны, что ведёт к формированию “порочного круга”, который получил название АФК-индуцированного выделения АФК [1].

Центральную роль в ПОЛ внутренней мембраны митохондрий играет кардиолипин (CL, cardiolipin). Этот фосфолипид, в отличие от других природных фосфолипидов, содержит четыре жирнокислотные цепи и в клетках эукариот находится почти исключительно во внутренней мембране митохондрий. Содержание ненасыщенных жирных кислот в кардиолипине значительно выше, чем в других фосфолипидах, что делает его особенно чувствительным к окислению. Показано, что CL избирательно окисляется при различных стрессовых воздействиях [2], в то время как другие липиды остаются почти незатронутыми. Благодаря отрицательному заряду молекулы CL образуют комплекс с цитохромом c, который проявляет пероксидазную активность и стимулирует дальнейшее окисление CL [3]. Окисление кардиолипина играет важную роль в регуляции раз-

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

⁴Физический факультет, Университет Оснабрюка, Германия

*E-mail: bchernyak@yahoo.com

личных внутриклеточных сигнальных путей, а чрезмерное его окисление способствует развитию различных патологий и, возможно, участвует в процессе старения [2, 4].

В последнее десятилетие были разработаны митохондриально-направленные антиоксиданты, содержащие катион трифенилфосфония (TPP). В различных моделях окислительного стресса, а также в моделях различных патологий они оказались значительно более эффективны чем природные липофильные антиоксиданты — убихинол и α -токоферол [4]. Предполагается, что благодаря положительному заряду и амфифильности митохондриально-направленные антиоксиданты взаимодействуют с молекулами CL и предотвращают их окисление во внутренней мембране митохондрий [5].

Первым примером зонда для измерения перекисного окисления липидов в митохондриях служит молекула MitoPerOx (рис. 1а) предложенная М.П. Мерфи и коллегами [6]. Этот зонд был разработан на основе радиометрического зонда C11-BODIPY (581/591), широко используемого для детекции окисленных липидов [7]. В молекуле MitoPerOx остаток C11-BODIPY был конъюгирован с помощью короткого линкера с катионном трифе-

нилфосфония (TPP⁺). Мы предполагаем, что благодаря положительному заряду молекула MitoPerOx имеет повышенное сродство к кардиолипину и может служить прототипом для CL-селективных зондов. Для проверки этой гипотезы мы провели серию молекулярно-динамических симуляций, где наблюдали за поведением зонда MitoPerOx и его модификации с удлинненным линкером в модельной митохондриальной мембране. Предполагается, что линкер позволит в дальнейшем вносить модификации в молекулу зонда для повышения селективности, в частности изменять его заряд и гидрофильность. Кроме того, удлинение линкера может способствовать повышению относительной подвижности гидрофобной и гидрофильной частей молекулы, изменяя доступность CL для зонда. Эта модификация зонда получила наименование MitoCLOx (рис. 1а).

Для моделирования был выбран фосфолипидный состав мембраны, близкий к составу внутренней мембраны митохондрий: пальмитоил-линолеоил-фосфатидилхолин (PLPC), стеарил-линолеоил-фосфатидил-этанолламин (SLPE), пальмитоил-олеоил-фосфатидилхолин (POPC) и тетралиноеил-кардиолипин (TLCL) в отношении 7:21:7:8 [8]. В модели окисленной мембраны каждый CL имел одну окисленную цепь — гидропероксид линолевой кислоты.

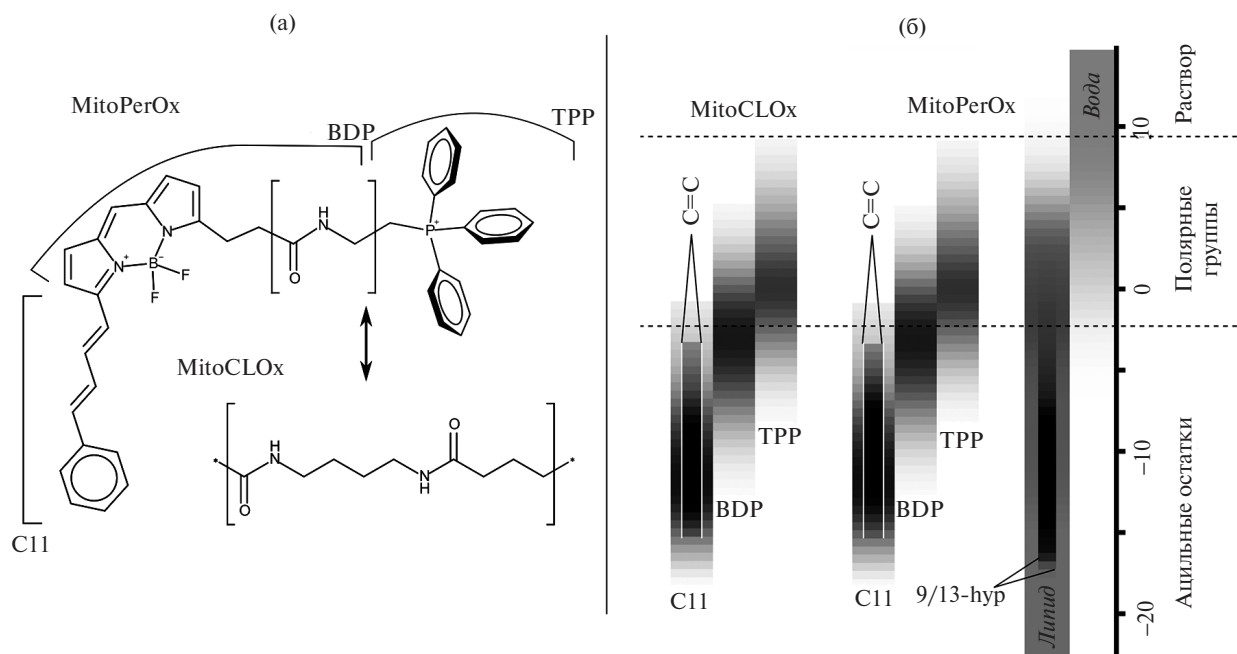


Рис. 1. Профиль распределения фрагментов митохондриальных зондов MitoPerOx и MitoCLOx в мембране. (а) — структура молекул. Отмечены фрагменты: C11 (диен-содержащий фрагмент чувствительный к окислению), BDP (флуорофор с линкером) и TPP⁺ (катион трифенилфосфония). (б) — профиль распределения. Яркость в точке градиента пропорциональна значению на профиле плотности той или иной группы. За ноль принято среднее положение α -атома глицерина липида SLPE. Внутри профиля C11-фрагмента отдельно показан профиль углеродов, образующих сопряженные двойные связи. Справа показаны профили распределения липидов и воды. Внутри профиля плотности липидов показан профиль остатков гидроперекиси.

Линолевая кислота может присоединять гидроперекись как по 9-му (hup-9), так и по 13-му (hup-13) положению, так что были смоделированы оба варианта. Для расчётов использовалось силовое поле CHARMM36 [9], дополненное на основе квантово-химических расчетов для молекул BODIPY и гидроперекиси линолевой кислоты. Расчёты по методу теории функциональной плотности (DFT) проводились в пакете Firefly [10], использовался базис 6-31*G и функционал B3LYP5. На основе квантово-химических расчетов были получены парциальные заряды и внесены в поле. Отдельно исследовали профили потенциальной энергии вокруг сопряжённых двойных связей, чувствительных к окислению, поскольку эти потенциалы определяют степень сохранения единой плоскости всей конструкции. Расчёты производили в течение 500 нс после уравновешивания мембраны в течение 100 нс.

Проведённые расчёты показали, что зонд в мембране имеет Г-образную форму (как показано на рис. 1а): гидрофобный фрагмент расположен в области ацильных остатков липидов и ориентирован

примерно вертикально, тогда как BODIPY, пептидный линкер и TPP⁺ располагаются в полярной области. Профили распределения фрагментов зондов перпендикулярно поверхности бислоя изображены на рис. 1б. Хорошо видно, что длина линкера практически не влияет на глубину расположения групп в мембране. Есть небольшие отличия, которые трудно заметить на рисунке: для MitoCLOx характерны несколько большая подвижность остатка TPP⁺, а также более глубокое в среднем залегание C11-фрагмента. В моделях окисленной мембраны расположение зондов не отличается. Расположение диенового фрагмента в обоих зондах по глубине погружения в бислой соответствует положению двойных связей в ацильных остатках кардиолипина (рис. 1б).

Для оценки латерального распределения зондов мы построили распределение плотности участков зонда и кардиолипина в координатах, где ноль находится в центре масс зонда, а вектор OY сопоставлен с проекцией вектора BODIPY-TPP на плоскость бислоя. На рис. 2 показаны проекции C11-фраг-

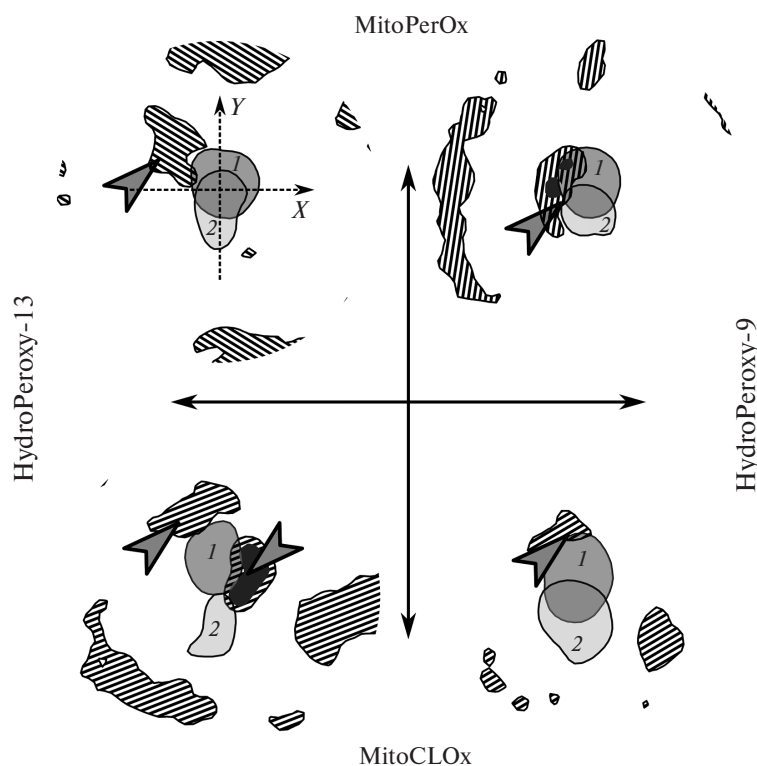


Рис. 2. Моделирование латерального распределения кардиолипина относительно зонда в бислое. Места высокой плотности TPP⁺ (1), C11-фрагмента (2) и CL (штриховка). Стрелки указывают на локальное повышение плотности CL вблизи TPP. Картины усреднены вдоль равновесного участка траекторий в молекулярной системе координат (см. пояснения в тексте). Верхний ряд — MitoPerOX, нижний — Mito-CLOx; слева — гидроперекись кардиолипина по 13-му положению в остатке линолевой кислоты, справа — гидроперекись по 9-му положению.

мента и TPP⁺ в обоих зондах на плоскость бисюля. Заштрихованная область соответствует 50%-ной вероятности нахождения окисленного CL, считая проекционную площадь кардиолипина, равной 1,2 нм² [11]. Неудивительно, что в такой проекции MitoPerOx имеет более компактную структуру, чем MitoCLOx. Во всех четырёх случаях имеется локальное повышение плотности CL вблизи остатка TPP⁺ зонда. Ожидаемого плавного концентрирования CL вокруг зонда не наблюдается, напротив, помимо локального повышения концентрации, вокруг зонда формируется “зона отчуждения” (рис. 2). Тот факт, что “зона отчуждения” формируется в расчетах с различными зондами и различными положениями гидроперекиси, указывает на достаточно высокую достоверность данного вычислительного результата. По-видимому, это происходит из-за сложного взаимодействия в многокомпонентной липидной смеси, в том числе из-за взаимного отталкивания молекул кардиолипина.

В модельной мембране не наблюдается плавного повышения концентрации CL по мере приближения к зондам. Тем не менее возле зондов всегда имеется локальное повышение концентрации CL. C11-фрагмент обоих зондов расположен глубоко в гидрофобной области, так же как и гидроперокси-группы окисленных CL. Эти свойства, по-видимому, и позволяют зондам детектировать окисление кардиолипина. Однако специфичного (по сравнению с другими липидами) взаимодействия с кардиолипином у зондов не наблюдается: в ближайшей координационной сфере зондов количество прочих липидов не ниже, чем количество CL. Результаты наших расчётов демонстрируют, что зонд с удлиненным линкером не теряет своих свойств, позволяющих окисляться гидропероксидом CL. Это позволяет предполагать, что внесение изменений в структуру линкерной части можно использовать для улучшения селективности зонда к кардиолипины.

Источники финансирования. Работа над проектом поддерживалась грантом РНФ № 17–14–01314, а также стипендией Президента РФ № 5511.2018.4 (первый автор). Использовались вычислительные мощности сектора биофизики и информатики сложных систем кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. // *Physiol Rev.* 2014. V. 94. № 3. P. 909–950.
2. Maguire J.J., Tyurina Y.Y., Mohammadyani D., Kapralov A.A., Anthonymuthu T.S., Qu F., Amoscato A.A., Sparvero L.J., Tyurin V.A., Planas-Iglesias J., He R.R., Klein-Seetharaman J., Bayir H., Kagan V.E. // *Biochim. Biophys. Acta.-Mol. Cell. Biol. Lipids.* 2017. V. 1862. № 1. P. 8–24.
3. Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A., Kapralov O., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Stoyanovsky D.A., Wipf P., Kochanek P.M., Greenberger J.S., Pitt B., Shvedova A.A., Borisenko G. // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. V. 46. № 11. P. 1439–1453.
4. Skulachev V.P., Antonenko Y.N., Cherepanov D.A., Chernyak B.V., Izyumov D.S., Khailova L.S., Klishin S.S., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Pletjushkina O.Y., Roginsky V.A., Rokitskaya T.I., Severin F.F., Severina I.I., Simonyan R.A., Skulachev M.V., Sumbatyan N.V., Sukhanova E.I., Tashliitsky V.N., Trendeleva T.A., Vyssokikh M.Y., Zvyagilskaya R.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1797. № 6–7. P. 878–889.
5. Lokhmatikov A.V., Voskoboinikova N., Cherepanov D.A., Skulachev M.V., Steinhoff H.J., Skulachev V.P., Mulki-djanian A.Y. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. P. 8 679 469.
6. Prime T.A., Forkink M., Logan A., Finichiu P.G., McLachlan J., Li Pun P.B., Koopman W.J., Larsen L., Latter M.J., Smith R.A., Murphy M.P. // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 53. № 3. P. 544–553.
7. Drummen G.P., van Liebergen L.C., Op den Kamp J.A., Post J.A. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 33. № 4. P. 473–90.
8. Comte J., Maïsterrena B., Gautheron D.C. // *Biochim. Biophys. Acta — Biomembr.* 1976. V. 419. № 2. P. 271–284.
9. Klauda J.B., Venable R.M., Freites J.A., O'Connor J.W., Tobias D.J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov I., MacKerell A., Pastor R.W. // *J. Phys. Chem. B.* 2010. V. 114. № 23. P. 7830–7843.
10. Granovsky A.A. Firefly version 8, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>
11. Phan M.D., Shin K. // *Biophys. J.* 2015. V. 108. № 8. P. 1977–1986.

MOLECULAR DYNAMICS MODELING OF THE INTERACTION OF CATIONIC FLUORESCENT LIPID PEROXIDATION-SENSITIVE PROBES WITH THE MITOCHONDRIAL MEMBRANE

A. M. Nesterenko^{1,2}, E. G. Kholina¹, K. G. Lyamzaev¹, A. Y. Mulkidzhanyan^{1,3}, B. V. Chernyak¹

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

²*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

³*University of Osnabruck, Germany*

Presented by Academician of the RAS V.P. Skulachev October 23, 2018

Received October 23, 2018

Cardiolipin (CL) plays a central role in lipid peroxidation (LPO) of the mitochondrial inner membrane due to higher content of unsaturated fatty acids in CL in comparison with the other phospholipids. CL oxidation plays an important role in the regulation of various intracellular signaling pathways and its excessive oxidation contributes to the development of various pathologies and, possibly, participates in the aging process. Mitochondria-targeted antioxidants containing triphenylphosphonium cation (TPP⁺) effectively protect CL from oxidation. It is assumed that fluorescent probes on the basis of the C11-BODIPY fluorophore sensitive to LPO and containing TPP⁺ can selectively register CL oxidation. To test this possibility, we carried out a molecular dynamic simulation of such probes in a model mitochondrial membrane. It is shown that the probes are located in the membrane at the same depth as the unsaturated bonds in CL molecules sensitive to oxidation. Increasing the length of the linker that binds the fluorophore and TPP⁺ residue has little effect on the position of the probe in the membrane. This indicates the possibility of modifying the linker to increase the selectivity of the probes to CL.

Keywords: fluorescent probe, lipid peroxidation, molecular dynamics, cardiolipin, BODIPY, mitochondrial membrane, mitochondria-targeted cations.