

УДК 577.21: 577.33

С.А.Самсонов (5 курс, каф. БФ), А.Н.Скворцов, к.ф.-м.н., доц., А.В.Васин, асп.

КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДОМЕНОВ ПРЕДПОЛАГАЕМОГО БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА ГЕНА CTR1

Медь – микроэлемент, при недостатке которого происходят нарушения в работе купроэнзимов, ответственных за осуществление ряда фундаментальных клеточных процессов, тогда как в свободном состоянии ионы меди являются токсичными агентами, вызывающими образование гидроксильных радикалов. Поэтому все организмы содержат метаболические системы меди, обеспечивающие безопасный перенос ионов меди из окружающей среды к местам образования купроэнзимов и их экскрецию. Некоторые белки этих систем клонированы, они сходны у филогенетически удаленных организмов [1].

В настоящее время на роль импортера меди через плазматическую мембрану у млекопитающих рассматривается CTR1, гомолог которого у дрожжей является специфическим трансмембранным транспортером ионов меди Cu^+ . Предположительно он имеет 3 трансмембранных домена (ТМД), М/Н богатые N-концевые мотивы и НСН С-концевой мотив и функционирует как гомотример. “Нокаут” гена Ctr1 у мышей приводит к ранней гибели эмбрионов у гомозигот и к резкому снижению содержания меди в мозгу, а также к существенному снижению активности купроэнзимов у гетерозигот. Роль белкового продукта этого гена, а также функция и структура его доменов остаются неизученными [2].

Основная цель данной работы состояла в 1) выявлении связи между уровнем экспрессии гена Ctr1 и поступлением меди в разные органы крысы в онтогенезе и 2) теоретическом анализе структуры основных доменов белковых продуктов генов Ctr1 разных видов.

В работе показано, что изменение содержания меди, измеренное методом атомно-абсорбционной спектроскопии, в мозгу и печени у новорожденных крыс в развитии коррелирует с уровнем зрелых транскриптов CTR1-мРНК, который определен методом ОТ-ПЦР. В клетках молочной железы содержание CTR1-мРНК и концентрация меди в молоке в течение лактации уменьшаются пропорционально.

Результаты филогенетического анализа по программам пакета PHYLIP 3.6 показали, что исследуемые а.к. последовательности CTR1 различных видов, взятые из открытых баз данных на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, образуют 2 группы. Первая включает в себя а.к. последовательности CTR1 высших эукариот, в ней четко выделяется кластер, образованный последовательностями CTR1 позвоночных, а также кластеры насекомых, грибов, растений и нематод, вторая - филогенетически удаленные последовательности CTR1 одноклеточных эукариот. Топология эволюционного древа для CTR1 полностью согласуется с топологией видового древа для эукариотических организмов. При этом наиболее филогенетически близкими доменами являются ТМД2 и ТМД3.

Согласно предсказанию вторичной структуры по программе GOR4 на www.exPASy.org N-концевой домен CTR1 человека содержит 3 участка с потенциальной β -структурой, которые могли бы сложиться в антипараллельный тройной β -слой так, что экстрацеллюлярная часть гомотримера образовала бы бочкообразную структуру, подобную структуре первого медь связывающего домена АТФазы Менкеса, подтвержденную данными рентгено-структурного анализа. В дрожжевой N-концевой последовательности отсутствуют подобные участки, склонные к образованию β -структуры.

Внеклеточная петля между ТМД2 и ТМД3 состоит всего из 6 а.о. Оба домена содержат большое количество а.о., способных координировать медь. ТМД1 высоко гидрофобен. Кроме того, ТМД2 и ТМД3 человека и дрожжей – наиболее гомологичные участки, что указывает на их важную функциональную роль при транспорте меди в клетку. В работе предложена модель гомотримера: 6 ТМД образуют в плазматической мембране медь-транспортирующий канал, где ТМД1, хотя и не участвует в транспорте ионов непосредственно, но, возможно, регулирует работу канала.

Анализ способности С-концевого НСН мотива CTR1 позвоночных координировать ион меди был произведен методами молекулярной механики ММ+, полуэмпирическим квантовохимическим расчетом в параметризации ZINDO/1 и *ab Initio* в базе STO-3G*, реализованными в программе HyperChem. Геометрическая оптимизация мотива НСН в присутствии иона меди Cu^+ показывает, что в координации иона принимают участие четыре атома: непротонированные атомы азота имидазольных колец Н190 и Н188, атомы кислорода пептидных связей Н188/С189 и С189/Н190. Таким образом, имидазольные группы гистидинов играют ключевую роль в создании координационного комплекса. Такой способ координации ионов меди принципиально отличается от способа координации ионов меди (Cu^+ , Cu^{2+}) свободными молекулами гистидина, в котором участвуют амидные атомы азота и карбоксильные атомы кислорода, и только один из азотов имидазольных групп [3]. Наши расчеты энергии связи мотива с ионом меди показали, что С189 не участвует в координации иона меди. Это полностью совпадает с данными, продемонстрировавшими, что замена цистеина в позиции 189 на серин не влияет на функциональную активность CTR1 [4].

На основе полученных результатов сделаны следующие выводы: 1. По данным филогенетического анализа различные домены Ctr1 видов проявляют различную степень гомологии. 2. ТМД2 и ТМД3, предположительно образующие трансдуцирующий гидрофильный канал, характеризуются наименьшей скоростью замен в эволюции. 3. В координации иона меди Cu^+ цитозольным С-концом у позвоночных могут участвовать два гистидина, а находящийся между ними цистеин не имеет функционального значения. 4. По данным относительного содержания CTR1-мРНК активность этого гена подвергается тканеспецифической регуляции в течение онтогенеза.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Пучкова Л.В., Платонова Н.А. Усп. Совр. Биол., 2003. 123. с.41-58.
2. Sharp P.A. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2003. 35. p. 288–291.
3. Deschamps P., Kulkarni P., Sarkar B. Inorg Chem., 2004. 43. p. 3338-40.
4. Zhiguang X., Loughlin F., George G., Howlett G., Wedd A., JACS, 2004. 126. p. 3081-3092.