

УДК 577.22, 577.32

СРАВНЕНИЕ РАЗМЕРОВ И СВОЙСТВ НАНОСФЕР КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА *c* С КАРДИОЛИПИНОМ В ОСАДКЕ И В НЕПОЛЯРНОЙ СРЕДЕ

© 2019 Г.К. Владимиров^{2,3*}, В.Е. Ременщиков², А.М. Нестерова^{2,3},
В.В. Волков^{2,4}, Ю.А. Владимиров^{1,2,3,5}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: ura-vladimirov@yandex.ru

² Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, 119333 Москва, Россия

³ Институт регенеративной медицины, Первый московский государственный
медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский университет), 119991 Москва, Россия

⁴ НИЦ Курчатовский институт, 123182 Москва, Россия

⁵ Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения
Российской Федерации, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.02.2019

После доработки 28.03.2019

Принята к публикации 12.04.2019

Апоптоз, главный вид программируемой смерти клеток, играет важную роль в обновлении клеток нашего организма и удалении неполноценных или переродившихся клеток, в том числе и раковых. Одно из самых ранних событий апоптоза – это липидная перекисидация во внутренней митохондриальной мембране, которая катализируется комплексом цитохрома *c* (ЦитС) с митохондриальным фосфолипидом – кардиолипином (КЛ). Ранее было получено, что при смешивании растворов ЦитС и КЛ образуются наносферы комплекса цитохрома *c* с кардиолипином (наносферы Цит-КЛ), имеющие диаметр 11–12 нм, которые состоят из расплавленной молекулы белка и монослоя КЛ. Методами динамического светорассеяния раствора Цит-КЛ в хлороформе и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в осадке Цит-КЛ показано, что в обоих случаях Цит-КЛ образует наносферы диаметром 8 и 11 нм, что соответствует ранее полученным соотношениям липид/белок, соответственно 13–14 и 35–50. Эти результаты показали, что наносферы Цит-КЛ образуются не только при кристаллизации комплекса, но и в гидрофобной среде. Цитохром *c* в комплексе имеет структуру расплавленной глобулы, о чем свидетельствовало появление флуоресценции триптофанового и тирозиновых остатков, отсутствующей в нативном белке из-за фёрстеровского резонансного переноса энергии электронного возбуждения на гем. Известно также, что в комплексе Цит-КЛ разрывается координационная связь гемового железа с серой метионина-80 (исчезает полоса поглощения ~700 нм). Также происходил разрыв железосерной связи в ЦитС при помещении его в водно-метанольный (1/1 по объему) раствор. Эти изменения были обратимыми, что подтверждает вывод об изменении конформации белка в метанольных растворах по типу расплавленной глобулы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, цитохром *c*, кардиолипин, комплекс Цит-КЛ, гидрофобная среда, динамическое светорассеяние, малоугловое рентгеновское рассеяние, расплавленная глобула.

DOI: 10.1134/S0320972519080098

Апоптоз, главный вид программируемой смерти клеток, играет огромную роль в обновлении клеток живого организма и удалении неполноценных или переродившихся клеток, в том числе раковых [1, 2]. В сложной цепи био-

химических реакций, приводящих к аморазрушению клетки и ее захвату макрофагами, одно из самых ранних событий – это липидная перекисидация во внутренней митохондриальной мембране, которая катализируется комплексом

Принятые сокращения: ДСР – динамическое светорассеяние; КЛ – кардиолипин; МУР – малоугловое рассеяние рентгеновских лучей; ТОКЛ – 1,1',2,2' тетраолеилкардиолипин; ЦитС – цитохром *c*; Цит-КЛ – комплекс цитохрома *c* с кардиолипином; >Fe³⁺-S(Мет80) – железосерные связи между железом гема и серой метионина в 80-м положении.

* Адресат для корреспонденции.

гемопротейна цитохрома *c* со специфическим митохондриальным фосфолипидом — кардиолипином (КЛ) [3–5].

Первая гипотеза о структуре такого комплекса была высказана в 1977 г. Brown *tr al.* и заключалась в том, что комплекс представляет собой молекулу цитохрома *c* (ЦитС) и прилегающий участок липидного бислоя мембраны (мембранно-связанный цитохром *c*) [6]. Эту гипотезу в дальнейшем развивали и использовали в ряде работ [7–9], см. также обзоры [10] и [11]. Поскольку при физиологических рН головка КЛ на поверхности липидного бислоя мембран несет два отрицательных заряда ортофосфата, а цитохром *c* имеет четыре избыточных положительных заряда, основной вклад взаимодействия ЦитС с мембраной вносит электростатическое притяжение, но затем к нему добавляются водородные связи и/или гидрофобные взаимодействия, что сопровождается изменением конформации белка и появлением у цитохрома *c* необычного свойства — он становится пероксидазой, которая способна окислять, в том числе и липиды мембран, в состав которых входят полиненасыщенные жирные кислоты (см. обзоры [10], [11] и статьи [9, 12–15]).

Концепция мембранно-связанного цитохрома *c* оказалась, однако, не единственной. В 2011 г. на основании данных, полученных методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУР) осадка, состоящего из комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, была предложена совершенно другая схема строения комплекса, согласно которой молекула цитохрома *c* находится в центре наносферы и окружена монослоем из молекул кардиолипина [16]. В таком комплексе, названном Цит-КЛ, молекула цитохрома *c* находилась в «набухом» состоянии, что проявлялось в увеличении ее диаметра (5,6 нм вместо 4,0 нм) [16] и появлении флуоресценции тирозиновых и триптофанового аминокислотных остатков [17–19], которая в нативном ЦитС потушена гемом, расстояние которого до этих остатков в нативном белке лежит в пределах радиуса Фёрстера. Эта гипотеза объясняет большинство описанных в литературе свойств комплекса в модельных системах, включая соотношение липид/белок [11, 20], пероксидазную и липоксигеназную активность комплекса Цит-КЛ.

Предложенная структура наносферы Цит-КЛ предполагает, что, имея неполярную поверхность, она будет в условиях живой клетки располагаться не в водной среде, а внутри гидрофобной фазы биологических мембран, как это было сформулировано в работе [11]. Однако нет уверенности в том, что структура Цит-КЛ в составе микрокристаллического осадка будет той же са-

мой, что и в гидрофобном (в сущности, углеводородном) окружении, в котором комплекс окажется внутри липидного бислоя мембран. Более адекватной моделью может служить суспензия наносфер Цит-КЛ в углеводородном или ином неполярном растворителе. В предыдущем исследовании такая суспензия Цит-КЛ в хлороформе и гексане была приготовлена [21]. В настоящей работе были усовершенствованы условия получения суспензии и измерены размеры частиц Цит-КЛ методом динамического светорассеяния (ДСР) и состояние цитохрома *c* в этих частицах методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии. Эти данные были сопоставлены с результатами изучения свойств наночастиц Цит-КЛ в осадке методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей на лабораторном приборе и на синхротронной станции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие реактивы: цитохром *c* из сердца лошади («Sigma-Aldrich», США); 1,1',2,2' тетраолеилкардиолипин (ТОКЛ, натриевая соль, «Avanti Polar Lipids», США); KH_2PO_4 («Sigma-Aldrich») для приготовления калий-фосфатного буферного раствора. В качестве растворителей использовали: метанол («Sigma-Aldrich»), хлороформ («Sigma-Aldrich»).

Подготовка проб для малоуглового рентгеновского рассеяния. Исходные растворы ЦитС готовили в 0,05 М калий-фосфатном буферном растворе в концентрации 10–30 мг/мл; тетраолеилкардиолипина — в растворе метанола в 30-кратном избытке по отношению к ЦитС (моль/моль), затем или добавляли в раствор ЦитС (для получения комплекса), или разбавляли калий-фосфатным буферным раствором (контрольный раствор кардиолипина). Общий объем пробы составлял 100 мкл.

Исследование интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния. Измерения интенсивности малоуглового рассеяния проводили на двух установках — автоматическом малоугловом рентгеновском дифрактометре АМУР-К и станции BioSAXS BM29 (7–15 кэВ) синхротрона ESRF («European Synchrotron Radiation Facility», Франция, 2D детектор PILATUS-1M («DECTRIS», Швейцария) интенсивность излучения 10^{12} фотонов/с). Для установки АМУР-К измерения проводили при фиксированной длине волны излучения λ , равной 0,154 нм (CuK_α линия острофокусной трубки ISO-DEBYEFLEX 3003 с медным анодом), и коллимационной системой Кратки, энергетический спектр излучения формировали с помощью монохроматора из пиро-

литического графита, число угловых отсчетов составляло 3300, сечение рентгеновского пучка составляло $0,2 \times 8$ мм при диапазоне углов рассеяния, соответствующем значениям модуля волнового вектора $0,1 < s < 12 \text{ нм}^{-1}$ ($s = 4\pi \sin\theta/\lambda$, 2θ — угол рассеяния). Для установки станции VM29 измерения проводили при фиксированной длине волны излучения λ , равной 0,123 нм, в интервале волновых векторов $0,07 < s < 5,5 \text{ нм}^{-1}$.

Образцы помещали в 1,0 мм стеклянные капилляры со стенками толщиной 0,01 мм, камеры образца вакуумировали с помощью форвакуумного масляного насоса. Время измерений одного образца раствора составляло 3 ч.

Полученные экспериментальные данные интенсивности малоуглового рассеяния были нормированы на интенсивность падающего пучка, после чего вычитали рассеяние от растворителя или фоновое рассеяние.

Обработку и анализ данных проводили с использованием программ SASPLOT и PEAK, входящих в пакеты ATASAS, разработанные в Институте кристаллографии им. А. В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН [22]. Основной результат — кривая малоуглового рассеяния в координатах: вектор рассеяния (абсцисса)/логарифм интенсивности рассеяния (ордината). Вручную выделяли интересующий участок кривой в области выраженного острого пика и для него находили основные параметры, среди которых наиболее интересные для нас — средний размер микрокристаллических структур в нанометрах (Long Range Order) и межплоскостное расстояние (d) в микрокристалле, соответствующее данному пику рассеяния (Bragg spacing).

Приготовление комплекса Цит-КЛ в неполярном окружении было проведено на основе метода Фолча для экстракции липидов [23] в соответствии с протоколом, описанным в работе [24] с небольшими изменениями: 260 мкМ водно-метанольного раствора (4/1 об/об) ЦитС смешивали с 13,5 мМ метанольным раствором ТОКЛ, чтобы получить водно-метанольный (1/1 об/об) раствор комплекса ЦитС с ТОКЛ с молярным отношением 1/30. При этом отношении ТОКЛ находилось в избытке, что облегчило переход комплекса из водно-метанольного раствора в хлороформную фазу. Затем хлороформ добавляли к водно-метанольному раствору ЦитС с ТОКЛ для достижения объемного соотношения хлороформ/вода/метанол, равного 2/1/1. Смесь интенсивно перемешивали в течение 2 мин. После спонтанного разделения фаз нижнюю (хлороформ-метанольную) фракцию, содержащую экстрагированный комплекс Цит-КЛ, осторожно отбирали стеклянной пипеткой Пастера.

Предполагается, что смесь хлороформ-метанол выделяет все липиды [23]. Таким образом, можно предположить, что в верхней фазе нет комплекса ЦитС с ТОКЛ, но между двумя фазами появлялся осадок, к которому должно относиться 40% от исходного количества комплекса ЦитС с ТОКЛ, так как в нижней фазе мы обнаружили 60% от исходного количества комплекса ЦитС с ТОКЛ (измерено по поглощению).

Спектрофотометрический анализ изменений конформации (развертывания) цитохрома *c* в метаноле и комплексе Цит-КЛ проводили на Spесord 200 («Analytik Jena», Германия) с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 1,00 см. Спектры регистрировали в пробе объемом 3000 мкл в диапазоне 650–750 нм.

Измеряли спектры поглощения ЦитС в водных и водно-метанольных растворах с различной объемной долей метанола. Характерный пик железосерных связей в геме ЦитС наблюдали при длине волны 699 нм. Фоновый спектр вычитали из спектра ЦитС в соответствии со следующим уравнением:

$$A_{\text{Fe-S}} = A_{699} - (A_{670} + A_{728})/2.$$

Уравнение основано на том, что длина волны максимума поглощения железосерных связей (699 нм) находится точно посередине интервала между длинами волн 670 нм и 728 нм.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы GraphPad Prism 6 («GraphPad Software»). Все данные приведены в формате среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Статистические различия данных анализировали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование структуры комплекса Цит-КЛ методом малоуглового рассеяния. Ранее в нашей лаборатории были получены данные, свидетельствующие о наличии упорядоченной структуры в растворе, содержащем комплекс Цит-КЛ при молярном отношении 1/35 [16]. При воспроизведении этих результатов методом МУР для межплоскостного расстояния получены наряду с пиками первого семейства, которые были слегка сдвинуты (10,95 и 5,42 нм) по отношению к литературным данным (11,25 и 5,47 нм согласно [16]), также и пики второго семейства (8,26 и

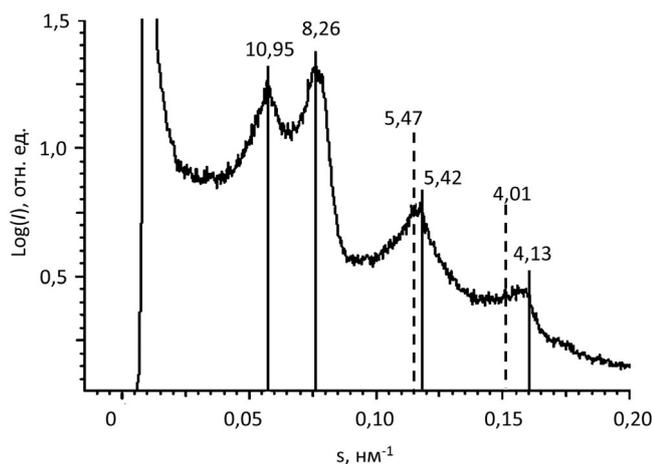


Рис. 1. Кривые интенсивности малоуглового рассеяния комплекса Цит-КЛ в 0,05 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 3,6) при концентрации цитохрома c 1,85 мМ, соотношение ЦитС/ КЛ – 1/30. Цифры в максимумах рассеяния соответствуют межплоскостным расстояниям в микрокристаллах (все значения даны в нм). Пунктирными линиями указаны значения, рассчитанные из данных по пикам первого порядка ($10,95/2 = 5,47$, $8,26/2 = 4,13$). Данные получены на приборе АМУР-К и обработаны с использованием программы SASPLOT

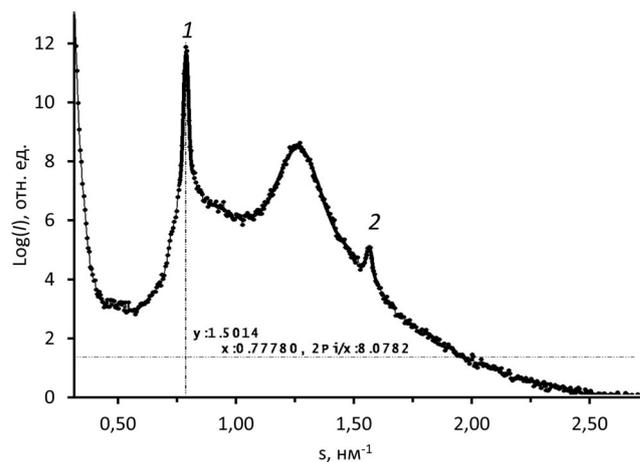


Рис. 2. Дифракционные пики от микрокристалла комплекса Цит-КЛ в 0,05 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7,2), при концентрации цитохрома c 0,1 мМ, соотношение ЦитС/ КЛ – 1/30; где 1 – узкий пик первого порядка (Long range order = 715 нм, $d = 8$ нм); 2 – узкий пик второго порядка (Long range order = 586 нм, $d = 4$ нм). Данные получены на установке ВМ29 синхротрона ESRF и обработаны с использованием программ PEAK и SASPLOT

4,01 нм). Видно, что различия между рассчитанными и данными, полученными из экспериментальных кривых (5,42 и 4,01 нм), составляют 0,05 и 0,12 нм (рис. 1).

Следует отметить, что пики второго семейства воспроизводились не всегда. Было проведено варьирование концентрации ЦитС, рН системы, и были найдены условия воспроизводимости пиков второго семейства. Установлено, что наиболее отчетливо они проявлялись при низких рН и высоких концентрациях ЦитС (при рН 3,6 и концентрации ЦитС 23 мг/мл пик второго семейства был более отчетлив, чем при рН 6,5 и более низких концентрациях ЦитС). Обобщение всех полученных данных по величинам межплоскостных расстояний при рН 3,6 и 6,3 дано в табл. 1. Таким образом, согласно полученным результатам, диаметр комплекса Цит-КЛ может составлять либо 11 нм, либо 8 нм с некоторым разбросом данных.

Для увеличения интенсивности дифракционных пиков была уменьшена концентрации ЦитС в исследуемых растворах с 10 до 1 мг/мл. Такая возможность появилась после того, как стало доступным проведение измерений на станции излучения ВМ29 синхротрона ESRF. Кроме того, существенным явился переход рН исследуемых растворов из нейтральной в кислую. Еще одним весомым дополнением стала модификация раствора кардиолипина в метаноле путем добавки определенного количества исходного калий-фосфатного буферного раствора.

Таким образом, на станции ВМ29 синхротрона ESRF удалось измерить узкие дифракционные пики, а при рН 7,2 наблюдали не один, а два узких пика, соответствующие первому и второму порядкам отражения от плоскостей с $d = 8,07$ и $4,00$ нм (рис. 2). При рН 6,5, 7,2 и 7,4 наблюдали пики одной группы – $8,07 \pm 0,03$ ($n = 5$),

Таблица 1. Сводные данные по межплоскостным расстояниям в опытах, проведенных на установке АМУР-К и обработанных программой SASPLOT. Межплоскостные расстояния приведены в виде «среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, нм», для каждого значения рН $n = 3$

рН	Пики 1-го семейства, 1-го порядка, нм	Пики 1-го семейства, 2-го порядка, нм	Пики 2-го семейства, 1-го порядка, нм	Пики 2-го семейства, 2-го порядка, нм
6,3	$10,91 \pm 0,06$	$5,41 \pm 0,01$	$8,01 \pm 0,01$	$3,99 \pm 0,01$
3,6	$10,95 \pm 0,00$	$5,49 \pm 0,09$	$8,26 \pm 0,00$	$4,00 \pm 0,01$

при рН 7,4 – также пики второй группы – $11,35 \pm 0,21$ ($n = 5$).

Изучение размеров молекул цитохрома *c* и комплекса Цит-КЛ в растворе методом динамического светорассеяния. Прежде всего, была оценена возможность определения методом ДСР размера мелких частиц, по форме близких к сферическим. Обычно измеряются частицы размером более 10 нм, что связано с тем, что длина волны света, рассеяние которого изучается, составляет 633 нм. В работах [25, 26], тем не менее определялись размеры небольших белков. С помощью метода ДСР мы определили диаметр частиц ЦитС в водном растворе (рис. 3, *a*), который составил $3,6 \pm 0,1$ нм, что по значению близко к размерам ЦитС в белковых кристаллах или водных растворах, измеренным с помощью методов дифракции рентгеновского излучения и малоуглового рассеяния [16]. Как и ожидалось, при последовательных измерениях в одной пробе, измеряемый диаметр частиц изменялся незначительно, что говорит о том, что система содержит одинаковые частицы и что точность измерений достаточно высока. Комплекс Цит-КЛ в водно-хлороформ-метанольном растворе был получен из ЦитС и ТОКЛ (в молярном соотношении 1/30) и затем переведен в хлороформ-метанольную фазу, после чего был измерен размер частиц в пробе. Средний диаметр частиц в пробе составил $10,9 \pm 0,9$ нм, что практически точно совпадает со значением в 11 ± 1 нм, полученным для кристаллов Цит-КЛ [16]. Однако в отличие от размеров частиц, полученных при последовательных измерениях в водном растворе ЦитС, в данном случае при

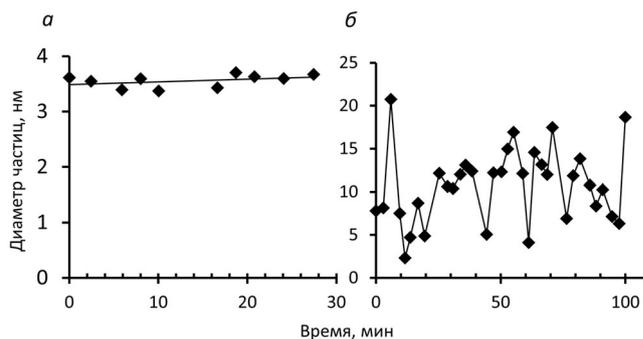


Рис. 3. Флуктуации размера частиц в растворах, измеренные методом динамического рассеяния: *a* – средние значения диаметров частиц в водном растворе ЦитС, полученные при последовательных измерениях в одной пробе; *b* – средние значения диаметров частиц Цит-КЛ, растворенных в хлороформной фазе (см. «Методы исследования»)

последовательных измерениях в одной пробе средние размеры частиц варьировали в достаточно широком диапазоне значений (рис. 3, *b*). Это указывает на то, что в пробе содержались частицы различных размеров. Скорее всего, это объясняется тем, что Цит-КЛ содержал различное количество молекул кардиолипина, прикрепленных к ЦитС.

Были выявлены три наиболее часто встречающиеся диапазона (табл. 2), в которые попадали измеренные средние диаметры частиц: 4,0–5,5 (группа 1); 7,0–8,5 (группа 2) и 11,5–13,0 нм (группа 3). Средние диаметры частиц в группах достоверно различались и составили: группа 1 – $4,69 \pm 0,21$, группа 2 – $7,79 \pm 0,28$, группа 3 – $12,1 \pm 0,17$ нм.

Изучение влияния метанола на комплекс Цит-КЛ методом спектрофотометрии. Ранее было показано, что наличие метанола необходимо для того, чтобы комплекс Цит-КЛ был успешно экстрагирован в неполярную фазу [24]. Поэтому представлялось интересным изучить влияние непосредственно метанола на свойства ЦитС, чтобы понять, какие изменения происходят с цитохромом *c* в процессе приготовления комплекса с кардиолипином еще до добавления в систему последнего. Для этого в нашей работе мы использовали спектрофотометрический метод и изучали поглощение в области 699 нм, где поглощают железосерные связи между железом гема и серой метионина в 80-м положении (см. «Методы исследования»).

Показано, что при изменении концентрации метанола от 0 до 10% поглощение связи $>Fe^{3+}-S(Met80)$ при 699 нм снижается на 10%, а при концентрации 50% происходит почти полное исчезновение полосы поглощения, что наблюдали и ранее в работе нашей группы [24].

Таблица 2. Результаты обработки данных, полученных методом динамического светорассеяния при последовательных измерениях пробы, содержащей хлороформ-метанольный раствор Цит-КЛ

Диаметр частиц, нм	Число измерений	Средний размер частиц, ср. знач. ± стандартная ошибка среднего, нм
0,0–4,0	1	
4,0–5,5	4	4,69 ± 0,21
5,5–7,0	2	
7,0–8,5	5	7,79 ± 0,28
8,5–10,0	1	
10,0–11,5	4	10,51 ± 0,18
11,5–13,0	8	12,1 ± 0,17
13,0–14,5	3	13,36 ± 0,20
14,5–16,0	2	
16,0–17,5	2	
17,5–19,0	1	
20,5–22,0	1	

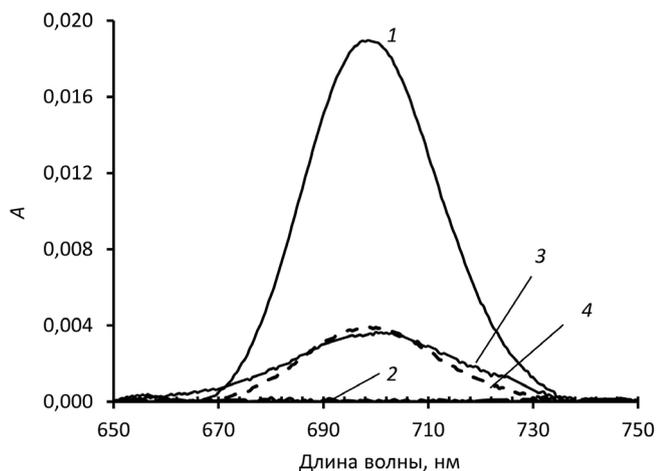


Рис. 4. Спектры поглощения в растворах ЦитС, указывающие на обратимость действия метанола на состояние $>Fe^{3+}-S$ связей (699 нм). Раствор 1 – 50 мкМ ЦитС (0% метанола); раствор 2 – 50 мкМ раствор ЦитС (50% метанола (об./об.)); раствор 3 – раствор 1, разбавленный в пять раз водой ($C_{кон}$ (ЦитС) = 10 мкМ, 10% метанола (об./об.)); раствор 4 (пунктирная линия) – 10 мкМ раствор ЦитС (0% метанола)

Далее было изучено, является ли разрушение железосерной связи метанолом обратимым или необратимым процессом. Полученные данные говорят о том, что в случае раствора ЦитС с объемной долей метанола, равной 50%, этот процесс является обратимым – при 5-кратном разбавлении такого раствора дистиллированной водой (что сопровождается снижением объемной доли метанола до 10%) при 699 нм наблюдалось поглощение, составляющее 92% от поглощения водного раствора ЦитС аналогичной концентрации (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В предыдущих работах нами было показано, что при смешивании ЦитС, находящегося в водном растворе, с раствором митохондриального фосфолипида кардиолипина образуется комплекс Цит-КЛ с совершенно определенным соотношением липид/белок [11]. При изучении микрокристаллического осадка, выпадающего из концентрированных водных растворов комплекса Цит-КЛ, были обнаружены частицы с диаметром ~ 11 нм [16]. В данной работе при низких значениях pH в микрокристаллическом осадке наряду с частицами диаметром $11,35 \pm 0,21$ также обнаружены и частицы с диаметром $8,07 \pm 0,03$ нм. Кроме того, с помощью метода ДСР впервые определили размер частиц в растворе комплекса цитохром *c*/кардиолипин в

гидрофобном растворителе (табл. 2). Были выявлены частицы с диаметрами $12,1 \pm 0,17$ нм и $7,79 \pm 0,28$ нм, количество которых в растворе значительно превышало количество частиц других размеров.

Таким образом, нами были получены данные, которые указывают на существование одинаковых частиц в составе осадка Цит-КЛ и в растворе Цит-КЛ в гидрофобном растворителе. В обоих случаях частицы могут иметь диаметр ~ 11 или 8 нм. Различия в диаметре этих двух видов наносфер соответствуют разнице в соотношении липид/белок (как описано в работе [21]), которое при нейтральных pH составляет, по разным данным, от 35/1 [16] до 59/1, а в кислой среде (pH < 5) – от 13/1 до 14/1 [27].

Естественно, возникает вопрос, соответствует ли полученное в данной работе соотношение липид/белок соотношению в комплексах Цит-КЛ в мембранах митохондрий или других клеточных мембранах? К сожалению, существующие методы не позволяют отделить эти комплексы от основной массы цитохрома *c* и кардиолипина в митохондриальных мембранах. Но маловероятно, что молекулы цитохрома *c* и кардиолипина, которые в водной и неполярной средах образуют одну и ту же структуру – наносфера Цит-КЛ, с одинаковым размером и соотношением липид/белок, по какой-то причине не образуют эту структуру в живой клетке, а образуют нечто совершенно иное. При этом как в модельных системах, так, вероятно, и в клеточных мембранах, соотношение липид/белок зависит от окружающих условий, в том числе, от pH. Полученные размеры частиц соответствуют структуре наносферы, в которой глобула частично расплавленного цитохрома *c* (диаметр 5,6 нм) окружена жидким гидрофобным слоем углеводородных цепей молекул кардиолипина. В пользу того, что ЦитС в комплексе Цит-КЛ, помещенном в гидрофобную среду, имеет структуру расплавленной глобулы, говорят также появление флуоресценции триптофанового и тирозиновых остатков, отсутствующей в нативном белке из-за фёрстеровского резонансного переноса энергии электронного возбуждения на гем, и разрыв координационной связи гемового железа с серой метионина-80 (исчезновение полосы поглощения ~ 700 нм) [21]. Согласно работе [28], в которой изучали мутантные формы ЦитС, нативная структура железосерной связи поддерживается аминокислотными остатками Lys72, Lys73 и Lys79. При этом Lys72 и Lys79 влияют на связывание ЦитС с КЛ, а наличие Lys73 необходимо для проявления комплексом Цит-КЛ пероксидазной активности [28]. Судя по всему, разрыв железосерной связи между гемом и Met80 затра-

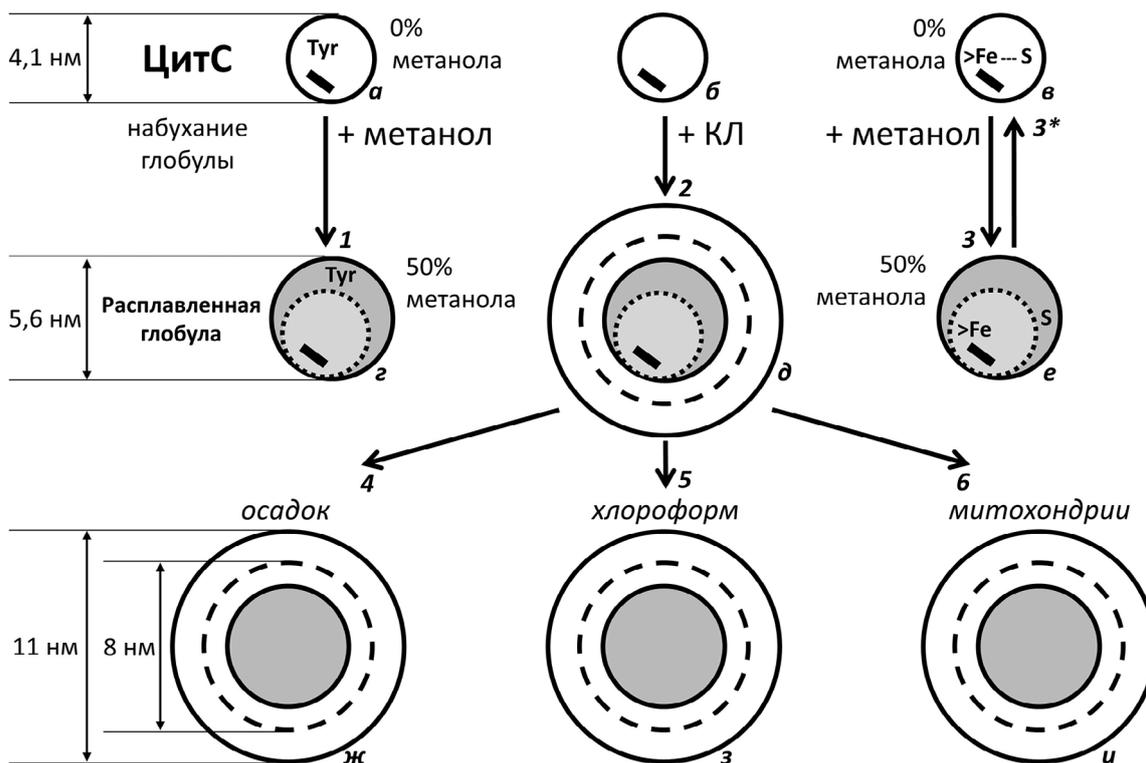


Рис. 5. Схема строения частиц комплекса Цит-КЛ и изменения конформации ЦитС при их формировании. Размеры частиц приведены в масштабе. Частицы: *верхний ряд* – схема строения глобулы ЦитС, находящегося в нативном состоянии (*a* – расположение остатка Туг и гема (черный прямоугольник), *б* – глобула до образования частицы Цит-КЛ, *в* – расположение атома гемового железа >Fe относительно атома серы Met80, координационная железосерная связь); *средний ряд* – строение расплавленной глобулы ЦитС (*г* – полученной после воздействия метанолом, в результате чего диаметр глобулы увеличился, а остатки Туг удалились от гема, *д* – в составе частицы Цит-КЛ, полученной после добавления КЛ к ЦитС, *е* – полученной после воздействия метанолом, в результате чего диаметр глобулы увеличился, а атом серы Met80 удалился от гема и координационная железосерная связь была разрушена); *нижний ряд* – частицы Цит-КЛ, выпавшие в осадок из водной среды (*ж*), экстрагированные в неполярный растворитель (*з*) и образовавшиеся в мембранах митохондрий (*и*) идентичны по строению тем, что образовывались в водном растворе (*д*). Стрелки: *1* – отдаление остатков Туг и Тпр от гема, приводящее к появлению характерной флуоресценции в метанольном растворе ЦитС; *2* – образование частиц Цит-КЛ (*д*) при добавлении к водному раствору ЦитС метанольного раствора КЛ (светло-серый круг – глобула ЦитС в нативном состоянии, темно-серый – расплавленная глобула ЦитС, пунктирный контур – диаметр частицы Цит-КЛ с соотношением липид/белок, равном приблизительно 13/1, сплошной черный контур – диаметр частицы Цит-КЛ с соотношением липид/белок, равном приблизительно 60/1); *3* – отдаление остатка Met80 от гема и разрыв координационной связи между атомом гемового железа >Fe и атомом серы Met80, приводящий к уменьшению поглощения при 699 нм в метанольном растворе ЦитС, *3** – возвращение глобулы ЦитС из расплавленного состояния в исходное, как следует из данных на рис. 4; *4, 5 и 6* – переход частиц Цит-КЛ из водного раствора в кристаллический осадок, неполярный растворитель и мембрану митохондрий, соответственно

гивает и эти аминокислотные остатки, тем самым влияя на образование комплекса Цит-КЛ и на проявление им свойств пероксидазы. В работе [29] взаимодействие ЦитС с КЛ приводило к повышению проницаемости липидных везикул, авторы также отмечают разрыв железосерных связей.

Вся совокупность полученных в работе результатов, а также данные литературы позволили предложить гипотетическую схему образования и строения частиц Цит-КЛ, находящихся в различных условиях (рис.5). При этом структура Цит-КЛ в кристаллическом осадке и неполяр-

ном растворителе подтверждается экспериментальными данными, а структура Цит-КЛ, включенного в липидный слой мембраны митохондрий, в настоящее время остаётся предположительной. На схеме видно, что рассмотренные в данной статье частицы относятся к трем типам структур: 1) глобула ЦитС в нативном состоянии (верхний ряд), 2) ЦитС в состоянии «расплавленной глобулы» (структуры *г* и *е*) и 3) наносфера Цит-КЛ (структуры *д, ж, з, и*). При этом ЦитС в составе наносферы Цит-КЛ находится, судя по всему, в том же состоянии «расплавленной глобулы». Наносферы Цит-КЛ образуются в двух

формах с различными размерами — с диаметром ~8 нм и ~11 нм. Это связано с различием в толщине липидного слоя, окружающего расплавленную глобулу ЦитС, которая, в свою очередь, зависит от содержания липида в составе наносферы (~13 молекул КЛ при диаметре наносферы, равном 8 нм, и ~60 — при диаметре 11 нм). Образовавшаяся в водном растворе частица (θ) может переходить в осадок (стрелка 4) или быть переведена в неполярный растворитель (стрелка 5). При этом данные о частицах в микрокристаллическом осадке Цит-КЛ и о частицах Цит-КЛ в неполярных растворителях указывают на то, что в обоих случаях частицы имеют одинаковые размеры, а также, вероятно, и одинаковое строение. В пользу последнего предположения говорят данные измерения флуоресценции тирозиновых и триптофановых остатков цитохрома и поглощения цитохрома при длине волны 699 нм [21]. Ранее нами было сделано предположение, что Цит-КЛ, будучи гидрофобной наносферой, встраивается в липидный бислой внутренней мембраны митохондрий и там осуществляет катализ перекисидации липидов, находясь в гидрофобном окружении (стрелка 6) [11].

Следует отметить, что влияние рН на свойства комплекса Цит-КЛ отмечали и другие авторы. Например, в работе [30] показано, что только при значениях рН выше 6 (что, по нашим данным, полученным с помощью МУР, соответствует наносферам с диаметром $11,35 \pm 0,21$, но не $8,07 \pm 0,03$ нм) наблюдалось образование синглетного кислорода при работе комплекса Цит-КЛ, окисляющего кардиолипин, что свидетельствует о различиях в ферментативных свойствах Цит-КЛ в зависимости от соотношения липид/белок, которое, в свою очередь, зависит от рН.

Согласно полученным в нашей лаборатории результатам, для успешного получения раствора

комплекса цитохром *c*/кардиолипин в хлороформе необходимо присутствие метанола в водной фазе не менее 50% [24].

Таким образом, показано, что разрушение железосерных связей в ЦитС, помещенном в среду, содержащую метанол, является обратимым, что говорит об изменении конформации цитохрома *c* по типу расплавленной глобулы. По-видимому, интактный ЦитС в водном растворе неспособен «вытягивать» молекулы кардиолипина из липидного бислоя, например, из сформировавшихся липосом, но при плавлении глобулы гемопротейна он приобретает большее сродство к кардиолипину и легче образует с ним комплекс. Выяснение механизма процессов формирования комплекса Цит-КЛ в митохондриях нуждается в дальнейших исследованиях.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 17-74-10248), а также с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФНИЦ Кристаллография и фотоника РАН и при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ Кристаллография и фотоника РАН в части программного обеспечения анализа данных малоуглового рассеяния, а также проекта ESRF BAG MX-2079 в части измерений малоуглового рассеяния на станции BioSAXS VM29.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B., and Bao, J.K. (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Prolif.*, **45**, 487–498, doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- Saleem, M., Asif, J., Asif, M., and Saleem, U. (2018) Amygdalin, from apricot kernels, induces apoptosis and causes cell cycle arrest in cancer cells: an updated review, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **18**, 1650–1655, doi: 10.2174/1871520618666180105161136.
- Kagan, V.E., Borisenko, G.G., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Jiang, J., Potapovich, A.I., Kini, V., Amoscato, A.A., and Fujii, Y. (2004) Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome *c* with cardiolipin and phosphatidylserine, *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 1963–1985, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.016.
- Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., and Kini, V. (2005) Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nature Chem. Biol.*, **1**, 223–232, doi: 10.1038/nchembio727.
- Kagan, V.E., Bayir, A., Bayir, H., Stoyanovsky, D., Borisenko, G.G., Tyurina, Y.Y., Wipf, P., Atkinson, J., Greenberger, J.S., Chapkin, R.S., and Belikova, N.A. (2009) Mitochondria-targeted disruptors and inhibitors of cytochrome *c*/cardiolipin peroxidase complexes: a new

- strategy in anti-apoptotic drug discovery, *Mol. Nutr. Food Res.*, **53**, 104–114, doi: 10.1002/mnfr.200700402.
6. Brown, L.R., and Wuthrich, K. (1977) NMR and ESR studies of the interactions of cytochrome *c* with mixed cardiolipin-phosphatidylcholine vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **468**, 389–410, doi: 10.1016/0005-2736(77)90290-5.
 7. Sinibaldi, F., Howes, B.D., Piro, M.C., Polticelli, F., Bombelli, C., Ferri, T., Coletta, M., Smulevich, G., and Santucci, R. (2010) Extended cardiolipin anchorage to cytochrome *c*: a model for protein-mitochondrial membrane binding, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **15**, 689–700, doi: 10.1007/s00775-010-0636-z.
 8. Mandal, A., Hoop, C.L., DeLucia, M., Kodali, R., Kagan, V.E., Ahn, J., and van der Wel, P.C. (2015) Structural changes and proapoptotic peroxidase activity of cardiolipin-bound mitochondrial cytochrome *c*, *Biophys. J.*, **109**, 1873–1884, doi: 10.1016/j.bpj.2015.09.016.
 9. Hanske, J., Toffey, JR., Morenz, A.M., Bonilla, A.J., Schiavoni, K.H., and Pletneva, E.V. (2012) Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome *c*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 125–130, doi: 10.1073/pnas.1112312108.
 10. 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., and Borisenko, G. (2009) Cytochrome *c*/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death, *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 1439–1453, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004.
 11. Vladimirov, Y.A., Proskurnina, E.V., and Alekseev, A.V. (2013) Molecular mechanisms of apoptosis. Structure of cytochrome *c*–cardiolipin complex, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1086–1097, doi: 10.1134/S0006297913100027.
 12. Jemmerson, R., Liu, J., Hausauer, D., Lam, K.P., Mondino, A., and Nelson, R.D. (1999) A conformational change in cytochrome *c* of apoptotic and necrotic cells is detected by monoclonal antibody binding and mimicked by association of the native antigen with synthetic phospholipid vesicles, *Biochemistry*, **38**, 3599–3609, doi: 10.1021/bi9809268.
 13. Tuominen, E.K., Zhu, K., Wallace, C.J., Clark-Lewis, I., Craig, D.B., Rytomaa, M., and Kinnunen, P.K. (2001) ATP induces a conformational change in lipid-bound cytochrome *c*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 19356–19362, doi: 10.1074/jbc.M100853200.
 14. Balakrishnan, G., Hu, Y., Oyerinde, O.F., Su, J., Groves, J.T., and Spiro, T.G. (2007) A conformational switch to beta-sheet structure in cytochrome *c* leads to heme exposure. Implications for cardiolipin peroxidation and apoptosis, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 504–505, doi: 10.1021/ja0678727.
 15. Hong, Y., Muenzner, J., Grimm, S.K., and Pletneva, E.V. (2012) Origin of the conformational heterogeneity of cardiolipin-bound cytochrome *c*, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 18713–18723, doi: 10.1021/ja307426k.
 16. Vladimirov, Y.A., Nol', Y.T., and Volkov, V.V. (2011) Protein–lipid nanoparticles that determine whether cells will live or die, *Crystallogr. Rep.*, **56**, 553–559, doi: 10.1134/S1063774511040250.
 17. Kapralov, A.A., Yanamala, N., Tyurina, Y.Y., Castro, L., Samhan-Arias, A., Vladimirov, Y.A., Maeda, A., Weitz, A.A., Peterson, J., Mylnikov, D., Demicheli, V., Tortora, V., Klein-Seetharaman, J., Radi, R., and Kagan, V.E. (2011) Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome *c*/cardiolipin peroxidase complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 2147–2155, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.04.009.
 18. Belikova, N.A., Vladimirov, Y.A., Osipov, A.N., Kapralov, A.A., Tyurin, V.A., Potapovich, M.V., Basova, L.V., Peterson, J., Kurnikov, I.V., and Kagan, V.E. (2006) Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome *c* bound to cardiolipin-containing membranes, *Biochemistry*, **45**, 4998–5009, doi: 10.1021/bi0525573.
 19. Kapralov, A.A., Kurnikov, I.V., Vlasova, I.I., Belikova, N.A., Tyurin, V.A., Basova, L.V., Zhao, Q., Tyurina, Y.Y., Jiang, J., Bayir, H., Vladimirov, Y.A., and Kagan, V.E. (2007) The hierarchy of structural transitions induced in cytochrome *c* by anionic phospholipids determines its peroxidase activation and selective peroxidation during apoptosis in cells, *Biochemistry*, **46**, 14232–14244, doi: 10.1021/bi701237b.
 20. Proskurnina, E.V., Alekseev, A.V., Demin, E.M., Izmailov, D.Y., and Vladimirov, Y.A. (2013) Cyt-CL complex: Peroxidase activity and role in lipid peroxidation, *FEBS J.*, **280**, 264.
 21. Vladimirov, G.K., Vikulina, A.S., Volodkin, D., and Vladimirov, Y.A. (2018) Structure of the complex of cytochrome *c* with cardiolipin in non-polar environment, *Chem. Phys. Lipids*, **214**, 35–45, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2018.05.007.
 22. Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., and Svergun, D.I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **36**, 1277–1282, doi: 10.1107/S002188980301277923.
 23. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497–509.
 24. Vikulina, A.S., Alekseev, A.V., Proskurnina, E.V., and Vladimirov, Y.A. (2015) The complex of cytochrome *c* with cardiolipin in non-polar environment, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1298–1302, doi: 10.1134/S0006297915100107.
 25. Ali, S., Farooqi, H., Prasad, R., Naime, M., Routray, I., Yadav, S., and Ahmad, F. (2010) Boron stabilizes peroxide mediated changes in the structure of heme proteins, *Int. J. Biol. Macromol.*, **47**, 109–115, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.05.013.
 26. Kobayashi, H., Nagao, S., and Hirota, S. (2016) Characterization of the cytochrome *c* membrane-binding site using cardiolipin-containing bicelles with NMR, *Angewandte Chem. Intern. Edition*, **55**, 14019–14022, doi: 10.1002/anie.201607419.
 27. Проскурнина Е.В., Проскурнин М.А., Алексеев А.В., Галимова В.Р., Владимиров Ю.А. (2018) Определение состава комплекса цитохрома *c* с кардиолипином при помощи спектродетекции и термолинзовой спектродетекции, *Технологии живых систем*, **15**, 27–33.
 28. Sinibaldi, F., Howes, B.D., Droghetti, E., Polticelli, F., Piro, M.C., Di Pierro, D., Fiorucci, L., Coletta, M., Smulevich, G., and Santucci, R. (2013) Role of lysines in cytochrome *c*-cardiolipin interaction, *Biochemistry*, **52**, 4578–4588, doi: 10.1021/bi400324c.
 29. Kitt, J.P., Bryce, D.A., Minter, S.D., and Harris, J.M. (2017) Raman spectroscopy reveals selective interactions of cytochrome *c* with cardiolipin that correlate with membrane permeability, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 3851–3860, doi: 10.1021/jacs.7b00238.
 30. Miyamoto, S., Nantes, I.L., Faria, P.A., Cunha, D., Ronsein, G.E., Medeiros, M.H., and Di Mascio, P. (2012) Cytochrome *c*-promoted cardiolipin oxidation generates singlet molecular oxygen, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11**, 1536–1546, doi: 10.1039/c2pp25119a.

COMPARISON OF DIMENSIONS AND PROPERTIES OF NANOSPHERES OF THE CYTOCHROME *c* COMPLEX WITH CARDIOLIPIN IN SEDIMENT AND IN NON- POLAR MEDIUM

G. K. Vladimirov^{1,2,3*}, V. E. Remenshchikov², A. M. Nesterova^{2,3},
V. V. Volkov^{2,4}, and Yu. A. Vladimirov^{1,2,3,5}

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 119991 Moscow, Russia; E-mail: ura-vladimirov@yandex.ru*

² *Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia*

³ *Institute for Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Public Health of Russian Federation, 119991 Moscow, Russia*

⁴ *National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia*

⁵ *Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Public Health of Russian Federation, 117997 Moscow, Russia*

Received February 20, 2019

Revised March 28, 2019

Accepted April 12, 2019

Apoptosis, the major type of programmable cell death, plays a critical role in the renewal of cells in our body and in the elimination of defective or degenerated cells, including cancer cells. One of the earliest events of apoptosis involves lipid peroxidation in the inner mitochondrial membrane, which is catalyzed by a complex of cytochrome *c* (CytC) with mitochondrial phospholipid – cardiolipin (CL). According to our data obtained earlier, when mixing solutions of CytC and CL, nanospheres of the CytC complex with CL (Cyt–CL) with a diameter of 11–12 nm are formed, which consist of a molten protein molecule and a CL monolayer. In this study, using the dynamic light scattering of the Cyt–CL solution in chloroform and the small-angle X-ray scattering in the Cyt–CL sediment, it was shown that in both cases the Cyt–CL forms nanospheres with 8- and 11-nm diameters, which corresponds to the previously obtained lipid/protein ratio, respectively, 13 : 14 and 35 : 50. These data show that the Cyt–CL nanospheres are formed not only during the crystallization of the complex but also in the hydrophobic environment. CytC in the complex has a molten globule structure, as evidenced by the appearance of the tryptophan and tyrosine fluorescence, which is absent in the native protein due to the Förster resonance transfer of the electron excitation energy to heme. Under these conditions, the coordination bond between the heme iron and sulfur of methionine-80 is broken in the Cyt–CL complex (the absorption band about 700 nm vanishes). When methanol is added to the aqueous CytC solution (water–methanol, 1 : 1 v/v), this iron–sulfur bond is broken also. The latter changes were reversible, which supports the conclusion that changes of CytC conformation in methanol-containing solutions correspond to the molten globule type.

Keywords: apoptosis, cytochrome *c*, cardiolipin, Cyt–CL complex, hydrophobic environment, dynamic light scattering, small-angle X-ray scattering, molten globule