



ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНОГО ЦИТОХРОМА *c* С ЛИПОСОМАМИ, МИТОХОНДРИЯМИ И МИТОПЛАСТАМИ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2020 г. И. Д. Гусев*, А. М. Фирсов**, Р. В. Черткова*, ***, #, Е. А. Котова**, Д. А. Долгих*, ****, М. П. Кирпичников*, ****, Ю. Н. Антоненко**, #

*ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/40

***НИУ Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Россия, 117312 Москва, ул. Вавилова, 7

****МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 10.05.2020 г.

Принята к публикации 12.05.2020 г.

Исследовано взаимодействие меченого флуоресцентным красителем сульфацианином-3 Cys-замещенного (G56C) цитохрома *c* (фЦит) с искусственными и природными липидными мембранами методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Показано, что по сравнению с митохондриями митопласты характеризуются большим количеством сайтов связывания фЦит, при этом обладающих меньшим сродством к этому белку. Показано также, что сродство фЦит к кардиолипину-содержащим липосомам зависит от содержания кардиолипина в липосомах и снижается при повышении ионной силы раствора. Высокая константа связывания фЦит с митохондриями может объясняться наличием на поверхности внешней мембраны специфических сайтов связывания этого белка, отличных от сайтов, характерных для митопластов и липосом. Этот вывод подтверждается тем наблюдением, что фЦит вытесняется с поверхности митохондрий немеченым мутантным вариантом K8T эффективнее, чем цитохромом *c* дикого типа, тогда как в случае митопластов и липосом цитохром *c* вытесняет фЦит эффективнее, чем вариант K8T.

Ключевые слова: цитохром *c*, кардиолипин, митохондрии, митопласты, флуоресцентная корреляционная спектроскопия

DOI: 10.31857/S0132342320060081

ВВЕДЕНИЕ

Гемсодержащий белок цитохром *c*, один из важнейших компонентов электрон-транспортной или дыхательной цепи (ЭТЦ) митохондрий, переносит электроны от убихинол-цитохром *c*-оксидоредуктазы (комплекс III) к цитохром *c*-оксидазе (комплекс IV). Наряду с участием в электронном транспорте, другой его важнейшей функцией яв-

ляется инициация клеточного апоптоза путем участия в формировании апоптосомы [1]. В настоящий момент значительные усилия направлены на исследование цитохрома *c* в качестве триггера и посредника апоптотических событий.

Программируемая клеточная гибель, или апоптоз, имеет исключительную важность для нормальной жизнедеятельности организма в целом. Во время активации каскада событий, приводящих к апоптозу клетки, цитохром *c* транслицируется через внешнюю мембрану митохондрии в цитозоль, где он либо усиливает внешний апоптотический сигнал, либо инициирует активацию каспазного каскада по собственному (цитохром *c*-зависимому) апоптотическому пути. Ключевым событием в цитохром *c*-зависимом апоптотическом пути является пермеаблизация внешней митохондриальной мембраны, в результате чего в

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ДМСО – диметилсульфоксид; КЛ – кардиолипин; ФКС – флуоресцентная корреляционная спектроскопия; ФХ – яичный фосфатидилхолин; фЦит – флуоресцентно-меченый цитохром *c*; ЭГТА – этиленгликольтетрауксусная кислота; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; WT – wild type, дикий тип цитохрома *c*; 4Mut – мутантный вариант цитохрома *c* с заменами K72E/E69K/K86E/K87E.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-28-88; эл. почта: cherita@inbox.ru; antonen@belozersky.msu.ru).

цитозоль выходят различные апоптогенные факторы, в том числе и цитохром *c*. В связи с этим большой интерес вызывает изучение механизмов взаимодействия цитохрома *c* с липидными мембранами. Взаимодействие цитохрома *c* с кардиолипином — липидом, входящим в состав внутренней мембраны митохондрии, — значительно усиливает его пероксидазную активность [2, 3]. Предполагается, что посредством запуска перекисного окисления мембранных липидов именно пероксидазная активность способствует транслокации цитохрома *c* через внешнюю мембрану митохондрий [4]. Следует отметить также, что кардиолипин, сам по себе [5] или в комплексе с цитохром *c*-оксидазой [6], формирует мембранный сайт связывания цитохрома *c* на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий и в условиях гомеостаза.

Известно, что связывание цитохрома *c* с кардиолипином на первых стадиях обратимо, зависит от pH [5] и приводит к изменению третичной и вторичной структуры молекулы цитохрома *c* [7]. Фактором, влияющим на стабильность комплекса цитохром *c*/кардиолипин, является окисление кардиолипина, так как цитохром *c* имеет пониженное сродство к окисленному липиду [8]. Вместе с тем, механизмы взаимодействия цитохрома *c* с кардиолипином в митохондриальной мембране остаются не до конца изученными и привлекают пристальное внимание исследователей [9–14].

При помощи флуоресцентно-меченого варианта лошадиного цитохрома *c* методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) исследовано взаимодействие экзогенного цитохрома *c* с природными (митохондрии и митопласты) и искусственными (кардиолипин-содержащими липосомами) липидными мембранами, а также влияние на этот процесс ионной силы и содержания кардиолипина в липидной мембране.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение флуоресцентно-меченого цитохрома *c*. В качестве стратегии мечения цитохрома *c* нами была выбрана конъюгация молекул белка и малеимидного производного сульфоцианина 3 через остаток Cys, введенный в цитохром *c* с помощью сайт-направленного мутагенеза. Реакция тиолов с малеимидами широко используется для био-конъюгации и мечения биомолекул, в том числе белков и пептидов [15]; данную реакцию можно проводить в водной среде, что существенно облегчает процедуру.

Введение в молекулу цитохрома *c* тиоловой группы может быть осуществлено путем единичной замены в ходе мутагенеза поверхностного или концевой аминокислотного остатка на остаток Cys. Очевидно, что остаток, заменяемый на оста-

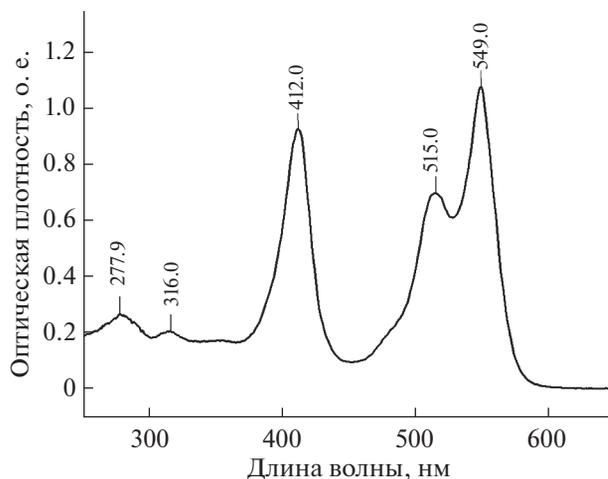


Рис. 1. Спектр флуоресцентно-меченого цитохрома *c* с заменой G56C. Поглощение при 412 нм соответствует максимуму поглощения цитохрома *c*, при 549 нм — максимуму поглощения сульфоцианина.

ток Cys, не должен быть вовлечен во взаимодействие с кардиолипином и белками-партнерами цитохрома *c*, а также быть значимым для структурно-функциональной целостности белка.

Известно, что на поверхности цитохрома *c* имеется три участка связывания с кардиолипином: сайт связывания А, состоящий из остатков K72, K73, K86, K87 и R91 [16]; сайт связывания L, состоящий из остатков K22, K25, K27, а также H33, который принимает участие в связывании цитохрома *c* с кардиолипином при pH < 7.0; сайт связывания С, содержащий остатки N52, H26 и R44 [17]. Кроме того, известны участки связывания цитохрома *c* с цитохром *c*-оксидазой (а.к.о. K8, K13, K72, K86, и K87) [18], с убихинол-цитохром *c*-оксидоредуктазой (а.к.о. K7, K8, K13, K39, K72, K79, K86, K87) [19] и цитохром *c*-пероксидазой (а.к.о. K13, K27, K72, K86, K87, Q12 и Q16) [20, 21].

Для введения флуоресцентной метки в молекулу цитохрома *c* нами был сконструирован и получен мутантный вариант цитохрома *c* с заменой остатка G56 на остаток Cys, так как функциональная группа остатка G56 расположена на поверхности белковой глобулы и не входит ни в один из известных сайтов связывания белка.

Реакцию мечения, а также очистку и анализ продуктов реакции проводили согласно методике, описанной в экспериментальной части. Фракции, в которых соотношение пиков цитохрома *c* и сульфоцианина было сопоставимым (рис. 1), объединяли и обессоливали на этой же колонке, уравновешенной бессолевым буфером, после чего анализировали спектрофотометрически.

Исследование взаимодействия флуоресцентно-меченого цитохрома *c* с липидными мембранами осуществляли при помощи ФКС. Этот метод осно-

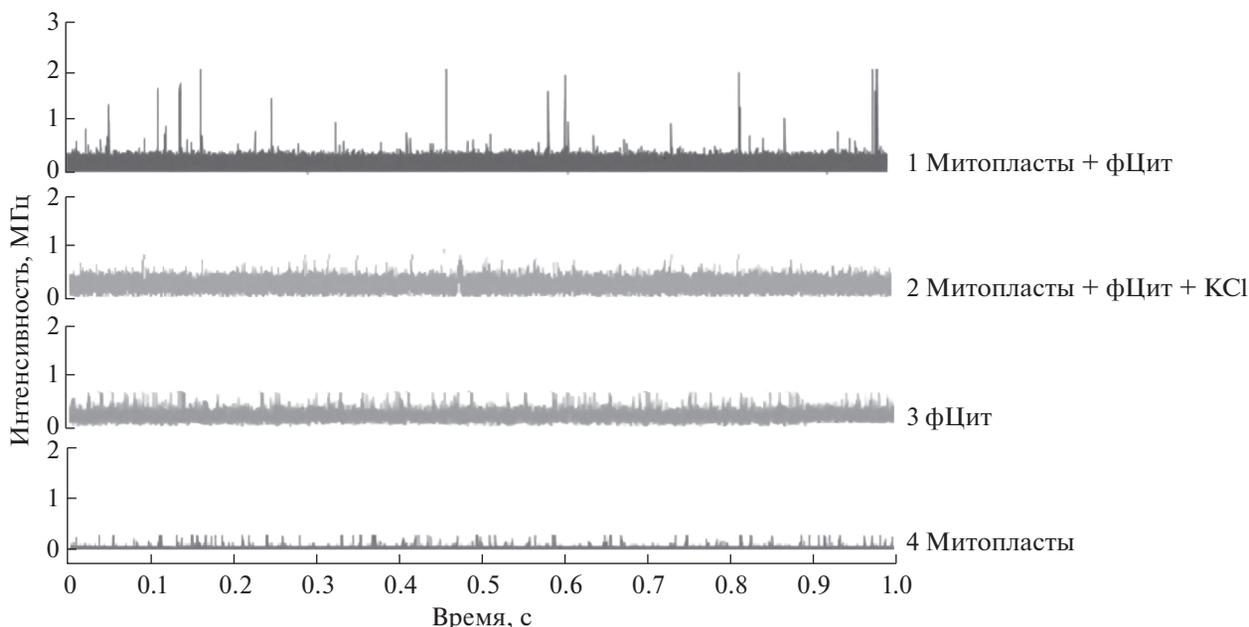


Рис. 2. Временные зависимости интенсивности пиков флуоресценции суспензии митопластов (4), раствора меченого цитохрома *c* (3), суспензии митопластов в присутствии меченого цитохрома *c* (1), суспензии митопластов в присутствии меченого цитохрома *c* и 50 мМ KCl (2). Измерения проводили в сахарозном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4). Конечная концентрация митопластов составила 0.1 мг/мл, концентрация меченого цитохрома *c* 0.26 мкМ, время сбора данных составляло 30 с.

ван на регистрации флуктуаций флуоресценции отдельных частиц, возникающих в результате броуновского движения через освещенный лазером малый объем пространства (конфокальный объем). Традиционно ФКС используется для исследования процессов, связанных с изменением подвижности молекул и комплексов: агрегации частиц, взаимодействия флуоресцирующих молекул с надмолекулярными комплексами, липидными везикулами, при этом диапазон размеров изучаемых объектов очень широк – от молекул красителей до частиц с размерами, составляющими сотни нанометров [22].

В ходе работы аналитическим сигналом для идентификации связывания являлось изменение количества пиков, регистрируемых в конфокальном объеме. Пики сигнала флуоресценции связаны с перемещением флуоресцирующих частиц через измеряемый объем при перемешивании суспензии частиц. Это могут быть как свободные молекулы меченого белка, так и намного ярче светящиеся частицы мембран со связавшимися с ними несколькими молекулами белка. На рис. 2 представлены типичные записи сигнала для суспензии митопластов и раствора меченого цитохрома *c* (фЦит). Связывание фЦит с митопластами характеризовалось большим количеством пиков с высокой интенсивностью флуоресценции (1), тогда как в растворе несвязанного флуоресцентно-меченого цитохрома *c* (3) регистрировались фо-

новые пики небольшой интенсивности. В суспензии митопластов в отсутствие меченого белка практически отсутствовали характерные для комплексов пики (4), так же, как и в случае дестабилизированного повышением ионной силы комплекса фЦит/митопласты (2).

На рис. 3 представлено типичное распределение пиков флуоресценции по их интенсивности после обработки экспериментальных данных в программе Saligat. Для идентификации связывания нами был выбран феноменологический порог интенсивности в 1.4 МГц. Использование большей величины порога слишком сильно обедняло статистику по пикам, в то время как меньшая величина порога была слишком близка к шуму усилителя, что вносило искажения в регистрируемую статистику.

Роль кардиолипина в связывании цитохрома *c* с липосомами. На рис. 4 представлена зависимость эффективности связывания меченого цитохрома *c* с липосомами, содержащими различное количество кардиолипина (от 0 до 100%). Анализируя полученные результаты, можно сделать заключение, что эффективность связывания фЦит с липидной мембраной возрастает при увеличении содержания в ней кардиолипина и это, по-видимому, связано с тем, что количество сайтов связывания цитохрома *c* на поверхности липосом напрямую зависит от процентного содержания в них кардиолипина и достигает максимального зна-

чения при взаимодействии с липосомами, состоящими на 100% из кардиолипина.

Определение кажущихся констант вытеснения цитохрома *c* с различными мембранами. Для определения кажущихся констант вытеснения цитохрома *c* из комплекса с липидными мембранами был использован метод вытеснения фЦит из комплекса с мембранами при помощи немеченого цитохрома *c* с подсчетом количества пиков флуоресценции с интенсивностью 1.4 МГц (рис. 5). Метод вытеснения основывается на понижении концентрации флуоресцентно-меченого компонента комплекса путем замещения немеченым белком при повышении концентрации последнего в растворе. При этом наблюдаемое уменьшение количества пиков было вызвано вытеснением флуоресцентно-меченого цитохрома *c* из комплекса с исследуемой липидной мембраной по мере увеличения в среде концентрации немеченого цитохрома *c* от 10 нМ до 100 мкМ. Количество пиков подсчитывали при помощи программы Saligat, кривые вытеснения анализировали при помощи программы GraphPrism 8 на основании уравнения $y = (B_{\max} X^H) / (K_b^H + X^H)$, и определяли основные характеристики связывания (см. Экспериментальную часть): максимальное количество пиков флуоресценции (B_{\max}), константу вытеснения (K_b) и коэффициент кооперативности связывания (коэффициент Хилла, H). Максимальное количество пиков флуоресценции B_{\max} отражает концентрацию флуоресцирующих частиц в системе, а также зависит от количества сайтов связывания фЦит на одной частице. В этом уравнении X обозначает концентрацию цитохрома *c*. Константа вытеснения отражает усредненное значение константы диссоциации всех сайтов связывания, с которыми мог связаться меченый цитохром *c*. Таким образом, различия констант вытеснения обусловлены различием сродства липидных мембран к цитохрому *c*. Коэффициент Хилла отражает влияние повышения (положительная кооперативность) или понижения (отрицательная кооперативность) сродства сайтов связывания на липидных мембранах при протекании процесса связывания с ними белка. Следует сказать, что данное уравнение применимо для анализа при выполнении двух условий: (1) концентрация фЦит должна быть много больше, чем концентрация центров связывания; (2) при выбранных концентрациях фЦит и мембран должно быть обеспечено насыщение связывания. При проведении наших опытов данные условия соблюдались лишь частично, поэтому вместо истинных констант связывания в опытах оценивались кажущиеся константы связывания. Кажущаяся константа вытеснения в случае комплекса фЦит с митопластами существенно превышает таковые для комплексов с митохондриями и со-

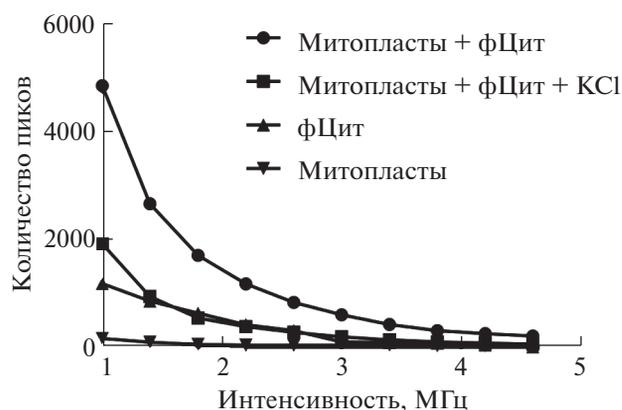


Рис. 3. Распределение регистрируемых пиков флуоресценции по интенсивности в суспензии митопластов и растворе меченого цитохрома *c*, а также при взаимодействии меченого цитохрома *c* с митопластами, в том числе в условиях повышенной ионной силы 50 мМ КСl. Условия измерений даны в подписи к рис. 2.

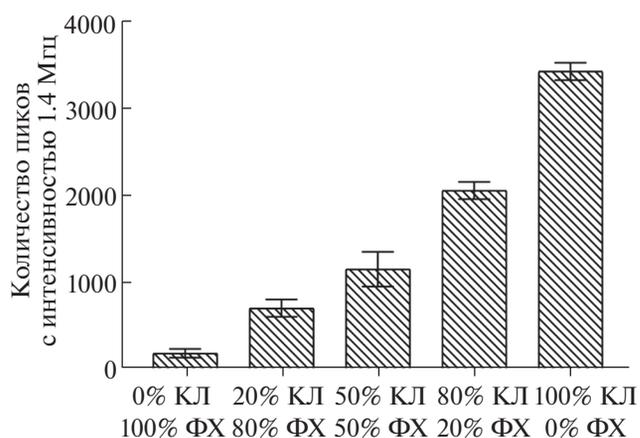


Рис. 4. Влияние содержания (%) кардиолипина в составе липосом на сродство цитохрома *c* к липосомам, выраженное в количестве пиков с интенсивностью 1.4 МГц. Данные приведены для липосом состава “яичный фосфатидилхолин–кардиолипин” в различных соотношениях. Измерения проводили в сахарном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ КСl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4). Конечная концентрация липосом различного состава – 0.5 мг/мл, концентрация меченого цитохрома *c* – 0.26 мкМ.

ставляет 25 мкМ (табл. 1). При этом максимальное количество регистрируемых пиков флуоресценции в случае комплекса с митопластами больше, чем для комплексов с митохондриями. Поскольку концентрация частиц митохондрий и митопластов в наших опытах была одинакова, то эти данные свидетельствуют о том, что на мембранах митопластов имеется существенно большее количество сайтов связывания фЦит. Однако различия в величинах K_b говорит о том, что сродство к белку

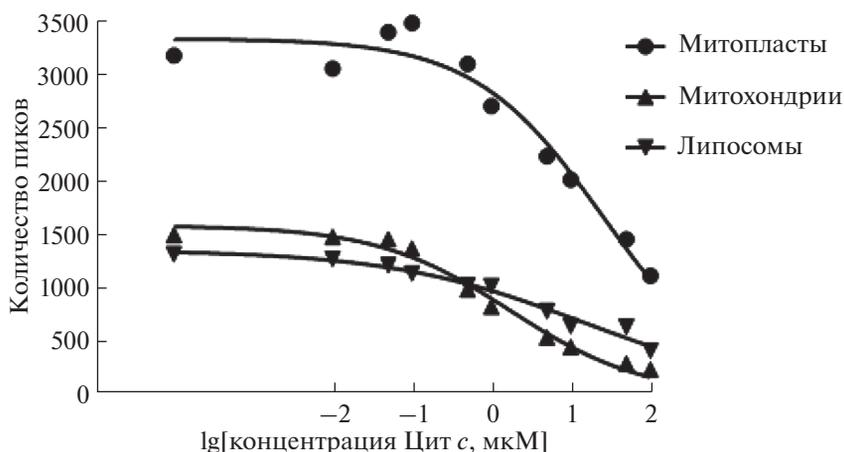


Рис. 5. Вытеснение меченого цитохрома *c* из комплекса с митопластами, митохондриями и липосомами (20% кардиолипина) немеченым цитохромом *c*. Конечная концентрация митопластов – 0.1 мг/мл, митохондрий – 0.1 мг/мл, липосом – 0.5 мг/мл, меченого цитохрома *c* – 0.26 мкМ. Измерения проводили в сахарозном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4).

для сайтов связывания на митопластах примерно в десять раз ниже, чем средство аналогичных сайтов для митохондрий.

Также было изучено влияние ионной силы на кажущуюся константу вытеснения (K_b) и кооперативность связывания (H , табл. 1). Анализ полученных данных позволяет заключить, что в присутствии KCl кажущаяся константа вытеснения увеличивалась, что говорит о снижении средства цитохрома *c* к липидным мембранам. Количество пиков с интенсивностью >1.4 MHz уменьшалось с ростом ионной силы раствора. В случае митохондрий и липосом при добавлении 50 мМ KCl наблюдалось многократное увеличение кажущейся константы вытеснения K_b с 2 до 29 мкМ (митохондрии) и с 17 до 88 мкМ (липосомы, табл. 1). Влияние KCl на K_b было значительно слабее в случае митопластов. Снижение связывания фЦит с кардиолипином в составе липосом при повышении ионной силы соответствует имеющимся литературным данным [22].

Определение кажущихся констант вытеснения мутантных форм цитохрома *c* с различными мембранами. Проведен эксперимент по вытеснению флуоресцентно-меченого цитохрома *c* из комплексов с липидными мембранами при помощи немеченых мутантных вариантов цитохрома *c* с единичной заменой K8T и множественными заменами K72E/E69K/K86E/K87E (4Mut), полученными в рамках наших предыдущих работ [23, 24]. Эксперимент проводили аналогично предыдущим экспериментам с титрованием комплекса фЦит/липидная мембрана немеченым белком в концентрациях от 10 нМ до 100 мкМ, при этом наблюдали характерное падение количества пиков (рис. 6).

О различиях в эффективности вытеснения меченого цитохрома *c* из комплекса фЦит/липосома (20% кардиолипид, 80% яичный лецитин) под действием немеченых мутантных вариантов цитохрома *c* свидетельствуют отличающиеся кажущиеся константы вытеснения, при том, что коэффициент Хилла примерно одинаков для всех вариантов цитохрома *c*. Основываясь на данных,

Таблица 1. Значения максимального количества пиков (B_{max}), коэффициента Хилла (H) и кажущейся константы вытеснения (K_b) немеченым цитохромом *c* дикого типа (WT), полученные после обработки кривых титрования для каждого типа изучаемых липидных мембран в присутствии и в отсутствие 50 мМ KCl

| Липидная мембрана | Количество пиков, B_{max} | Коэффициент Хилла, H | Константа вытеснения, K_b , мкМ |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Митопласты | 3200 ± 100 | -0.5 ± 0.1 | 25 ± 5 |
| Митопласты + KCl | 2220 ± 30 | -0.6 ± 0.1 | 67 ± 15 |
| Липосомы (20% кардиолипина) | 1700 ± 200 | -0.47 ± 0.15 | 17 ± 2 |
| Липосомы (20% кардиолипина) + KCl | 1240 ± 50 | -6 ± 0.1 | 88 ± 20 |
| Митохондрии | 1750 ± 150 | -0.4 ± 0.1 | 2 ± 0.5 |
| Митохондрии + KCl | 1800 ± 50 | -0.15 ± 0.05 | 29 ± 5 |

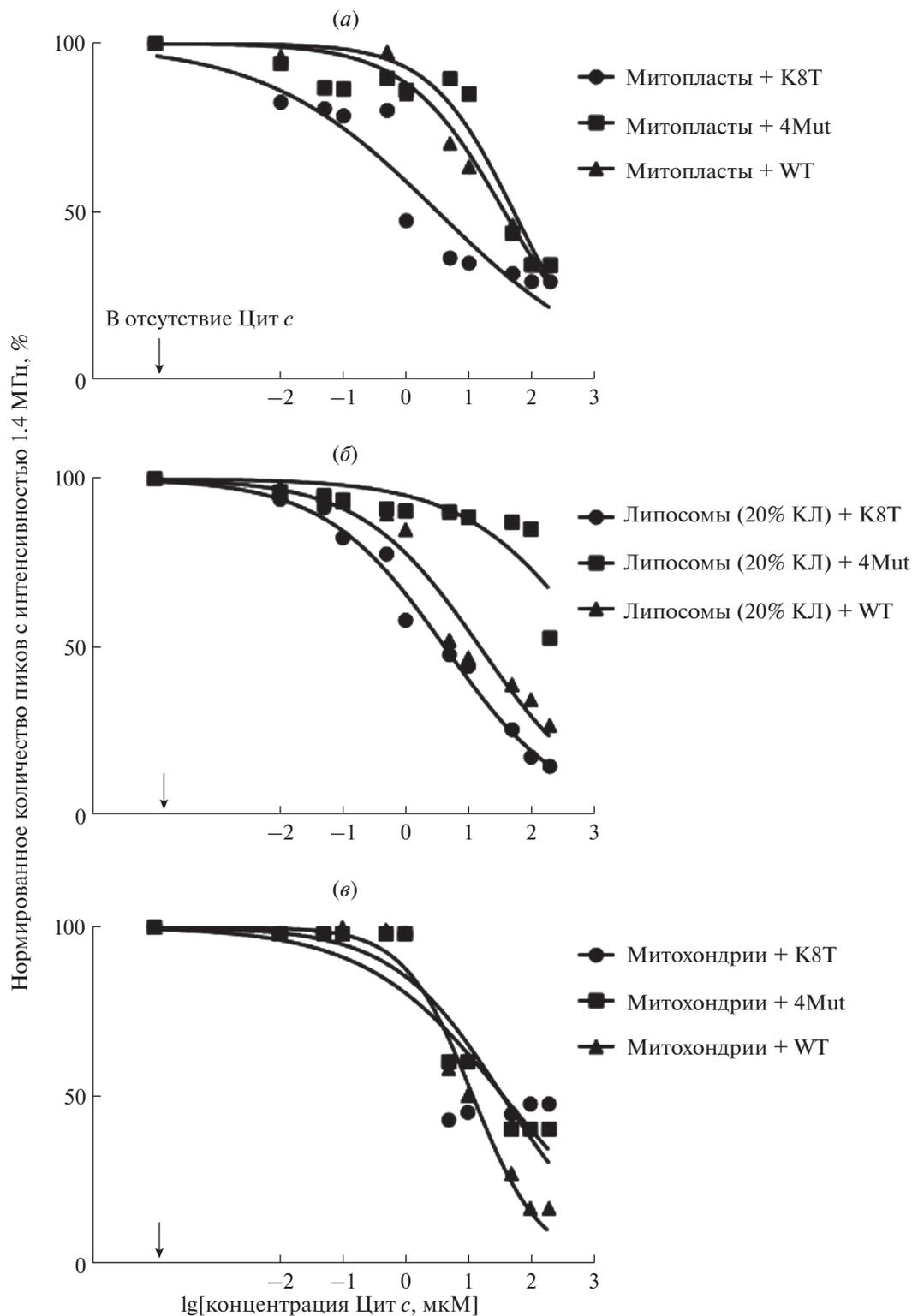


Рис. 6. Вытеснение флуоресцентно-меченого цитохрома *c* под действием немеченых мутантных вариантов K8T и 4Mut из комплексов *c*: (а) липосомами (20% кардиолипин, 80% яичный лецитин), (б) митопластами, (в) митохондриями. Графики нормированы на максимальное связывание. Измерения проводили в сахарозном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4). Концентрация митопластов – 0.1 мг/мл, митохондрий – 0.1 мг/мл, липосом – 0.5 мг/мл, меченого цитохрома *c* – 0.26 мкМ.

Таблица 2. Значения коэффициента Хилла (H) и кажущейся константы вытеснения (K_b), полученные после обработки нормированных кривых титрования в программе Prism для немеченых мутантных цитохромов c

| Цитохром c | Липосомы | | Митопласты | | Митохондрии | |
|---------------------|------------------------|---------------|------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | коэффициент Хилла, H | K_b , мкМ | коэффициент Хилла, H | K_b , мкМ | коэффициент Хилла, H | K_b , мкМ |
| K8T | -0.45 ± 0.15 | 4.3 ± 1 | -0.3 ± 0.15 | 3 ± 1 | -0.4 ± 0.1 | 36 ± 5 |
| K72E/E69K/K86E/K87E | -0.42 ± 0.15 | 1088 ± 10 | -0.45 ± 0.15 | 52 ± 10 | -0.5 ± 0.1 | 35 ± 5 |

представленных в табл. 2, можно сделать вывод, что мутантный цитохром c с заменой K8T, обладающая повышенным сродством к кардиолипину, наиболее эффективно вытеснял флуоресцентно-меченый цитохром c из комплексов с кардиолипид-содержащими липосомами. В случае митопластов наблюдалась аналогичная картина. В то же время, этот белок заметно слабее связывался с митохондриями по сравнению с диким типом. Мутантный вариант K72E/E69K/K86E/K87E (4Mut) благодаря введению отрицательно-заряженных а.к.о. на позиции трех остатков Lys связывался хуже цитохрома c дикого типа (WT) в случае всех изучаемых типов мембран.

Согласно полученным данным, большей эффективностью связывания с митохондриями обладает цитохром c WT, тогда как эффективность связывания для 4Mut и K8T совпадала и была заметно ниже по сравнению с WT. Данный факт может свидетельствовать о том, что связывание цитохрома c с митохондриями не зависит от эффективности связывания цитохрома c с кардиолипином и осуществляется за счет других взаимодействий, нежели с митопластами и липосомами.

При помощи метода ФКС нами изучено взаимодействие флуоресцентно-меченого цитохрома c лошади с тремя видами липидных мембран: кардиолипид-содержащими липосомами, митопластами и митохондриями, полученными из препаратов печени крысы. Показано, что взаимодействие цитохрома c с митопластами характеризуется наибольшим количеством сайтов связывания, которые обладают, однако, меньшим сродством в сравнении с митохондриями. Поверхность мембраны митопластов состоит по большей части из внутренней митохондриальной мембраны, в липидный состав которой входит кардиолипид. Кроме того, внутренняя мембрана митохондрий содержит интегрированные в нее белковые комплексы – убихинол-цитохром c -оксидоредуктазу (комплекс III) и цитохром c -оксидазу (комплекс IV), являющиеся белками-партнерами цитохрома c по ЭТЦ, с которыми цитохром c образует временные функциональные комплексы в процессе переноса электрона. Таким образом, на митопластах имеются сайты связывания цитохрома c как минимум двух принципиально разных типов: 1) кардиолипид, с которым реализуется

белок-липидное связывание; 2) III и IV комплексы ЭТЦ, с которыми реализуется белок-белковое связывание. По-видимому, именно этим объясняется наблюдаемое нами повышенное количество сайтов связывания на митопластах по сравнению с митохондриями. Оба рассматриваемых типа связывания цитохрома c реализуются с участием электростатических взаимодействий; с этим согласуются наши экспериментальные наблюдения уменьшения сродства цитохрома c при повышении ионной силы в среде измерения в случае комплексов с липосомами или митопластами.

Монотонное увеличение сродства фЦит к липосомам при увеличении в них процентного содержания кардиолипина свидетельствует об определяющей роли взаимодействия фЦит с кардиолипином в процессе связывания белка с кардиолипид-содержащей липосомальной мембраной.

Характер связывания фЦит с внешней митохондриальной мембраной (митохондрии) отличался от связывания с митопластами и кардиолипид-содержащими липосомами. Тем не менее, несмотря на отсутствие в составе внешней мембраны митохондрий кардиолипина и белков-партнеров ЭТЦ, связывающих цитохром c , в наших экспериментах наблюдалось устойчивое связывание. Таким образом, полученные нами экспериментальные данные могут свидетельствовать о наличии на внешней митохондриальной мембране специфических сайтов связывания цитохрома c .

Результаты эксперимента по вытеснению флуоресцентно-меченого цитохрома c из комплекса с липидными мембранами мутантными вариантами белка не противоречат предположению о том, что на внешней мембране митохондрий имеются специфические сайты связывания цитохрома c . Оба мутантных варианта одинаково эффективно (но заметно хуже по сравнению с диким типом цитохрома c) вытесняли флуоресцентно-меченый цитохром c из комплекса с митохондриями. В то же время, в случае комплексов как с липосомами, так и с митопластами вариант с заменой K8T, имеющий более высокое сродство к кардиолипину, вытеснял меченый цитохром c эффективнее варианта K72E/E69K/K86E/K87E и белка дикого типа.

Полученные нами данные представляют интерес с точки зрения понимания фундаментальных механизмов взаимодействия цитохрома *c* с липидными мембранами, а также влияния на эти механизмы различных внешних факторов. Понимание механизмов, в свою очередь, имеет практическую значимость, поскольку открывает широкие возможности для рационального дизайна биомедицинских препаратов, обладающих про- или антиапоптотическими свойствами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали компоненты для культуральных сред и буферных растворов для хроматографии и электрофореза фирмы AppliChem (Германия); ампициллин, эндонуклеазу рестрикции *DpnI* фирмы Fermentas (Литва), Pfu ДНК-полимеразу, кардиолипин бычьего сердца (Sigma, США), фосфатидилхолин яичного желтка (Avanti Polar Lipids, США), флуоресцентные красители сульфоцианин и BDP TMR в малеимидной форме (Lutiprobe GmbH, Германия). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

Конструирование мутантных генов цитохрома *c*. Введение мутации в ген лошадиного цитохрома *c* в составе экспрессионного плазмидного вектора рВР(СУС1) осуществляли с помощью сайт-направленного мутагенеза по методу QuikChange™ Mutagenesis Kit (Stratagene, США) [23]. После завершения реакции к смеси добавляли 10 ед. акт. рестриктазы *DpnI* и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Далее аликвоты полученной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* XL-1 Blue по стандартной методике. Нарботку мутантной ДНК в ходе мутагенеза анализировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Определение нуклеотидной последовательности мутантных генов в составе плазмидной ДНК осуществляли с помощью автоматического секвенатора ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Отобранные мутантные гены переклонировали в экспрессионный вектор рВР(СУС1) [25], модифицированный для экспрессии генов лошадиного цитохрома *c* [24].

Экспрессию мутантных генов цитохрома *c* осуществляли в штамме *E. coli* JM109 в жидкой питательной среде SB с ампициллином (конечная концентрация 100 мкг/мл) без добавления индуктора при 37°C и интенсивном перемешивании в течение 22–24 ч [26]. По окончании роста клетки *E. coli* осаждали центрифугированием при 4000 g и 4°C в течение 20 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в буфере 25 мМ Na–P_i, рН 6,0, 1 мМ NaN₃. Гомогенизацию клеток осуществляли продавливанием под высоким давлением на установке “French Press” (Spectronic In-

struments, Inc., США) с последующим центрифугированием при 95000 g в течение 20 мин [27].

Выделение и очистку целевых белков проводили с использованием жидкостной хроматографической системы “АКТА FPLC” (GE-HEALTHCARE, США), согласно схеме, разработанной ранее [25, 27]. Клеточный экстракт наносили на катионообменную колонку MP HS 10/10 (BIO-RAD, США), уравновешенную буфером, содержащем 25 мМ Na–P_i, рН 6,0, 1 мМ NaN₃. Цитохром *c* элюировали линейным градиентом 1 М NaCl в том же буфере со скоростью 3 мл/мин. Фракции, полученные после очистки на MP HS, анализировали спектрофотометрически и при помощи электрофореза в 12% SDS-ПААГ, затем диализовали против буфера для адсорбционной хроматографии (10 мМ Na–P_i, рН 7,0, 1 мМ NaN₃) и наносили на колонку с гидроксипатитом СНТ-I (BIO-RAD, США). Цитохром *c* элюировали линейным градиентом 500 мМ Na–P_i, рН 7,0 со скоростью 2 мл/мин. Степень очистки и концентрацию цитохрома *c* в полученных фракциях определяли спектрофотометрически и при помощи электрофореза в 12% SDS-ПААГ. Степень очистки цитохрома *c* в полученных фракциях определяли по отношению оптической плотности в максимуме поглощения в области Сорс к оптической плотности при 280 нм. Фракции с отношением, равным 4,5–5,0 (что соответствует чистоте коммерческого препарата ≥95%, Sigma, США), объединяли, дважды диализовали против 10 мМ аммоний-карбонатного буфера, рН 7,9, и лиофилизировали на установке ALPHA I-5.

Получение флуоресцентно-меченого цитохрома *c*. Лيوфилизированный препарат мутантного варианта цитохрома *c* с заменой G56C, растворяли в реакционном буфере (10 мМ NaH₂PO₄, 200 мМ NaCl, рН 7,0) до концентрации 1–2 мг/мл. Флуоресцентный краситель – водорастворимый сульфоцианин (Sulfo-Cyanine3) в виде малеимида – растворяли в ДМСО до концентрации (0,01 мг/мл). Раствор красителя добавляли к раствору белка в соотношении 1 : 5, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 12–14 ч. Продукт реакции очищали на гель-фильтрационной колонке (Sephadex G-25), уравновешенной реакционным буфером. По окончании гель-фильтрации фракции, содержащие флуоресцентно-меченый белок, обессоливали на этой же колонке, уравновешенной бессолевым буфером (10 мМ NaH₂PO₄, рН 7,0). Количественные и качественные характеристики модифицированного цитохрома *c* определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Cary50-Bio (Varian, США) в максимумах поглощения для цитохрома *c* (412 нм), Sulfo-Cyanine3 (549 нм).

Выделение препаратов митохондрий и митопластов из печени крыс. Митохондрии печени крыс выделяли при помощи дифференциального

центрифугирования [28] в буфере, содержащем 250 мМ сахарозы, 10 мМ MOPS, 1 мМ ЭГТА и 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), pH 7.4. После центрифугирования препарат митохондрий промывали в том же буфере. Митопласты получали в процессе инкубирования митохондрий печени крысы в течение 10 мин в буфере (MOPS 10 мМ, ЭДТА 1 мМ, Tris 10 мМ, pH 7.4), содержащем 25 мМ KCl. После инкубирования суспензию центрифугировали при 4200 g в течение 5 мин, удаляли супернатант, а осадок суспендировали в сахарозном буфере (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4), содержащим 1 мМ ЭДТА. Выравнивание концентраций частиц митопластов и митохондрий в наших опытах достигалась тем, что при приготовлении митопластов одновременно в другую пробирку отбиралось такое же количество белка митохондрий, которое суспендировалось в том же объеме буфера, который добавлялся при последнем осаждении митопластов.

Получение кардиолипид-содержащих мультислойных липосом. Для приготовления липосом 5 мг липида (яичный лецитин, кардиолипид или их смесь) растворяли в 250 мкл хлороформа. После выпаривания хлороформа в атмосфере азота добавляли 0.5 мл буфера (Tris 10 мМ, MES 10 мМ, KCl 100 мМ, pH 7.4). Полученную смесь встряхивали, после чего подвергали пяти циклам замораживания-оттаивания. По приведенной схеме были получены мультислойные липосомы с содержанием кардиолипидов от 1 до 5 мг.

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия. В настоящей работе был использован прибор, сконструированный на основе инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IMT-2 (Artisan Technology Group, США) [28]. Для возбуждения красителя использовался Nd:YAG твердотельный лазер 532 нм, сопряженный с вышеупомянутым микроскопом с водноиммерсионным объективом 40×, 1.2 NA ("Carl Zeiss", Германия). Флуоресцентный сигнал проходил через соответствующий дихроический разделитель и проецировался на сердцевину световода (50 мкм), связанного с лавинным фотодиодом (SPCM-AQR-13-FC, "PerkinElmer Optoelectronics", Канада). Сигнал преобразовывался с помощью интерфейсной карты Flex02-01D/C ("Correlator.com", США). Для корректной работы прибора в начале эксперимента осуществлялась настройка положения световода относительно оптической оси. Все измерения проводили при перемешивании раствора лопастевидным 3-мм пластиковым стержнем, вращающимся со скоростью 600 об./мин. Для измерения к 60 мкл сахарозного буфера (180 мМ сахарозы, 10 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ MES, pH 7.4) добавляли БСА до конечной концентрации 0.1 мг/мл и 1–3 мкл суспензии митохондрий, митопластов или липосом. Конечная концентрация митохондриального бел-

ка в экспериментах составляла 0.2 мг/мл, а концентрация липида в случае липосом – 0.5 мг/мл. Измеряли флуктуации флуоресценции окрашенных частиц до и после добавления флуоресцентно-меченого цитохрома *c* до конечной концентрации 0.26 мкМ. Время сбора данных составляло 30 с. Флуоресценцию регистрировали из конфокального объема, расположенного примерно на 50 мкм выше поверхности покровного стекла. Перед измерениями смесь меченого белка с митохондриями (а также митопластами или липосомами) инкубировали в течение 5 мин.

В эксперименте по вытеснению флуоресцентно-меченого цитохрома *c* немеченым цитохромом *c* повторяли все вышеописанные действия, дополнительно измеряя флуктуации флуоресценции каждый раз после добавления немеченого белка (концентрации варьировались от 10 нМ до 100 мкМ).

Для количественной оценки связывания белка с липосомами и митохондриями подсчитывали количество пиков сигнала флуоресценции ($n(F > F_0)$) с интенсивностью выше некоего порога (F_0) [22] при помощи программы WinEDR Strathclyde Electrophysiology Software, разработанной Д. Демпстером из Университета Страфклида (J. Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK) или аналогичной программой Saligat, разработанной В. Козловским (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ). В настоящей работе для оценки связывания цитохрома *c* использовался порог F_0 равный 1.4 МГц. В типичном опыте такая величина порога позволяла регистрировать около 2000 пиков, что обеспечивало достаточную статистику и хорошую воспроизводимость измерений.

Константу вытеснения и значения коэффициента Хилла рассчитывали, решая параметрическое уравнение вида: $y = (B_{\max} X^H) / (K_b^H + X^H)$, где B_{\max} – максимальное количество пиков, нормированное для всех измерений, X – концентрация немеченого цитохрома *c*, K_b – константа вытеснения, H – коэффициент Хилла. Для фиттирования данных этим уравнением использовали программу GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., США). Все данные были получены в результате четырех независимых экспериментов и статистически обработаны в программе GraphPad Prism 8 (Anova test), уровень значимости P был не менее 0.05.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Получение флуоресцентно меченого и мутантных вариантов цитохрома *c* осуществлялось при финансовой поддержке Программы РАН.

Изучение связывания с мембранами аналогов цитохрома *c* методом флуоресцентной корреляционной

спектроскопии проводилось при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-74-00015 (руководитель А.М. Фирсов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Обращение с животными и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с международными рекомендациями по уходу и использованию животных и были одобрены комитетом по этике НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemerson R., Wang X. // *Cell*. 1996. V. 86. P. 147–157. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80085-9)
2. 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., Kini V. // *Nature Chem. Biol.* 2005. V. 1. P. 223–232. <https://doi.org/10.1038/nchembio727>
3. Kagan V.E., Borisenko G.G., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Potapovich A.I., Kini V., Amoscato A.A., Fujii Y. // *Free Radical Biology and Medicine*. 2004. V. 37. P. 1963–1985. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.016>
4. 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. // *Free Radical Biology and Medicine*. 2009. V. 46. P. 1439–1453. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004>
5. Mustonen P., Virtanen J.A., Somerharju P.J., Kinnunen P.K.J. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 2991–2997. <https://doi.org/10.1021/bi00385a006>
6. Dzdzislaw S., Gordon T. // *Biophys. J.* 1996. V. 71. P. 848–857. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79286-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79286-X)
7. Bradley J.M., Silkstone G., Wilson M.T., Cheesman M.R., Butt J.N. // *J. Am. Chem. Soci.* 2011. V. 133. P. 19676–19679. <https://doi.org/10.1021/ja209144h>
8. Shidoji Y., Hayashi K., Komura S., Ohishi N., Yagi K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 264. P. 343–347. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1410>
9. Cuiping L., Stonestrom A.J., Christian T., Yong J., Takase R., Hou Y., Yang X. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 10426–10436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.697789>
10. Capdevila D.A., Oviedo Rouco S., Tomasina F., Tórtora V., Demicheli V., Radi R., Murgida D.H. // *Biochemistry*. 2015. V. 54. P. 7491–7504. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00922>
11. Kalanxi E., Wallace C. // *Biochem. J.* 2007. V. 407. P. 179–187. <https://doi.org/10.1042/BJ20070459>
12. Hanske J., Toffey J.R., Morenz A.M., Bonilla A.J., Schiavoni K.H., Pletneva E.V. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. V. 109. P. 125–130. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112312108>
13. O'Brien E.S., Nucci N.V., Fuglestad B., Tommos C., Wand A.J. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 30879–30887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689406>
14. Gorbenko G.P., Molotkovsky J.G., Kinnunen P.K.J. // *Biophys. J.* 2006. V. 90. P. 4093–4103. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.080150>
15. Younggyu Kim Sam O Ho Gassman N.R., Korlann Y., Landorf E.V., Collart F.R., Weiss S. // *Bioconjugate Chem.* 2008. V. 19. P. 786–791. <https://doi.org/10.1021/bc7002499>
16. 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., Kagan V.E. // *Biochemistry*. 2006. V. 45. P. 4998–5009. <https://doi.org/10.1021/bi0525573>
17. Abe M., Niibayashi R., Koubori S., Moriyama I., Miyoshi H. // *Biochemistry*. 2011. V. 50. P. 8383–8391. <https://doi.org/10.1021/bi2010202>
18. Shimada S., Shinzawa-Itoh K., Baba J., Aoe S., Shimada A., Yamashita E., Kang J., Tateno M., Yoshikawa S., Tsukihara T. // *The EMBO J.* 2017. V. 36. P. 291–300. <https://doi.org/10.15252/embj.201695021>
19. Lange C., Hunte C. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. V. 99. P. 2800–2805. <https://doi.org/10.1073/pnas.052704699>
20. Volkov A.N., Nicholls P., Worrall J.A. // *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2011. V. 1807. P. 1482–1503. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.07.010>
21. Sinibaldi F., Fiorucci L., Patriarca A., Lauceri R., Ferri T., Coletta M., Santucci R. // *Biochemistry*. 2008. V. 47. P. 6928–6935. <https://doi.org/10.1021/bi800048v>
22. Antonenko Y.N., Lapashina A.S., Kotova E.A., Ramonova A.A., Moisenovich M.M., Agapov. I.I. // *The J. Memb. Biol.* 2017. V. 250. P. 77–87. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9938-6>
23. Пепелина Т.Ю., Черткова Р.В., Долгих Д.А., Курпичников М.П. // *Биоорг. химия*. 2010. Т. 36. С. 98–104. [Pepelina T.Y., Chertkova R.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 36. P. 90–96. <https://doi.org/10.1134/S1068162010010097>
24. Pepelina T.Y., Chertkova R. V., Ostroverkhova T.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2009. V. 74. P. 625–632. <https://doi.org/10.1134/S000629790906006>

25. Chertkova R.V., Brazhe N.A., Bryantseva T.V., Nekrasov A.N., Dolgikh D.A., Yusipovich A.I., Sosnovtseva O., Maksimov G.V., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P. // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0178280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178280>
26. Долгих Д.А., Латыпов Р.Ф., Абдуллаев З.Х., Колон В., Родер Х., Кирпичников М.П. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 756–759. [Dolgikh D.A., Latypov R.F., Abdullaev Z. K., Kolov V., Roder H., Kirpichnikov M.P. // Russ. J. Bioorg. Chem. V. 24. P. 672–675.] <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1438>
27. Chertkova R.V., Sharonov G.V., Feofanov A.V., Bocharova O.V., Latypov R.F., Chernyak B.V., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Mol. Cell. Biochem. 2008. V. 314. P. 85. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9768-7>
28. Johnson D., Lardy H. Methods in Enzymology. Academic Press, 1967. V. 10. P. 94–96.

Study of Interaction of Fluorescent Cytochrome *c* with Liposomes, Mitochondria and Mitoplasts by Fluorescence Correlation Spectroscopy

I. D. Gusev*, A. M. Firsov**, R. V. Chertkova*, ***, #, E. A. Kotova**, D. A. Dolgikh*, ****, M. P. Kirpichnikov*, ****, and Y. N. Antonenko**, #

#Phone: +7 (495) 335-28-88; e-mail: cherita@inbox.ru; antonen@belozersky.msu.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/40, Moscow 119991 Russia

***Faculty of Biology and Biotechnologies, National Research University Higher School of Economics, ul. Vavilova, 7, Moscow 117312 Russia

****Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

Here, we studied the interaction of Cys-substituted (G56C) cytochrome *c* labeled with sulfocyanin-3 fluorescent dye (fCyt) with artificial and natural lipid membranes by using fluorescence correlation spectroscopy (FCS). Compared to mitochondria, mitoplasts were shown to have more fCyt binding sites with a lower affinity for this protein. The fCyt affinity for cardiolipin-containing liposomes depended on the content of cardiolipin in liposomes and decreased upon raising the ionic strength of the solution. A high value of the constant of the fCyt binding with mitochondria could be explained by the presence of specific binding sites for this protein on the mitochondrial outer membrane surface. This explanation is confirmed by observation of more efficient displacement of fluorescent cytochrome *c* by the unlabeled mutant variant K8T than by the WT protein, whereas in mitoplasts and liposomes the WT protein displaced fCyt more efficiently than K8T.

Keywords: cytochrome c, cardiolipin, mitochondria, mitoplasts, fluorescence correlation spectroscopy