

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОХРОМА *c* С КАРДИОЛИПИНОМ И ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТОЙ

А. Ю. Макаров, Г. О. Степанов, А. Н. Осипов

ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Апоптоз играет ключевую роль в патогенезе множества заболеваний [1]. Одним из инициаторов апоптоза по митохондриальному пути является цитохром *c*, который способен образовывать комплексы с мембранными анионными фосфолипидами за счёт ряда взаимодействий, включая электростатические и гидрофобные силы [2]. При этом взаимодействии увеличивается пероксидазная активность цитохрома *c*, что приводит к образованию пор в мембране и выходу белка из митохондрий, необходимому для запуска апоптоза [3]. Нашей целью было изучение молекулярных механизмов действия цитохрома *c* в комплексах с анионными фосфолипидами, и первым шагом для этого стало изучение образования комплексов цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином (TOCL) и диолеилфосфатидной кислотой (DOPA).

Для этого использовались 2,5 мМ липосомальные мембраны на основе диолеилфосфатидилхолина (DOPC) с добавкой TOCL или DOPA, а также флуоресцентной метки NBD-PC: 89,9% DOPC; 10% TOCL или DOPA или DOPC; 0,1% NBD-PC. К ним добавлялся цитохром *c* в различных концентрациях от 0 до 25 мкМ. Выраженность белок-липидных взаимодействий оценивались по тушению флуоресценции NBD-PC. Для снижения электростатической составляющей белок-липидных взаимодействий увеличивали концентрацию фосфатного буфера (PB) с 10 мМ до 100 мМ.

Полученные кривые снижения интенсивности флуоресценции аппроксимировались по модели Ленгмюра, и по ним рассчитывались равновесные константы диссоциации (K_d). Так для ионной силы, соответствующей концентрации PB 10 мМ и PB 100 мМ, значения K_d составили: для TOCL – $9,37 \pm 0,18$ и $18,39 \pm 2,45$ мкМ, для DOPA – $14,77 \pm 3,24$ и $36,88 \pm 3,7$ мкМ, для DOPC – $113,72 \pm 32,95$ и $52,19 \pm 10,49$ мкМ. Статистическая значимость ($p < 0,05$) показана при сравнении K_d цитохрома *c* с TOCL, DOPA и DOPC при разных концентрациях PB, между образцами, содержащими TOCL, DOPA и DOPC в PB 10 мМ, а также между образцами содержащими TOCL и DOPA в PB 100 мМ.

Полученные результаты говорят о существенном вкладе электростатических сил в образовании данных комплексов. Показано, что увеличение концентрации PB приводит к увеличению K_d комплексов цитохрома *c* с кардиолипином или фосфатидной кислотой. Кроме того, K_d комплексов с TOCL оказалась больше, чем для комплексов с DOPA, что объясняется меньшим отрицательным зарядом последней. С другой стороны, увеличение концентрации PB в образцах с незаряженным DOPC приводит к уменьшению константы диссоциации. Полученные сведения полезны для лучшего понимания процессов регуляции образования проапоптотических комплексов цитохрома *c* с фосфолипидами и их действия на ряд субстратов, таких как пероксид водорода и липидные гидроперекиси.

Библиографические ссылки

1. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease / A. R. Bogdan [et al.] // Trends in Biochemical Sciences. 2016. Vol. 41, iss. 3. P. 274–286.
2. Regulation of cytochrome C peroxidase activity by nitric oxide and laser irradiation / A. N. Osipov [et al.] // Biochemistry (Mosc). 2006. Vol. 71, iss. 10. P. 1128–1132.
3. Cytochrome c produces pores in cardiolipin-containing planar bilayer lipid membranes in the presence of hydrogen peroxide / M. N. Puchkov [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. 2013. Vol. 1828, iss. 2. P. 208–212.