

УДК 577.352.27

СТЕХИОМЕТРИЯ ФОРМИРОВАНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЦИТОХРОМА *c* С КАРДИОЛИПИНОМ

© 2025 г. Г.О. Степанов^{*,#}, Г.К. Владимиров^{**,***}, И.В. Кирилина^{*}, А.Р. Гусельникова^{*}, В.И. Тихонова^{*}, П.Д. Виноградова^{**}, А.Н. Осипов^{*}, Ю.А. Владимиров^{**,***}

^{*}Медико-биологический факультет Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997, Россия

^{**}Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ломоносовский просп., 27/1, Москва, 119192, Россия

^{***}Курчатовский комплекс кристаллографии и фотоники, НИЦ «Курчатовский институт», Ленинский просп., 59, Москва, 119333, Россия

[#]E-mail: stepanov_go@rsmu.ru

Поступила в редакцию 28.11.2024 г.

После доработки 28.11.2024 г.

Принята к публикации 04.12.2024 г.

Исследована стехиометрия взаимодействия цитохрома *c* с тетраолеил-кардиолипином или тетрамиристоил-кардиолипином, компонентами цитохром *c*-фосфолипидных комплексов, играющих одну из главных ролей в апоптотических процессах. Исследование проведено с использованием флуоресцентно-меченого BODIPY фосфатидилхолина. Измеряли тушение флуоресценции зонда BODIPY-PC цитохромом *c*. Расчеты результатов тушения флуоресценции позволили определить стехиометрию образующихся комплексов цитохрома *c* с фосфолипидами. Для комплексов тетраолеил-кардиолипина с цитохромом *c* стехиометрия составила 25 ± 7 , а для комплексов тетрамиристоил-кардиолипина с цитохромом *c* — 7 ± 2 . Полученные результаты могут свидетельствовать о различии в сродстве цитохрома *c* к насыщенным и ненасыщенным видам кардиолипина, несмотря на одинаковые электростатические характеристики молекул. Можно ожидать, что обнаруженные особенности взаимодействия цитохрома *c* с кардиолипином в итоге смогут определять интенсивность и направление апоптотических реакций.

Ключевые слова: апоптоз, цитохром *c*, кардиолипин, комплекс цитохрома *c* с кардиолипином, флуоресцентно-меченый BODIPY фосфатидилхолин.

DOI: 10.31857/S0006302925010082, EDN: LXGCAT

В настоящее время большое внимание уделяется детальному исследованию процессов запрограммированной гибели клеток, играющих ведущую роль в патогенезе таких заболеваний, как онкологические заболевания [1], аномалии развития [2], заболевания сердечно-сосудистой системы [3] и некоторые другие.

Хорошо известна общая концепция запрограммированной гибели клеток, которая говорит о том, что апоптотические процессы начинаются с взаимодействия ненасыщенных анионных митохондриальных липидов с цитохромом *c*. Данное взаимодействие приводит к структурной перестройке цитохрома *c* и формированию у него пероксидазной активности [4, 5].

Пероксидазная активность цитохрома *c* приводит к формированию в митохондриальных мембранах пор, сопоставимых по размеру с размерами молекулы цитохрома *c* [6, 7], через которые цитохром *c* может выходить в цитоплазму, инициируя апоптотические процессы [8]. Несмотря на обилие исследований, направленных на выяснение механизма апоптотических процессов, два экспериментальных факта остаются без ответа. Во-первых, почему при равных константах скорости взаимодействия с насыщенными и ненасыщенными анионными фосфолипидами [9] цитохром *c* резко повышает свою пероксидазную активность только в присутствии ненасыщенных липидов, и во-вторых, почему с увеличением доли ненасыщенных анионных фосфолипидов (главным образом кардиолипина) в составе мембран, окружающих цитохром *c*, его активность на первых этапах взаимодействия

Сокращения: DOPC — диолеил фосфатидилхолин, TOCL — тетраолеил кардиолипин, TMCL — тетрамиристоил кардиолипин, BODIPY-PC — флуоресцентно меченый BODIPY фосфатидилхолин.

растет заметно быстрее, чем на более поздних этапах. Такие наблюдения можно объяснить, в первую очередь, электростатическими взаимодействиями между цитохромом и фосфолипидами. Однако, если принять в расчет только электростатические взаимодействия, то следовало бы ожидать, что при физиологических условиях на одну молекулу цитохрома *c* (имеющую заряд $\sim +8$) придется 4 молекулы кардиолипина (*c* зарядом -2) [10]. Очевидно, что ответ на этот вопрос кроется в специфических особенностях белок-липидных взаимодействий. Поэтому основной целью данной работы явилось исследование стехиометрии взаимодействия цитохрома *c* с насыщенными и ненасыщенным кардиолипином.

Важно отметить, что отсутствие ответов на поставленные выше вопросы не означает, что похожие модели уже сегодня не могут испытываться, например, на их способность уничтожать опухолевые клетки, которые, как хорошо известно, устойчивы к индукторам апоптоза. Авторами данной работы ранее было показано, что цитохром *c*, окруженный примерно тридцатью молекулами ненасыщенного кардиолипина (цитохром *c* – кардиолипиновые инвертированные наночастицы), приводит к гибели опухолевых клеток [11], что подтверждает необходимость детального исследования подобных белок-липидных взаимодействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В настоящей работе были использованы следующие реактивы: цитохром *c* лошадиного сердца (Cat# C7752, Sigma-Aldrich, США); фосфолипиды: 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DOPC, 850375P Avanti, США); 1',3'-бис[1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфо]-глицерол (натриевая соль) (TMCL, 750332P Avanti, США); 1',3'-бис[1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфо]-глицерол (натриевая соль) (TOCL, 710335P Avanti, США); β -BODIPY® 530/550 C5-NPC (2-(4,4-дифлюоро-5,7-дифенил-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен-3-пентаноил)-1-гексадеканоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) (BODIPY-PC, D3815, Invitrogen, США).

Приготовление липосом. Для приготовления липосом навеску каждого фосфолипида растворяли в хлороформе, полученные растворы смешивали в нужных молярных пропорциях, а затем хлороформ полностью удаляли под струей аргона в течение 5 мин. К полученным фосфолипидным пленкам добавляли фосфатный буфер (10 мМ, pH 7.4) и энергично перемешивали в течение 30 с до получения грубой фосфолипидной суспензии, которую озвучивали в ультразвуковой ванне (35 кГц) в течение 10 мин до образования прозрачной опалесцирующей суспензии липосом. Свежеприготовленные растворы сразу же использовали для измерения флуоресценции. В ре-

зультате вышеописанной процедуры приготовления были получены липосомы трех качественно различных составов:

- содержащие DOPC (DOPC (198 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ));
- содержащие TOCL (DOPC (158 мкМ) + TOCL (40 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ));
- содержащие TMCL (DOPC (158 мкМ) + TMCL (40 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ)).

Измерение тушения флуоресценции BODIPY-PC при добавлении цитохрома *c*. Измерение тушения флуоресценции BODIPY-PC, содержавшегося в равных количествах во всех приготовленных липосомах, выполнялось на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 (Shimadzu, Япония). Измерения проводили при $\lambda_{\text{ex}} = 534$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 570$ нм. В этом случае при добавлении цитохрома *c* к липосомам, содержащим BODIPY-PC, наблюдалось тушение флуоресценции (в диапазоне концентраций цитохрома *c* 0–30 мкМ) (рис. 1).

Анализ данных. Обработку результатов всех измерений, построение описательной статистики и статистическую обработку выполняли в MS Excel (версия 2410, сборка 16.0.18129.20158). Результаты описательной статистики представлены в формате «среднее \pm стандартное отклонение». Для оценки статистических различий использовали *t*-критерий. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тушение флуоресценции липосом при взаимодействии с цитохромом *c*. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что стехиометрия взаимодействия цитохрома *c* с митохондриальными фосфолипидами заметно отличается как от простой «якорной» модели, где один цитохром *c* взаимодействует с одним фосфолипидом, так и от описанной выше модели электростатических взаимодействий, говорящих о компенсации восьми положительных зарядов цитохрома *c* (при pH 7.4) четырьмя молекулами кардиолипина с зарядом -2 [10].

Ранее мы показали образование наноконкомплекса цитохрома *c* с кардиолипином, который представляет собой цитохром *c*, окруженный несколькими десятками молекул фосфолипидов, и с практической точки зрения характеризуется высокой эффективностью в отношении индукции гибели онкологических клеток [11], однако механизмы его образования только начали изучаться.

В данной работе для исследования стехиометрии взаимодействия цитохрома *c* с фосфолипидными липосомами был применен метод тушения флуоресцентно-меченного фосфолипида BODIPY-PC, входящего в состав липосом, содержащих DOPC, TMCL и TOCL. Тушение достига-

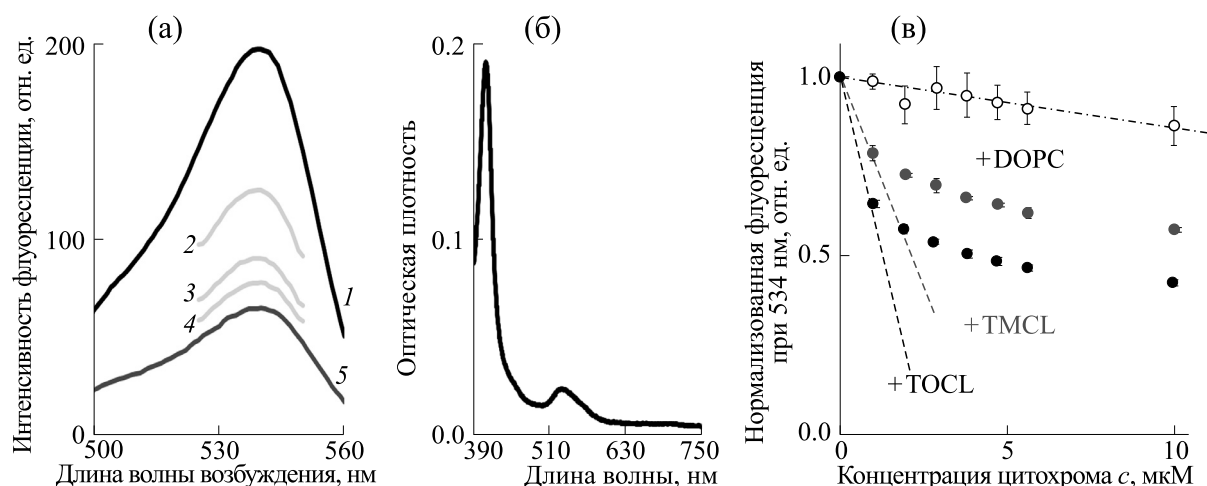


Рис. 1. Тушение цитохромом *c* флуоресценции липосом, содержащих BODIPY-PC. (а) — Изменение спектров возбуждения флуоресценции липосом, содержащих TOCL и 1% BODIPY-PC, при добавлении возрастающих концентраций цитохрома *c*. Содержание образца: TOCL (40 мкМ) + DOPC (158 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ). Цитохром *c* добавляли к образцам до конечных концентраций: 0,0, 1,0, 9,2, 17,9 и 30,3 мкМ (кривые 1–5 соответственно). Все образцы готовили на фосфатном буфере (10 мМ, pH 7,4). Представленные спектры возбуждения были записаны при длине волны эмиссии 570 нм. Измерения проводились при комнатной температуре. (б) — Спектр поглощения цитохрома *c* (1 мкМ в фосфатном буфере (10 мМ, pH 7,4)). Измерения проводили при комнатной температуре. (в) — Тушение флуоресценции липосом, содержащих 1% BODIPY-PC, при добавлении возрастающих концентраций цитохрома *c* (от 0 до 10 мкМ). Черные маркеры — титрование цитохрома *c* в присутствии липосом с TOCL (40 мкМ) + DOPC (158 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ). Серые маркеры — титрование цитохрома *c* в присутствии липосом с TMCL (40 мкМ) + DOPC (158 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ). Светлые маркеры — титрование цитохрома *c* в присутствии липосом с DOPC (198 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ). Пунктирные линии означают ожидаемую теоретическую аппроксимацию связывания цитохрома *c* с измеряемыми фосфолипидами. Все образцы готовили на фосфатном буфере (10 мМ, pH 7,4). Измерения проводили при комнатной температуре.

лось при добавлении цитохрома *c* и его взаимодействия с фосфолипидными мембранами.

На рис. 1а показано изменение спектров возбуждения флуоресценции BODIPY-PC при добавлении к ним цитохрома *c* в возрастающих концентрациях, а на рис. 1б — спектр поглощения цитохрома *c* в водном растворе, который характеризуется наличием полосы поглощения в области возбуждения и испускания цитохрома *c*.

Важно заметить, что полоса поглощения цитохрома *c*, которая находится в области от 500 до 600 нм, имеет не очень большую экстинкцию и ее влияние на интенсивность флуоресценции, по всей вероятности, будет невелико. С гораздо большей вероятностью можно предположить, что флуоресценция BODIPY-PC подавляется расположенным поблизости от флуорофора атомом железа гема цитохрома *c*. При этом расстояние между железом гема и флуоресцентной меткой BODIPY-PC будет определяться силой взаимодействия цитохрома *c* с фосфолипидом. Такие изменения хорошо выражены в случае, если в составе липосом присутствуют TMCL или TOCL. Для наглядности на рис. 1б представлен спектр поглощения 1 мкМ раствора цитохрома *c*, так как именно данная концентрация соответствует первой добавке на кривых титрования, представленных на рис. 1в. На рис. 1в хорошо видно, что в со-

держащих DOPC липосомах тушение флуоресценции происходит очень слабо, и визуально мы почти не можем увидеть отличий в флуоресценции DOPC-содержащих липосом при первой добавке цитохрома *c*. Дальнейшая последовательность титрований цитохромом *c* липосом, содержащих DOPC, приводит к небольшому уменьшению флуоресценции, которое, с одной стороны, обусловлено динамическим тушением и экранированием, а с другой, небольшим эффектом разбавления. Такое поведение экспериментальной модели вполне предсказуемо и соответствует теоретически ожидаемому, указанному соответствующей аппроксимацией экспериментальных результатов (верхняя черная пунктирная линия). Данная линия примерно параллельна отрезку между двумя точками, соединяющими между собой значение нормализованной флуоресценции до добавки цитохрома *c* со значением при концентрации цитохрома *c* 1 мкМ.

Однако если в составе липосом присутствует TMCL или TOCL, наблюдаются другие явления. Две последовательности экспериментальных точек (серая, которая соответствует добавкам цитохрома *c* к содержащим TMCL липосомам) и обозначенные черными маркерами добавки возрастающих концентраций цитохрома *c* к содержащим TOCL липосомам показывают ряд

интересных свойств. Так, во-первых, тушение флуоресценции зонда BODIPY-PC, входящего в состав TMCL- или TOCL-содержащих липосом, происходит намного быстрее, а во-вторых, что поведение экспериментальных точек никак не может соответствовать теоретически ожидаемому, которое так же, как и в случае с содержащими DOPC липосомами, обозначено пунктирными прямыми. Согласно теоретической прямой, флуоресценция BODIPY-PC, входящего в состав TOCL-содержащих липосом, должна полностью потушиться менее чем при 2.5–3.0 мкМ добавленного цитохрома *c*, а для аналогичных, но содержащих TMCL липосом — при 5–6 мкМ. Результаты экспериментальных измерений показывают, что сразу после первой добавки цитохрома *c* все последующие добавки все меньше тушат флуоресценцию, что больше характерно для постепенного некооперативного связывания. Такое поведение системы совершенно не соответствует ранее обсуждаемым моделям цитохром *c*-фосфолипидного взаимодействия, но которое можно рассчитать на основании результатов выполненных измерений. Последующие разделы данной публикации будут посвящены описанию именно данного расчета.

Оценка параметров связывания цитохрома *c* с липосомами, содержащими различные фосфолипиды. Для оценки эффективности связывания цитохрома *c* с липосомами мы определяли изменения интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 534 нм (эмиссию флуоресценции регистрировали при 570 нм). Полученная зависимость имеет убывающий характер (данные не представлены), и не может быть аппроксимирована уравнением Ленгмюра.

Чтобы компенсировать эту особенность, все результаты были инвертированы, т. е. нанесены на график в обратных координатах по нормализованным значениям интенсивности флуоресценции (рис. 2а). После этого оценивали приращение полученного значения по оси ординат при каждом последующем добавлении цитохрома *c*. Важно отметить, что для компенсации погрешностей разведения при расчетах использовали только первые 5 добавлений цитохрома *c* (рис. 2б,в).

Из результатов аппроксимации, выполненной, как показано на рис. 2а, были рассчитаны значения стационарных констант диссоциации, характеризующие взаимодействие липосом разного качественного состава с цитохромом *c*, а также асимптотическое значение максимального насыщения (B_{\max}) (табл. 1), которое будет использовано для расчета стехиометрии взаимодействия цитохрома *c* с липидами (рис. 2г,д). Эти значения рассчитаны теоретически на основе уравнений, полученных для всех измеренных моделей (аналогично примеру, показанному на рис. 2а), а так-

же с учетом доступности фосфолипидов для взаимодействия с цитохромом *c*, что соответствует параметру насыщения (B_{\max}), показанному в табл. 1.

На рис. 2г показан расчет стехиометрии взаимодействия цитохрома *c* с TOCL и TMCL, значения которых составляют 25 ± 7 и 7 ± 2 соответственно. На рис. 2д аналогичный расчет был выполнен для взаимодействия цитохрома *c* с липосомами, содержащими DOPC. Однако, следует отметить, что в случае DOPC этот расчет заранее неверен, поскольку все рассчитанные для DOPC значения не соответствуют статистическим критериям. Расчет для DOPC был выполнен только для чистоты эксперимента. Коэффициенты корреляции, характеризующие качество аппроксимации представленных результатов, составили 0.99 для липосом, содержащих TOCL и TMCL, но в то же время для липосом, содержащих DOPC, корреляцию даже не удалось оценить ($R^2 = 0.27$).

Полученные результаты полностью подтверждают наши предположения о формировании вокруг цитохрома *c* так называемых кардиолипидных сфер (наночастиц), которые проявляют высокую пероксидазную активность. Данная активность вызывает гибель опухолевых клеток, чувствительных к лекарствам (A2780) и устойчивых к доксорубину (A2780-Adr) [11]. Однако теперь при помощи флуоресценции много проще подбирать условия формирования данных наночастиц для мембран различного качественного состава. Вариации качественного состава липидов необходимы как для фундаментальных исследований, связанных, например, с переключением механизмов клеточной гибели с апоптотического на ферроптотический, а также для прикладных, где нужно регулировать пероксидазную активность комплексов цитохрома *c* с липидами таким образом, чтобы инициировать процессы гибели преимущественно в патологических, а не в здоровых клетках.

ВЫВОДЫ

Оценка параметров взаимодействия цитохрома *c* с TOCL, TMCL и с содержащими DOPC липосомами в присутствии BODIPY-PC показала, что стехиометрия такого взаимодействия составила 25 ± 7 для липосом, содержащих TOCL, и 7 ± 2 для липосом, содержащих TMCL. Для липосом, содержащих DOPC, этот параметр оценить невозможно, на основании чего можно сделать вывод, что цитохром *c* очень слабо взаимодействует с диолеил фосфатидилхолином, в то время как его взаимодействие с липосомами, содержащими TOCL и TMCL, происходит с гораздо большей эффективностью.

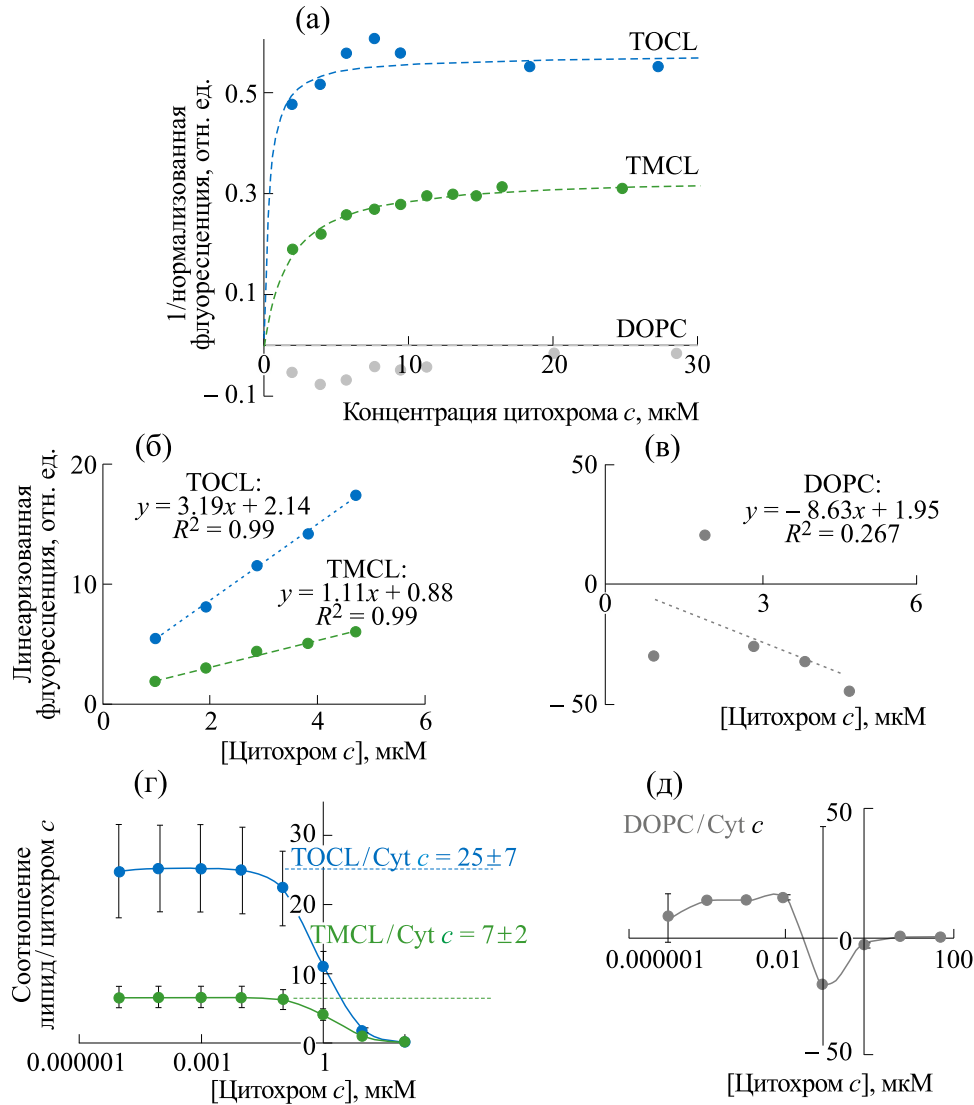


Рис. 2. Аппроксимация значений обратной нормализованной флуоресценции по уравнению Лэнгмюра с последующим расчетом констант взаимодействия цитохрома *c* с мембранами липосом, содержащими различные фосфолипиды. (а) – Изменение обратной нормализованной флуоресценции при добавлении цитохрома *c*: синяя кривая – насыщение TOCL-содержащих липосом (TOCL (40 мкМ) + DOPC (158 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ)), титрованных цитохромом *c*; зеленая кривая – насыщение TMCL-содержащих липосом (TMCL (40 мкМ) + DOPC (158 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ)), титрованных цитохромом *c*; серая кривая – насыщение содержащих фосфатидилхолин липосом (DOPC (198 мкМ) + BODIPY-PC (2 мкМ)), титрованных цитохромом *c*. (б) – Линеаризация результатов для липосом, содержащих TOCL или TMCL (из результатов, представленных на рис. 2а). (в) – Линеаризация результатов для липосом, содержащих DOPC (из результатов, представленных на рис. 2а). (г) – Расчет стехиометрии комплексов TOCL/Cyt *c* или TMCL/Cyt *c*. (д) – Расчет стехиометрии комплексов DOPC/Cyt *c*.

Таблица 1. Константы диссоциации и максимумы насыщения при взаимодействии цитохрома *c* с фосфолипидами липосом

| Состав липосом | K_d | SD | B_{max} | SD |
|---------------------------------|----------|----------|-----------|----------|
| 20%TOCL + 79%DOPC + 1%BODIPY-PC | 5.44E–07 | 1.13E–07 | 6.07E–01 | 1.54E–01 |
| 20%TMCL + 79%DOPC + 1%BODIPY-PC | 9.10E–07 | 5.33E–07 | 3.28E–01 | 1.68E–02 |
| 99%DOPC + 1%BODIPY-PC | 4.44E+04 | 8.64E+04 | 1.03E-03 | 2.05E–03 |

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Настоящее исследование было поддержано при финансовой поддержке Российского научного фонда (гранты №№ 19-14-00244 и 24-25-00292).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Halder K. Apoptosis: From oncogenesis to oncotherapy. *Int. J. Exper. Res. Rev.*, **40** (Spl Volume), 200–216 (2024). DOI: 10.52756/ijerr.2024.v40spl.017
2. Arora D., Taneja Y., Sharma A., Dhingra A., and Guarve K. Role of apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis: An explicative review. *Curr. Rheumatol. Rev.*, **20** (1), 2–13 (2024). DOI: 10.2174/1573397119666230904150741
3. Gao X., Ma C., Liang S., Chen M., He Y., and Lei W. PANoptosis: Novel insight into regulated cell death and its potential role in cardiovascular diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.*, **54** (3), 74–96 (2024). DOI: 10.3892/ijmm.2024.5398
4. Kagan V. E., Tyurina Y. Y., Sun W. Y., Vlasova I. I., Dar H., Tyurin V. A., Amoscato A. A., Mallampalli R., van der Wel P. C. A., He1 R. R., Shvedova A. A., Gabrilovich D., and Bayir H. Redox Phospholipidomics of enzymatically generated oxygenated phospholipids as specific signals of programmed cell death. *Free Radic. Biol. Med.*, **147**, 231–241 (2020). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.028
5. 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., Vlasova I. I., Zhao Q., Zou M., Di P., Svistunenko D. A., Kurnikov I. V., and Borisenko G. G. Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.*, **1**(4), 223–232 (2005). DOI: 10.1038/nchembio727
6. Firsov A. M., Kotova E. A., Korepanova E. A., Osipov A. N., and Antonenko Y. N. Peroxidative permeabilization of liposomes induced by cytochrome *c*/cardiolipin complex. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1848** (3), 767–774 (2015). DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.11.027
7. Puchkov M. N., Vassarais R. A., Korepanova E. A., and Osipov A. N. Cytochrome *c* produces pores in cardiolipin-containing planar bilayer lipid membranes in the presence of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1828** (2), 208–212 (2013). DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.10.002
8. Pessoa J. Live-cell visualization of cytochrome *c*: a tool to explore apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.*, **49** (6), 2903–2915 (2021). DOI: 10.1042/BST20211028
9. Stepanov G., Gnedenko O., Mol'nar A., Ivanov A., Vladimirov Y., and Osipov A. Evaluation of cytochrome *c* affinity to anionic phospholipids by means of surface plasmon resonance. *FEBS Lett.*, **583** (1), 97–100 (2009). DOI: 10.1016/j.febslet.2008.11.029
10. Proskurnin M. A., Proskurnina E. V., Galimova V. R., Alekseev A. V., Mikheev I. V., and Vladimirov Y. A. Composition of the cytochrome *c* complex with cardiolipin by thermal lens spectrometry. *Molecules*, **28** (6), 2692 (2023). DOI: 10.3390/molecules28062692
11. Vladimirov Y. A., Sarisozen C., Vladimirov G. K., Filipczak N., Polimova A. M., and Torchilin V. P. The cytotoxic action of cytochrome *C*/cardiolipin nanocomplex (Cyt-CL) on cancer cells in culture. *Pharm. Res.*, **34** (6), 1264–1275 (2017). DOI: 10.1007/s11095-017-2143-1

Stoichiometry of the Formation of Physiologically Active Cytochrome C Complexes with Cardiolipin

G.O. Stepanov*, G.K. Vladimirov**, ***, I.V. Kirilina*, A.R. Guselnikova*, V.I. Tihonova*, P.D. Vinogradova*, A.N. Osipov*, Yu.A. Vladimirov**, ***

*Department of General and Medical Biophysics, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

**Department of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovskiy prosp. 27/1, Moscow, 119192 Russia

***Kurchatov Complex of Crystallography and Photonics, National Research Centre "Kurchatov Institute", Leninsky prosp. 59, Moscow, 119333 Russia

The major goal of this work was to study the stoichiometry of the interaction of cytochrome C with tetraoleoyl- or tetramyristoyl-cardiolipin. Complexes of cytochrome C with phospholipid play one of the main roles in apoptotic processes. This study was conducted using fluorescently labeled phosphatidylcholine (BODIPY-PC). The fluorescence quenching of the BODIPY-PC probe after its interaction with cytochrome C was measured. Calculations of the fluorescence quenching results allowed us to determine the stoichiometry of the cytochrome C complexes formed with phospholipids. For complexes containing tetraoleoyl, stoichiometry corresponded to the ratio tetraoleoyl : cytochrome C equal to 25 ± 7 , and for tetramyristoyl the ratio tetramyristoyl : cytochrome C – 7 ± 2 . Obtained results may indicate a difference in the affinity of cytochrome C for saturated and unsaturated types of cardiolipin, despite the same electrostatic characteristics of the molecules. It can be expected that the discovered features of the interaction of cytochrome C with cardiolipin will eventually help determine the intensity and direction of apoptotic reactions.

Keywords: apoptosis, cytochrome C, cardiolipin, cytochrome C complex with cardiolipin, fluorescently labeled BODIPY phosphatidylcholine