

Определение равновесных констант диссоциации цитохрома С с фосфолипидами липосомальных мембран

Научный руководитель – Степанов Герман Олегович

Сидорова К.О.¹, Кузнецова А.Л.², Макарова Н.В.³

1 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: ksenyasidorova@inbox.ru*; 2 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: ton_kuz@mail.ru*; 3 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: natalia3517257@mail.ru*

Вопрос взаимодействия цитохрома С с мембранами, содержащими анионные липиды, остается перспективным для исследований. Известно, что при взаимодействии с кардиолипин-содержащими мембранами резко повышается пероксидазная активность цитохрома С, что в свою очередь приводит к запуску запрограммированной клеточной гибели [1]. Однако, не до конца изученными остаются химические константы взаимодействия цитохрома С с фосфатидной кислотой [2]. В связи с этим, задачей настоящего исследования являлась оценка равновесных констант диссоциации цитохрома С с фосфатидилхолиновыми мембранами, содержащими фосфатидную кислоту.

Выбранная экспериментальная модель представлена липосомами, содержащими ди-олеил-фосфатидилхолин и ди-олеил-фосфатидную кислоту, в состав которых также входит фосфатидилхолин с флуоресцентной меткой BODIPY. Было установлено, что при титровании флуоресцентно-меченных липосом возрастающими концентрациями цитохрома С, интенсивность флуоресценции снижается, что обусловлено тушением флуоресцентной метки близко расположенным железом гема цитохрома С. Данное тушение специфично проявляется только если липосомы содержат фосфатидную кислоту. Таким образом, по тушению флуоресценции липосом в присутствии цитохрома С можно определить равновесную константу диссоциации в зависимости от наличия или отсутствия в составе липосом различных фосфолипидов, в том числе фосфатидной кислоты. Все измерения проведены методами спектрофлуориметрии и спектрофотометрии, при помощи которых были определены спектры поглощения цитохрома С, а также спектры возбуждения и испускания BODIPY-меченных липосом. Оценивалось изменение интенсивности флуоресценции липосом при добавлении цитохрома С.

Равновесные константы диссоциации цитохрома С с липидами, содержащими ди-олеил-фосфатидилхолин и ди-олеил-фосфатидную кислоту, оказались равны $3,4 \times 10^{-5}$ М и $2,7 \times 10^{-6}$ М соответственно.

Результаты исследования подтверждают способность цитохрома С более выражено взаимодействовать с DOPA-содержащими липосомами. Полученные данные наглядно показывают связывание цитохрома С с ди-олеил-фосфатидной кислотой, что предшествует появлению у него высокой пероксидазной активности. Данная активность должна способствовать изменению проницаемости и порообразованию митохондриальных мембран, а следом и развитию процесса апоптотической гибели.

Источники и литература

- 1) Y. Y. Tyurina, I. Shrivastava, V.A. Tyurin, G. Mao, H. H. Dar, S. Watkins, M. Epperly, I. Bahar, A. A. Shvedova, B. Pitt, S. Wenzel, R. K. Mallampalli, Y. Sadovsky, D. Gabrilovich, J. S. Greenberger, H. Bayır, and V. E. Kagan. *Antioxidants & Redox Signaling*. Nov 2018.1333-1358.

- 2) Stepanov G., Gnedenko O., Mol'nar A., Ivanov A., Vladimirov Y., Osipov A.(2009), Evaluation of cytochrome c affinity to anionic phospholipids by means of surface plasmon resonance, FEBS Letters, 583

Иллюстрации

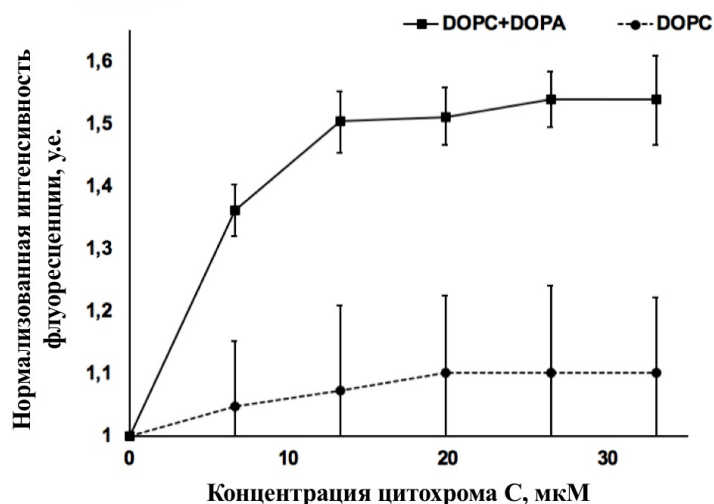


Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции липосом, содержащих фосфолипид DOPC, с добавлением фосфатидной кислоты DOPA, при растущих концентрациях цитохрома с. Содержание образцов: пунктирная линия: изменение интенсивности флуоресценции липосом, содержащих ди-олеил-фосфатидилхолин (DOPC) и фосфатидную кислоту (DOPA) в эквимольных концентрациях, а также фосфатидилхолин с флуоресцентной меткой BODIPY в концентрации 20 мкМ. Общая концентрация фосфолипидов 2 мМ; сплошная линия: изменение интенсивности флуоресценции липосом, содержащих диолеилфосфаидилхолин в концентрации 2 мМ. При добавлении возрастающих концентраций цитохрома с от 0 мкМ до 33,3 мкМ. Образцы были приготовлены на фосфатном буфере 10 мМ при pH=7.4.