

УДК 577.22,577.32

## КОМПЛЕКС ЦИТОХРОМА *c* С КАРДИОЛИПИНОМ В НЕПОЛЯРНОМ ОКРУЖЕНИИ\*

© 2015 А.С. Викулина, А.В. Алексеев,  
Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров\*\*

Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва; факс: +7(495)939-0126,  
электронная почта: yuvlad@mail.ru

Поступила в редакцию 26.05.15  
После доработки 09.06.15

Программируемая смерть клеток (апоптоз) играет важную роль в жизни многоклеточных организмов и развитии основных социально-значимых болезней человека. Образование комплекса цитохрома *c* с кардиолипином лежит в самом начале каскада реакций апоптоза, однако строение этого комплекса и механизм его участия в липидной пероксидации в мембранах митохондрий пока не расшифрованы. В предыдущем исследовании (Владимиров Ю.А. с соавт., 2011, *Кристаллография*) было показано, что комплекс цитохрома *c* с кардиолипином (Цит-КЛ) в концентрированном водном растворе выпадает в осадок, содержащий упорядоченные наносферы, образованные молекулами цитохрома *c* с измененной конформацией, которые окружены монослоем кардиолипина и в целом гидрофобны. В настоящей работе удалось получить раствор комплекса Цит-КЛ в хлороформе с соотношением липид/белок  $77 \pm 11$ , а также в гексане. Исследование свойств растворов комплекса Цит-КЛ в гидрофобных средах позволит раскрыть их структуру и механизм их каталитического действия в толще липидного слоя биологических мембран.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** апоптоз, пероксидация липидов, цитохром *c*, кардиолипин, гидрофобное окружение.

Проблема программируемой смерти клеток (апоптоза) привлекает большое внимание биологов и врачей. Важную роль в развитии апоптоза играет цитохром *c* [1, 2]. На ранней стадии апоптоза белки межмембранного пространства митохондрий, включая цитохром *c*, выходят в окружающую цитоплазму и запускают каскад реакций, заканчивающихся апоптозом [3, 4]. Выходу цитохрома *c* из митохондрий обычно предшествует «митохондриальный стресс», обусловленный по большей части усиленным образованием свободных радикалов; он начинается с получения апоптотического сигнала извне либо от внутренних причин и заканчивается перекисным окислением липидов, набуханием матрикса и образованием гигантских пор в наружной митохондриальной мембране, выходом цитохрома *c* из митохондрий и запуском апоптоза [5–7]. Катализ липидной пероксидации осуществляют

Принятые сокращения: Цит-КЛ – комплекс цитохрома *c* с кардиолипином, ТОКЛ – 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипин.

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM15-157, 23.08.2015.

\*\* Адресат для корреспонденции.

главным образом молекулы цитохрома *c*, связанные с кардиолипином, входящим в состав внутренней мембраны митохондрий [1].

Исследованию пероксидазной функции комплекса цитохрома *c* с кардиолипином посвящен ряд работ с нашим участием [8–10]. В результате этих исследований были частично расшифрованы схемы реакций пероксидазного цикла, катализируемого комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, однако структура самого комплекса оставалась невыясненной.

Первые сведения о структуре комплексов липидов с белками, включая цитохром *c*, были получены в модельных системах методами оптической и электронной микроскопии, а также рентгеновской дифракции [11–13]. При растворении сухих пленок фосфолипидов в малом объеме воды образуются слоистые миелоноподобные структуры, которые, по мнению авторов, образованы двумя монослоями фосфолипида и двойным слоем молекул цитохрома *c* между ними [11]. При обработке ультразвуком эти структуры превращались в липидные везикулы. Однако в этих работах кардиолипин не использовался, и для понимания строения комплекса цитохрома *c* с кардиолипином они

дали немного. Значительный вклад в изучение мембраносвязанного комплекса цитохрома *c* с кардиолипином оказали работы с монослоями кардиолипин–цитохром *c* [14] и липосомами, состоящими из кардиолипина и фосфатидилхолина, к которым добавляли цитохром *c* [15, 16]. Браун и сотрудники предложили схему, согласно которой цитохром прикрепляется к поверхности липидного слоя мембран в основном электростатическими силами и собирает вокруг себя другие молекулы кардиолипина, остающиеся на поверхности мембран в виде кластеров. Вместе с тем было получено много данных о том, что при связывании цитохрома *c* с мембранами, содержащими анионные липиды, включая кардиолипин, происходит изменение конформации полипептидной цепи, что было показано измерениями поглощения в области 695 нм [9, 17–19], циркулярного дихроизма в области полосы Core (400–450 нм) [20–22], спектров флуоресценции цитохрома *c* [9, 23], ИК-спектров в области поглощения связи >NH $\cdots$  (Амид I и Амид II) [24]. Сказанное говорит о том, что, образуя комплекс с кардиолипином, вся молекула цитохрома *c* частично разворачивается или расплавляется [2]. Именно изменение конформации считается основной причиной появления у цитохрома *c* ферментативной активности, приводящей к липидной перекиссации внутренней мембраны митохондрий и, в конце концов, к апоптозу. Объяснение изменения конформации сводится по большей части к предположению, что одна из жирнокислотных цепей кардиолипина проникает в толщу молекулы цитохрома *c* и тем самым изменяет конформацию этого белка (см. обзоры [2, 25–29]). Однако появившиеся недавно работы с новыми объектами – гигантскими липосомами [30] и нерастворимыми в воде комплексами цитохрома *c* с кардиолипином (Цит-КЛ) [31] – и применение новых методов – конфокальной флуоресцентной микроскопии [30], флуоресцентной спектроскопии [9, 23] и рентгеноструктурного анализа [31] – заставили пересмотреть сложившиеся представления [10]. Было показано, что в присутствии кардиолипина (и других анионных липидов) цитохром *c* не просто прикрепляется к поверхности липидного слоя мембран, но способен «наматывать» этот слой на себя, образуя сферические наноструктуры (наносферы) Цит-КЛ [10, 31].

Характеристики наносфер были определены на основании данных малоуглового рентгеновского рассеяния осадка комплекса цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином, который выпадает из концентрированного водного раствора при смешивании небольшого (<10%) объема раство-

ра кардиолипина в метаноле и избытка водного раствора цитохрома *c*. Анализ периодических пиков на кривой рассеяния позволил заключить, что осадок состоит из регулярно упакованных наносфер диаметром 11,2 нм, в центре которых находится «расплавленная» молекула цитохрома *c* (размер 5,6 нм), а поверхность образована монослоем кардиолипина с заряженными головками, связанными с цитохромом *c* и жирнокислотными цепями, направленными наружу (комплексы Цит-КЛ). Стехиометрия кардиолипин–белок в Цит-КЛ была определена титрованием растворов цитохрома *c* кардиолипином с удалением осадка комплекса после каждой добавки липида и определением цитохрома *c* в супернатанте. Наносферы Цит-КЛ плохо растворяются в воде, но должны растворяться в неполярных растворителях. Однако попыток приготовить раствор наносфер, заведомо обладающих гидрофобной поверхностью, в гидрофобных растворителях, насколько нам известно, сделано не было, вероятно потому, что о самом существовании комплексов Цит-КЛ стало известно не так давно [31]. Правда, Дас с соавт. смогли сформировать комплексы цитохрома *c* с фосфатидилэтаноламином с молярным соотношением липид/белок 24, растворенные в изооктане, но получить подобные комплексы цитохрома *c* с кардиолипином им не удалось [32]. В настоящей работе были получены комплексы цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином в хлороформе и *n*-гексане и определено соотношение липид/белок в растворах. Полученные результаты подтверждают предложенную нами структуру комплекса цитохрома *c* с кардиолипином (наносферы Цит-КЛ) и послужат дальнейшему уточнению строения и механизма функционирования этого комплекса в мембранах митохондрий на ранних стадиях апоптоза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали цитохром *c* из сердца лошади («Sigma», США); 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипин (ТОКЛ) («Avanti Polar Lipids», США); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и КОН для приготовления 20 мМ фосфатного буферного раствора (рН 7,4), хлороформ, *n*-гексан и метанол квалификации не ниже х.ч. («Sigma», США); бидистиллированную деионизованную воду (установка очистки воды «Millipore Milli-Q», Франция) для приготовления буферного раствора, использованного в качестве растворителя цитохрома *c*.

Последовательность операций при приготовлении растворов комплекса Цит-КЛ в гидрофобном растворителе такова. Вначале готовят

раствор цитохрома *c* в фосфатном буферном растворе, к которому затем добавляют раствор кардиолипина в метаноле. Смесь перемешивают, по виду это прозрачный раствор красного цвета из-за содержащегося в нем цитохрома. В разных опытах мы добавляли разное процентное содержание метанола в пробу (см. подписи к рисункам). На втором этапе к раствору добавляют либо чистый хлороформ, либо смесь хлороформа с метанолом в соотношении 2 : 1. Эту смесь хорошо встряхивают, а затем оставляют на некоторое время, пока не произойдет расслоение растворов, или центрифугируют. Окраска нижнего раствора в алый цвет означает переход комплекса Цит-КЛ в хлороформ. Переход цитохрома *c* в хлороформ никогда не наблюдается в отсутствие кардиолипина в смеси. С помощью шприца с длинной иглой осторожно отбирают нижний раствор (обычно достаточно взять 80% объема нижней фазы) и переносят его либо в кювету для измерения спектров поглощения и количества цитохрома *c*, перешедшего в хлороформ, либо в пробирку роторного испарителя (ALSI-FT R213B, «Фармтех», Россия). После удаления всего растворителя с помощью роторного испарителя на дне пробирки остается темно-красная пленка, содержащая комплекс Цит-КЛ. Пленку можно растворить в каком-либо достаточно гидрофобном органическом растворителе, например, в гексане. Полученный раствор прозрачен и окрашен в розовый или красный цвет.

Измерение концентрации цитохрома *c* в водных и водно-метанольных растворах проводили спектрофотометрически (спектрофотометр SPECORD 200 со стеклянными кюветами толщиной 1 см, «Analytic Jena», Германия), используя калибровочные графики для стандартных растворов белка в тех же растворителях. Измерение концентрации комплекса Цит-КЛ проводили, исходя из предположения, что поглощение в максимуме при 407 нм одинаково у цитохрома *c* в водном растворе и в составе комплекса, растворенного в хлороформе. Это предположение подтверждается одинаковостью формы спектра цитохрома *c* в водных, водно-метанольных растворах и хлороформной фракции при всех длинах волн, исключая область максимума 695–700 нм.

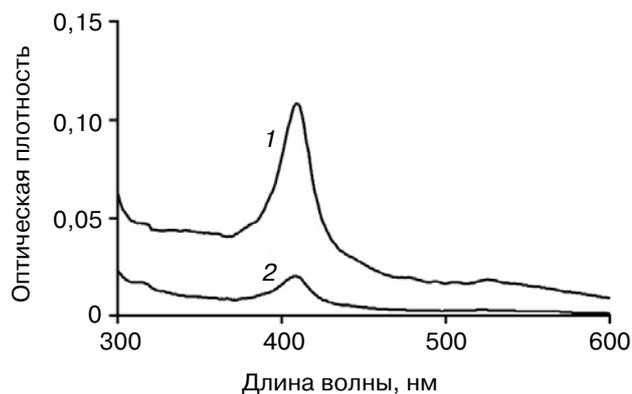
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наши многократные попытки перевести комплекс цитохрома *c* с кардиолипином, выпавший в осадок из водного раствора, в малополярные органические растворители, такие как гептан или хлороформ, не увенчались успехом. По-

видимому, гидрофобные взаимодействия между сложившимися в кристаллоподобную структуру наносферами (или нанотрубками), имеющими выраженную гидрофобную поверхность, настолько велики, а удалить полностью остатки воды из осадка настолько трудно, что растворитель не в состоянии оторвать друг от друга наносферы в составе твердой фазы. Чтобы это произошло, к растворителю нужно добавить более полярный растворитель, такой как метанол. Это хорошо видно на рис. 1, где приведены спектры поглощения растворов комплекса цитохрома *c* с ТОКЛ в гексане, полученные при разном содержании метанола в смеси перед добавлением хлороформа.

Видно, что при более высоком содержании метанола в водно-метанольной смеси комплекс Цит-КЛ переходит в хлороформ, а затем – в гексан значительно активнее (рис. 1, 1), чем при низком содержании метанола (рис. 1, 2). Если смесь цитохрома *c* с кардиолипином была растворена в растворителе с отношением вода/метанол 9 : 1, количество комплекса, переведенного в гексан, составляло 0,6 нмоль, а если отношение было 9 : 11, оно составляло уже 3,2 нмоль (из 20 нмоль цитохрома *c* в исходной смеси).

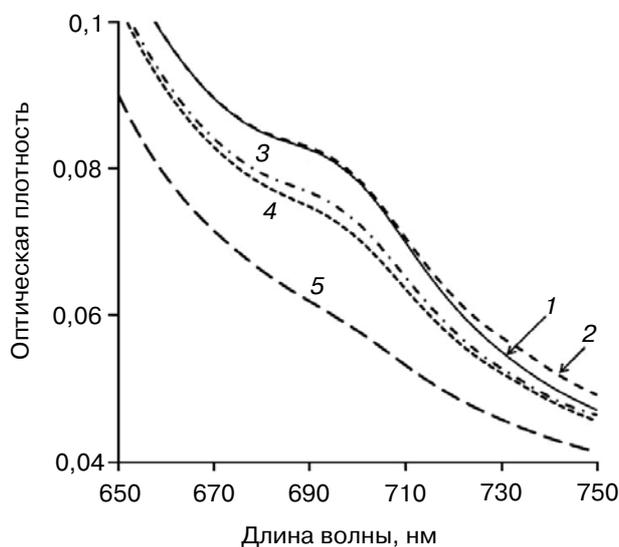
Переход комплекса Цит-КЛ из водно-метанольной фазы в хлороформ, как показали наши опыты, не зависит от того, добавляли ли мы основное количество метанола перед добавлением хлороформа или же в смеси с хлороформом. В последнем случае процедура перевода комплекса Цит-КЛ из водно-буферного раствора в хлороформ весьма напоминает метод выделения



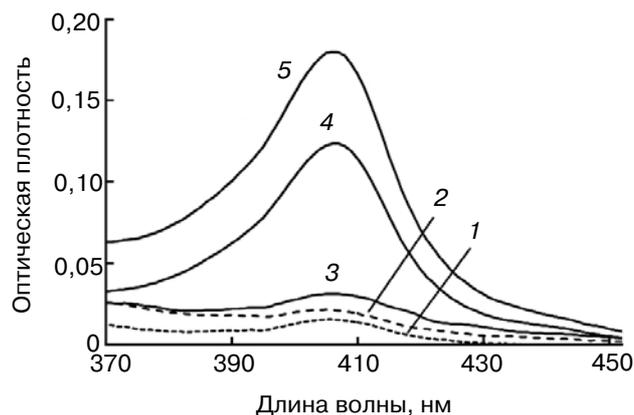
**Рис. 1.** Спектры поглощения комплекса цитохрома *c* и ТОКЛ в гексане: 1 — при экстракции хлороформом из раствора цитохрома *c* в смеси вода/метанол 10 : 11, 2 — в смеси вода/метанол 10 : 1. Исходное количество цитохрома составляло 20 нмоль, из которых в гексан перешло, согласно данным спектрофотометрии, в первом случае 0,6 нмоль, во втором — 3,2 нмоль

липидов по Фолчу, согласно которому к ткани добавляют 20-кратный избыток смеси хлороформа с метанолом 2 : 1 [33]. В наших опытах соотношение хлороформ/метанол/вода составляло 100 : 54 : 45. Согласно Фолчу при соотношении 100 : 50 : 37 (что близко к нашему) верхняя фаза состояла в основном из смеси воды и метанола (8 : 48 : 47), а нижняя — из хлороформа с небольшим количеством метанола и воды (86 : 14 : 1). Большинство липидов в такой системе переходят в хлороформ, а в системе, содержащей комплекс Цит-КЛ, в хлороформ переходят покрытые углеводородной оболочкой «шарики», спрятавшие внутри себя цитохром *c*.

Какова роль метанола в переходе в гидрофобную фазу комплекса Цит-КЛ? Известно, что при введении в раствор метанола цитохром *c* обратимо изменяет свою конформацию (частичное разворачивание) [34], что, в частности, приводит к исчезновению полосы поглощения при 695 нм (рис. 2) в результате разрыва координационной связи гемового железа с атомом серы в Met80. При образовании комплекса с кардиолипином полоса поглощения в этой области также исчезает [8, 9], а частичное разворачивание цитохрома *c* подтверждается появлением флуоресценции тирозиновых и триптофанового аминокислотных остатков [23] и приводит к увеличению объема белкового ядра наносфер Цит-КЛ [31]. Возможно, модифицируя конформацию



**Рис. 2.** Изменение конформации цитохрома *c* под действием метанола. Концентрация метанола в водном растворе цитохрома *c*: 1 — 0, 2 — 10, 3 — 20, 4 — 30, 5 — 40% (по объему). Исчезновение максимума поглощения при 695 нм говорит о разрыве координационной связи  $>Fe^{3+} \cdots S(Met80)$  в результате частичного разворачивания молекулы белка



**Рис. 3.** Спектры поглощения комплекса цитохрома *c*/ТОКЛ, экстрагированного в хлороформ, при различных молярных отношениях добавленного кардиолипина к цитохрому *c*: 1 — 0 : 1, 2 — 10 : 1, 3 — 15 : 1, 4 — 20 : 1 и 5 — 30 : 1. Экстракцию производили путем добавления равного объема хлороформа к 20 мкМ раствору цитохрома *c* и кардиолипина в водно-метанольной смеси (10 : 11 по объему)

цитохрома *c*, метанол тем самым облегчает формирование наносфер Цит-КЛ. С другой стороны, метанол может изменять свойства гидрофобной фазы, образуемой кардиолипином как в липосомах, так и в монослое на поверхности наносфер Цит-КЛ. Так или иначе, добавка метанола необходима для перевода комплекса Цит-КЛ в неполярный растворитель.

В отсутствие кардиолипина цитохром *c*, как уже говорилось, в хлороформ не переходит, независимо от того, добавлен или нет метанол в систему. Как видно на рис. 3, при отношении кардиолипина к цитохрому в исходной смеси 10 : 1 и даже 15 : 1 цитохром переходит в хлороформ в незначительном количестве (всего 1 и 4% от всего цитохрома в системе), тогда как при отношении липид/белок 20 : 1 и 30 : 1 доля гемопroteина, перешедшего в хлороформ, существенно возрастает (по данным спектрофотометрии до 24 и 37% соответственно).

То обстоятельство, что в хлороформ во всех наших опытах переходила лишь небольшая часть цитохрома, растворенного в водно-метанольной фазе, связано с тем, что он находился в избытке по сравнению с кардиолипином (т.е. в отношении белок/липид больше, чем конечное отношение цитохром *c* : ТОКЛ в хлороформе). В таких условиях в водном растворе формируется нерастворимый комплекс Цит-КЛ, состав которого при постепенном добавлении кардиолипина остается постоянным [31].

С учетом того, что при добавлении реактива Фолча все фосфолипиды переходят из исходного водного раствора в фазу хлороформ—мета-

нол, очевидно, что, разделив количество добавленного кардиолипина на количество цитохрома, перешедшего в хлороформ, мы получим молярное отношение липид/белок в гидрофобной фазе, которое можно рассматривать как отношение липид/белок в комплексе Цит-КЛ, который перешел в гидрофобную фазу. При добавлении достаточного количества кардиолипина (отношение ТОКЛ/цитохром *c* в водно-метанольной среде 20 : 1 и более) отношение ТОКЛ/цитохром *c* в метанольной фазе составляло  $77 \pm 11$ , что близко к значениям, полученным для комплексов Цит-КЛ в осадке из водно-буферных растворов [35]. Таким образом, комплексы Цит-КЛ могут быть экстрагированы раствором Фолча и переведены в хлороформ, а затем – и в гексан.

Полученные данные подтверждают ранее высказанное предположение о возможности существования в биологических мембранах обращенных мицелл, образованных цитохромом *c* в

окружении молекул кардиолипина [36]. Структура наносфер комплекса Цит-КЛ была ранее изучена [31]. Включение цитохрома *c* в оболочку из молекул кардиолипина дает возможность комплексу Цит-КЛ проникать в толщу липидного бислоя [10] и осуществлять катализ липидной перекисидации [1, 9], а также проходить через липидный бислой мембран [37]. Образование комплекса цитохрома *c* с кардиолипином играет, по всей вероятности, ключевую роль в запуске апоптоза, но строение этого комплекса и механизм его участия в липидной перекисидации в мембранах митохондрий расшифрованы пока еще далеко не до конца. Получение комплекса Цит-КЛ в виде раствора в неполярной среде предоставляет новые возможности для этих исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-01361а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.V., Vlasova, I.I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D.A., Kurnikov, I.V., and Borisenko, G.G. (2005) Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 223–232.
- 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.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O.T., and Doskeland, S.O. (1998) Injected cytochrome *c* induces apoptosis, *Nature*, **391**, 449–450.
- Skulachev, V.P. (1998) Cytochrome *c* in the apoptotic and antioxidant cascades, *FEBS Lett.*, **423**, 275–280.
- Skulachev, V.P. (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell, *FEBS Lett.*, **397**, 7–10.
- Skulachev, V.P. (2000) How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 1056–1059.
- Владимиров Ю.А. (2002) Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз, *Биол. мембраны*, **19**, 356–377.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А., Осипов А.Н., Каган В.Е. (2006) Механизм активации перекисидной активности цитохрома *c* кардиолипином, *Биохимия*, **91**, 1215–1224.
- 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.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Алексеев А.В. (2013) Молекулярные механизмы апоптоза. Структура комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, *Биохимия*, **78**, 1391–1404.
- Papahadjopoulos, D., and Miller, N. (1967) Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals, *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 624–638.
- Shibley, G.G., Leslie, R.B., and Chapman, D. (1969) X-ray diffraction study of the interaction of phospholipids with cytochrome *c* in the aqueous phase, *Nature*, **222**, 561–562.
- Shibley, G.G., Leslie, R.B., and Chapman, D. (1969) Small-angle X-ray scattering studies of cytochrome *c*-phospholipid complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **173**, 1–10.
- Quinn, P.J., and Dawson, R.M. (1969) The interaction of cytochrome *c* with monolayers of phosphatidylethanolamine, *Biochem. J.*, **113**, 791–803.
- Brown, L.R., and Wuthrich, K. (1977) A spin label study of lipid oxidation catalyzed by heme proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **464**, 356–369.
- 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.
- de Jongh, H.H., Ritsema, T., and Killian, J.A. (1995) Lipid specificity for membrane mediated partial unfolding of cytochrome *c*, *FEBS Lett.*, **360**, 255–260.
- Lee, I., Salomon, A.R., Yu, K., Doan, J.W., Grossman, L.I., and Huttemann, M. (2006) New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome *c* is tyrosine-phosphorylated *in vivo*, *Biochemistry*, **45**, 9121–9128.
- Nantes, I.L., Faljoni-Alario, A., Vercesi, A.E., Santos, K.E., and Bechara, E.J. (1998) Liposome effect on the cytochrome *c*-catalyzed peroxidation of carbonyl substrates to triplet species, *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 546–553.
- Sinibaldi, F., Fiorucci, L., Patriarca, A., Lauceri, R., Ferri, T., Coletta, M., and Santucci, R. (2008) Insights into

- cytochrome *c*-cardiolipin interaction. Role played by ionic strength, *Biochemistry*, **47**, 6928–6935.
21. Nantes, I.L., Zucchi, M.R., Nascimento, O.R., and Faljoni-Alario, A. (2001) Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome *c* and its association with membrane interfaces. A CD and EPR investigation, *J. Biol. Chem.*, **276**, 153–158.
  22. Letellier, L., and Shechter, E. (1973) Correlations between structure and spectroscopic properties in membrane model system. Fluorescence and circular dichroism of the cytochrome *c*-cardiolipin system, *Eur. J. Biochem.*, **40**, 507–512.
  23. 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.
  24. Heimburg, T., and Marsh, D. (1993) Investigation of secondary and tertiary structural changes of cytochrome *c* in complexes with anionic lipids using amide hydrogen exchange measurements: an FTIR study, *Biophys. J.*, **65**, 2408–2417.
  25. 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.
  26. Bayir, H., Fadeel, B., Palladino, M.J., Witasz, E., Kurnikov, I.V., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Amoscato, A.A., Jiang, J., Kochanek, P.M., DeKosky, S.T., Greenberger, J.S., Shvedova, A.A., and Kagan, V.E. (2006) Apoptotic interactions of cytochrome *c*: redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 648–659.
  27. Kagan, V.E., Tyurina, Y.Y., Bayir, H., Chu, C.T., Kapralov, A.A., Vlasova, I.I., Belikova, N.A., Tyurin, V.A., Amoscato, A., Epperly, M., Greenberger, J., Dekosky, S., Shvedova, A.A., and Jiang, J. (2006) The “pro-apoptotic genes” get out of mitochondria: oxidative lipidomics and redox activity of cytochrome *c*/cardiolipin complexes, *Chem. Biol. Interact.*, **163**, 15–28.
  28. Kagan, V.E., Wipf, P., Stoyanovsky, D., Greenberger, J.S., Borisenko, G., Belikova, N.A., Yanamala, N., Samhan Arias, A.K., Tungekar, M.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ji, J., Klein-Seetharaman, J., Pitt, B.R., Shvedova, A.A., and Bayir, H. (2009) Mitochondrial targeting of electron scavenging antioxidants: regulation of selective oxidation vs random chain reactions, *Advanced Drug Deliv. Rev.*, **61**, 1375–1385.
  29. Huttemann, M., Pecina, P., Rainbolt, M., Sanderson, T.H., Kagan, V.E., Samavati, L., Doan, J.W., and Lee, I. (2011) The multiple functions of cytochrome *c* and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: from respiration to apoptosis, *Mitochondrion*, **11**, 369–381.
  30. Beales, P.A., Bergstrom, C.L., Geerts, N., Groves, J.T., and Vanderlick, T.K. (2011) Single vesicle observations of the cardiolipin-cytochrome *c* interaction: induction of membrane morphology changes, *Langmuir*, **27**, 6107–6115.
  31. Владимиров Ю.А., Ноль Ю.Ц., Волков В.В. (2011) Белково-липидные наночастицы, от которых зависит «быть или не быть» живой клетке, *Кристаллография*, **56**, 712–719.
  32. Das, M.L., Haak, E.D., and Crane, F.L. (1965) Proteolipids. IV. Formation of complexes between cytochrome *c* and purified phospholipids, *Biochemistry*, **4**, 859–865.
  33. 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.
  34. Jain, R., Sharma, D., and Kumar, R. (2013) Effects of alcohols on the stability and low-frequency local motions that control the slow changes in structural dynamics of ferrocycytochrome *c*, *J. Biochem.*, **154**, 341–354.
  35. Алексеев А.В. (2014) *Структура и функция комплекса цитохрома с с кардиолипином*. Дис. канд. биол. наук, МГУ, Москва, с. 129.
  36. de Kruijff, B., and Cullis, P.R. (1980) Cytochrome *c* specifically induces non-bilayer structures in cardiolipin-containing model membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **602**, 477–490.
  37. Bergstrom, C.L., Beales, P.A., Lv, Y., Vanderlick, T.K., and Groves, J.T. (2013) Cytochrome *c* causes pore formation in cardiolipin-containing membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 6269–6274.

## CYTOCHROME *c*–CARDIOLIPIN COMPLEX IN NONPOLAR ENVIRONMENT

A. S. Vikulina, A. V. Alekseev, E. V. Proskurnina, Yu. A. Vladimirov\*

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia;*  
*fax: +7(495)939-0126, E-mail: yuvlad@mail.ru*

Received May 26, 2015

Revision received June 9, 2015

Programmed cell death (apoptosis) plays an important role in the life of multicellular organisms and in the development of many socially significant human diseases. The cytochrome *c*–cardiolipin (Cyt-CL) complex is formed at the very beginning of the cascade of apoptotic reactions. Nevertheless, the structure of the complex and the mechanism of its participation in lipid peroxidation in mitochondrial membranes are not clear. In a previous work (Vladimirov, Yu. A., et al., *Crystallography Reports*, 2011, **56**, 553–559), it was shown that the Cyt-CL complex settles in a concentrated water solution, the sediment contains orderly nanospheres formed by cytochrome *c* molecules with changed conformation and surrounded by cardiolipin monolayer, and they are essentially hydrophobic. In this work, we obtained chloroform and hexane solutions of Cyt-CL with lipid/protein ratio of  $77 \pm 11$ . The conditions are described under which the solutions were obtained. Study of the properties of Cyt-CL solutions in hydrophobic media will reveal their structure and the mechanism of their catalytic activity inside the lipid layer of biological membranes.

*Key words:* apoptosis, lipid peroxidation, cytochrome *c*, cardiolipin, hydrophobic environment