

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 2788

Посвящается памяти Б.К. Вайнштейна

БЕЛКОВО-ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ, ОТ КОТОРЫХ ЗАВИСИТ “БЫТЬ ИЛИ НЕ БЫТЬ” ЖИВОЙ КЛЕТКЕ

© 2011 г. Ю. А. Владимиров, Ю. Ц. Ноль, В. В. Волков

*Институт кристаллографии РАН, Москва
E-mail: yuvlad@mail.ru*

Поступила в редакцию 28.02.2011 г.

В присутствии фосфолипида кардиолипина белок цитохром *c* образует водонерастворимый комплекс, выпадающий в осадок. Методами центрифугирования и спектрофотометрии показано, что молярное соотношение кардиолипин/цитохром *c* равно примерно 35/1. Осадок, по данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, представляет собой микрокристаллическую структуру с межплоскостными расстояниями ячейки кристалла 11.1 ± 1 нм. При недостатке кардиолипина структура и спектральные свойства цитохрома *c* над осадком не отличаются от свойств водного раствора цитохрома *c*.

ВВЕДЕНИЕ

Быть или не быть живой клетке нашего организма, решает сам организм, который либо включает деление клеток, либо их убивает и уничтожает. Способов удаления своих и чужих ненужных клеток, вероятно, всего два: фагоцитоз и апоптоз. Данная работа посвящена апоптозу.

Апоптоз – это выработанный в ходе эволюции довольно сложный механизм самоуничтожения клетки, которая получила “черную метку” – сигнал о том, что ей следует умереть [1–3]. Сигнал может прийти извне – существуют белки, апоптогены, запускающие каскад ферментативных реакций, которые приводят к разрушению клетки и удалению ее содержимого. Но он может прийти и изнутри, если по причине неблагоприятных условий, например при недостатке кислорода или интоксикации, нарушается работа внутриклеточных энергетических машин – митохондрий [4]. В обоих случаях началом апоптоза служит запуск реакции перекисного окисления липидов, которая приводит к “оксидативному стрессу” митохондрий, нарушению целостности митохондриальных мембран, и к выходу из митохондрий белка – цитохрома *c* [5–8]. Оказавшись в цитоплазме клетки, цитохром *c* запускает апоптоз, т.е. каскад ферментативных реакций, приводящих к разрушению клетки и ее последующему поеданию фагоцитами.

Реакция перекисного окисления липидов – решающее событие при запуске апоптоза – катализируется комплексом цитохрома *c* с фосфолипидом-кардиолипином (Цит-КЛ). Структура этого комплекса была предметом многих исследований, но все авторы исходили из одного общего

постулата, что комплекс образуется на поверхности фосфолипидного слоя мембран митохондрий (рис. 1). Молекула кардиолипина имеет полярную “головку”, несущую два отрицательных заряда, и четыре неполярных “хвоста” жирнокислотных цепей; благодаря отрицательным зарядам кардиолипина, к нему и присоединяется молекула цитохрома *c*, которая в водных растворах имеет в обычных условиях восемь положительных зарядов на поверхности глобулы. В настоящей работе показано, что дело обстоит совершенно иначе: комплекс Цит-КЛ представляет собой гидрофобную наночастицу диаметром около 110 Å, в центре которой находится молекула цитохрома *c*, полностью покрытая полярными головками примерно 40 молекул кардиолипина, хвосты которых образуют наружный слой наночастицы (рис. 2). Нельзя считать окончательно выясненным вопрос, все ли молекулы кардиолипина в комплексе погружают одну из жирнокислотных цепей в гидрофобную зону белковой глобулы или только часть из них. Размеры глобулы цитохрома увеличены в комплексе по сравнению со свободным цитохромом *c* в водной фазе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание кристаллов цитохрома c. Кристаллы цитохрома *c*, структура которых была изучена в данной работе, были получены А.И. Гребенко, на начальных стадиях использовавшая данные [9], где описана успешная кристаллизация цитохрома *c*. Кристаллизация проводилась методом висючей капли. Цитохром *c* в концентрации 24 мг/мл растворяли в 0.05М ка-

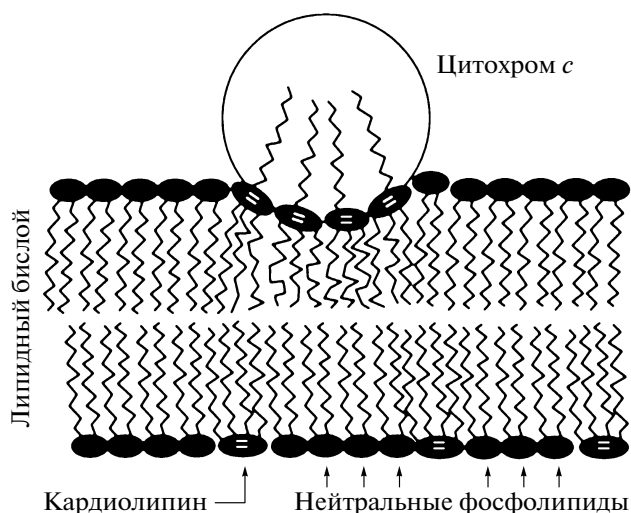


Рис. 1. Схема строения комплекса цитохрома с с кардиолипином ([18], рис. 7 с некоторыми изменениями). Комплекс образуется в основном благодаря притяжению отрицательно заряженных головок кардиолипина к положительно заряженным группам на поверхности белка. Одна из четырех жирнокислотных цепей проникает в гидрофобную зону белковой глобулы [19, 20].

лий-фосфатном буфере (рН 7.2), содержащем 20% ПЭГ-1000; объем капли составлял 16.3 мкл. В качестве противораствора использовали 30% ПЭГ-1000 в том же буфере; объем противораствора составлял 500 мкл. Рост кристаллов продолжался три недели, размер кристалла для измерения дифракции составлял 0.275×0.2 и 0.25×0.05 мм. В тех же условиях выращивались кристаллы из раствора, содержащего наряду с цитохромом с тетраолеилкардиолипин, добавленный из расчета: восемь молекул кардиолипина на одну молекулу цитохрома с. Размер выращенного кристалла, использованного для снятия рентгеновской дифрактограммы, составлял 0.4×0.2 мм. Кристаллы вылавливали из капли с помощью микропетли и помещали в капилляры для дальнейшего исследования методом рентгеновской дифракции.

Исследование малоуглового рентгеновского рассеяния. К раствору цитохрома с в 0.05М калий-фосфатном буфере (рН 7.2) добавляли тетраолеилкардиолипин (ТОКЛ), растворенный в метаноле так, чтобы конечная концентрация метанола не превышала 10%; молярное отношение ТОКЛ к цитохрому с составляло 4 : 1, 8 : 1 или 30 : 1 в разных опытах. Специальные опыты показали, что при концентрациях метанола менее 10% он не оказывал влияния на ферментативную активность, структуру и спектральные свойства цитохрома с. Общий объем пробы составлял 100 мкл. Раствор встряхивали и центрифугировали в течение 5 мин при 13 тыс. об/с. Если раствор содер-

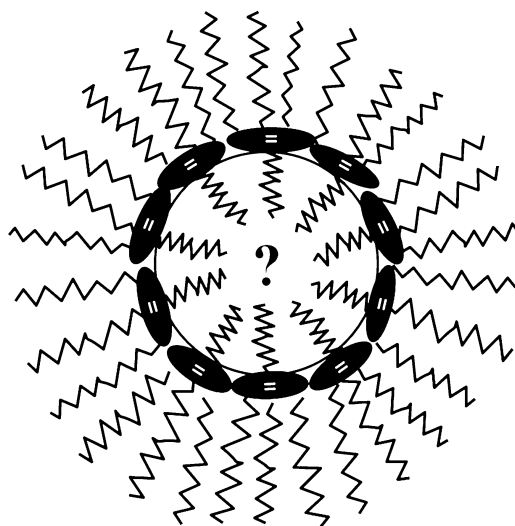


Рис. 2. Предполагаемая схема строения наночастицы Цит-КЛ – комплекса цитохрома с с кардиолипином.

жал как цитохром с, так и ТОКЛ, то в результате центрифугирования выпадал осадок бордового цвета. Измерение малоуглового рассеяния проводилось в осадке и в растворе над осадком (супернатанте).

Измерения интенсивности малоуглового рассеяния проводились на автоматическом малоугловом рентгеновском дифрактометре АМУР-К с однокоординатным позиционно-чувствительным детектором ОДЗ при фиксированной длине волны излучения λ , равной 0.1542 нм (CuK_α -линия острофокусной трубки ISO-DEBYEFLEX 3003 с медным анодом), и коллимационной системой Кратки. Энергетический спектр излучения формировали с помощью монохроматора из пиролитического графита. Число угловых отсчетов составляло для АМУР-К 0.2×8 мм при диапазоне углов рассеяния, соответствующем значениям модуля волнового вектора $0.1 < s < 12 \text{ nm}^{-1}$ ($s = 4\pi \sin \theta / \lambda$, 2θ – угол рассеяния). Образцы помещали в стеклянные капилляры (1.0 мм) со стенками толщиной 0.01 мм, камеру образца вакуумировали с помощью форвакуумного масляного насоса. Абсолютную калибровку измерений не проводили, так как определяемые параметры структуры не зависят от абсолютных значений интенсивности рассеяния. Экспериментальные данные были нормированы на интенсивность падающего пучка, после чего в них вводилась поправка на коллимационные искажения. В аналогичных условиях проводили измерения буферного раствора, интенсивность рассеяния от которого вычитали из данных рассеяния исследуемой системы.

Изучение соотношения кардиолипин:цитохром с в нерастворимом комплексе Цит-КЛ. Цитохром с

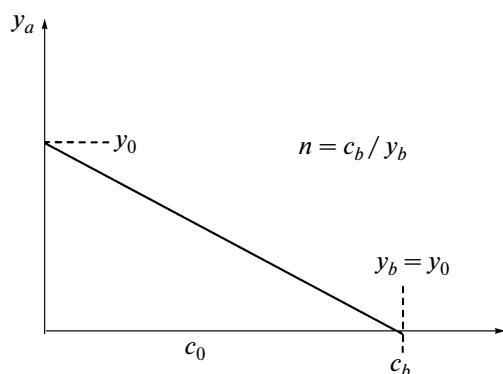


Рис. 3. Схема опытов по определению стехиометрического соотношения кардиолипин:цитохром c в Цит-КЛ комплексе: y_a — концентрация цитохрома, растворенного в воде (в супернатанте), y_b — концентрация цитохрома, связанного с кардиолипином (в осадке), y_0 — общая концентрация добавленного цитохрома c , c_0 — общая концентрация добавленного кардиолипина, c_b — концентрация кардиолипина, связанного с цитохромом (в осадке), n — молярное отношение кардиолипина к цитохрому в комплексе. Остальные объяснения — в тексте.

— белок, хорошо растворимый в воде. Кардиолипин, как и всякий другой фосфолипид, в воде образует не истинный, а коллоидный раствор: взвешенные частицы состоят из молекул, полярные группы которых обращены в водную фазу, а неполярные участки углеводородных хвостов жирных кислот сливаются друг с другом, формируя либо мицеллу, либо липосому, т.е. пузырек, образованный двойным слоем липидных молекул. Эти частицы остаются взвешенными в воде при обычных условиях центрифугирования.

При смешивании ТОКЛ и цитохрома c образуется бурый осадок водонерастворимого комплекса этих соединений (Цит-КЛ). Состав комплекса определяли, измеряя концентрацию цитохрома c в супернатанте до и после добавления определенного количества ТОКЛ. Схема опытов дана на рис. 3. По мере добавления кардиолипина к раствору цитохрома c с концентрацией y_0 происходит связывание белка и его удаление из раствора при центрифугировании, в результате чего концентрация свободного цитохрома y_0 убывает в линейной зависимости от концентрации c_0 добавленного кардиолипина. При $y_a = 0$ весь цитохром находится в связанном состоянии, его концентрация в Цит-КЛ комплексе y_b равна исходной концентрации y_0 цитохрома, добавленного в систему первоначально. Таким образом, находим концентрацию связанного цитохрома в точке эквивалентности $y_b = y_0$. С другой стороны, известно, сколько именно добавили кардиолипина в раствор до момента эквивалентности, т.е. знаем c_b (рис. 3). Разделив c_b на y_b , получаем искомую ве-

личину молярного отношения n кардиолипина к цитохрому в Цит-КЛ-комплексе.

Измерение спектров поглощения цитохрома в водной фазе. Вначале измеряли спектр поглощения раствора цитохрома c в 0.05М калий-фосфатном буфере (рН 7.2) в области 500–750 нм. Затем добавляли к этому раствору цитохрома (3 мл) 6 мкл раствора кардиолипина в метаноле. Смесь перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин (11 тыс. об/с). Осторожно собирали всю жидкость над осадком и измеряли спектр поглощения в этой жидкости (т.е. в супернатанте). Процедуру добавления 6 мкл раствора кардиолипина, перемешивания, центрифугирования и измерения спектров поглощения супернатанта повторяли до тех пор, пока оптическая плотность раствора при 525 нм (максимум поглощения ферри-формы цитохрома c) не переставала падать, а напротив, начинала расти вследствие светорассеяния коллоидного раствора несвязанного кардиолипина. Расчет стехиометрического соотношения кардиолипин : цитохром c в Цит-КЛ проводили в соответствии со схемой на рис. 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные белковой кристаллографии. Сбор рентгенодифракционных данных для кристаллов проводился на синхротроне в Дарсбери (Daresbury Laboratory, Великобритания).

Структура решена методом молекулярного замещения (ССР4) и далее уточнена по программам Refmak (ССР4 [10]) и Phenix [11]. Правка модели (включение в структуру молекул воды, добавление альтернативных конфигураций аминокислотных остатков и др.) производилась в программе Coor. В таблице приведены некоторые характеристики кристаллов цитохрома c , выращенных при различных условиях, а на рис. 4 — среднеквадратичные отклонения атомов основных цепей двух изученных структур цитохрома c , кристаллы которых были выращены в присутствии и в отсутствие кардиолипина. Анализ электронной плотности для кристаллов, выращенных в присутствии кардиолипина, не позволил выявить молекул КЛ. По всем показателям две сравниваемые структуры были идентичны в пределах ошибки опыта. В частности, различия в координатах соответствующих атомов лежали в пределах неопределенности в оценке координат, что согласуется с тепловыми колебаниями (кривые на рис. 4).

Эти данные показывают, что при выращивании кристаллов в смеси цитохрома c с кардиолипином формировались кристаллы чистого цитохрома c . Последующие эксперименты, проведенные методами малоуглового рассеяния и спектрофотометрии, показали, что комплекса ЦИТ-КЛ вообще не было в растворе, поскольку он нерастворим в во-

де, а при соотношении кардиолипин : цитохром с менее 35:1 в водном растворе содержится практически один чистый цитохром с, кристаллы которого и образуются в этих условиях.

Данные малоуглового рассеяния рентгеновских лучей надосадочной жидкости и осадка, образующегося после смешивания цитохрома с и кардиолипина. При смешивании кардиолипина с цитохромом с происходило выпадение осадка, который хорошо виден лишь при достаточно больших количествах компонентов смеси и после центрифугирования раствора. На рис. 5 показаны данные малоуглового рассеяния рентгеновских лучей двух образцов: чистого цитохрома с и надосадочной жидкости после центрифугирования смеси кардиолипина с цитохромом с.

Не считая шумов, формы кривых малоуглового рассеяния практически не отличались. Обработка кривых рассеяния с помощью программы DAMMIN, основанной на методе моделирования пространственной структуры наночастиц малыми объемными элементами [12], позволила восстановить форму молекул белка. Оказалось, что молекулы белка в обоих растворах имеют сходную глобулярную форму эллипсоида с размерами $4.0 \times 3.5 \times 3.0 (\pm 0.1)$ нм (рис. 6), что в общем соответствует размерам и форме белковой молекулы, полученным методом рентгеноструктурного анализа кристаллов цитохрома с в наших опытах.

Полученные данные показывают, что в смеси кардиолипина с цитохромом образующийся комплекс нерастворим в воде и выпадает в осадок, а избыток цитохрома в растворе никакого комплекса с липидом не образует, так как иначе обнаружили бы молекулы с измененным объемом, чего не происходит.

Были проведены также опыты по малоугловому рассеянию осадка, суспендированного в небольшом объеме растворителя. Полученные дан-

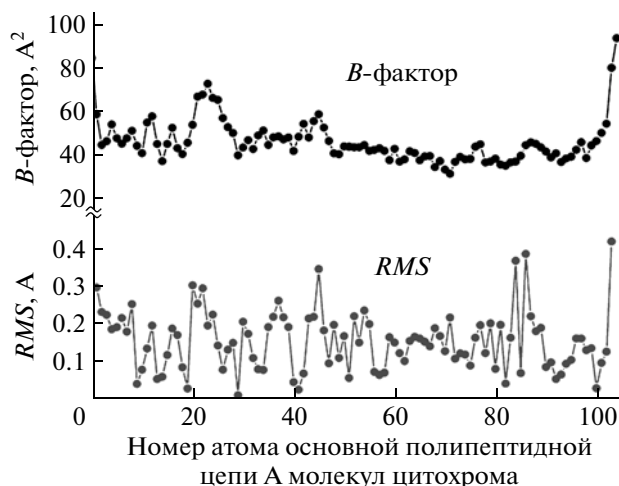


Рис. 4. Величины B-факторов атомов основной цепи молекулы цитохрома с, выращенного в присутствии кардиолипина и среднеквадратичные отклонения атомов основной цепи молекулы нативного цитохрома с от атомов основной цепи цитохрома с, закристиализованного в присутствии кардиолипина (RMS). Данные приведены для цепочки А каждой из моделей.

ные показаны на рис. 7. Оказалось, что кривая малоуглового рассеяния имеет пики при значениях вектора рассеяния 0.056; 0.111 и 0.168. Это в точности соответствует отношению 1:2:3, из чего можно заключить, что пики соответствуют рефлексам 1-го, 2-го и 3-го порядков соответственно. По уравнению $d = \frac{2\pi}{s}$ можно найти максимальное межплоскостное расстояние d в структуре монокристаллов комплекса цитохрома с и кардиолипина, которое равно 11 ± 1 нм.

Определение отношения кардиолипин : цитохром с в нерастворимом комплексе Цит-КЛ. На рис. 8

Сравнение характеристик кристаллов цитохрома с, выращенных в отсутствие и в присутствии кардиолипина

Параметры	Кристаллы выращены в среде без кардиолипина	Кристаллы выращены в среде с кардиолипином
Пр. гр.	$P12_11$ (моноклинная)	$P12_11$ (моноклинная)
Параметры ячейки	$a = 39.161 \text{ \AA}$ $b = 107.405 \text{ \AA}$ $c = 56.659 \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 108.16^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	$a = 36.045 \text{ \AA}$ $b = 108.069 \text{ \AA}$ $c = 55.839 \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 106.14^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Число молекул в независимой части ячейки	4	4
Разрешение, \AA	1.93	2.084
Число рефлексов	30648	21672
Число молекул воды	248	248
Число аминокислотных остатков	416 (104 в расчете на одну молекулу)	416 (104 в расчете на одну молекулу)

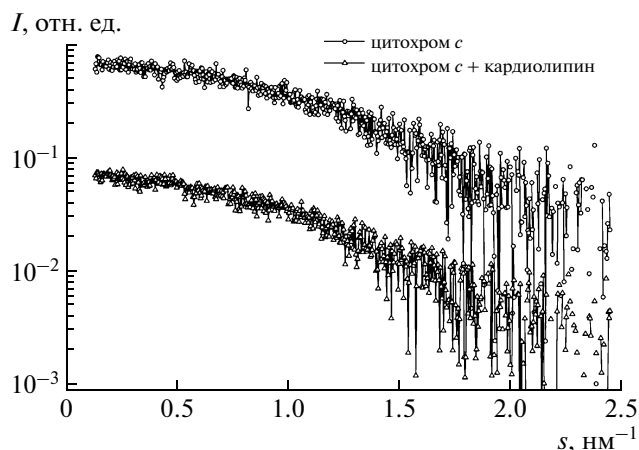


Рис. 5. Интенсивности малоуглового рассеяния от растворов цитохрома *c* и раствора над осадком его комплекса с кардиолипином. По вертикали отложены интенсивности рентгеновского рассеяния в относительных единицах, по горизонтали модуль вектора рассеяния $s = 4\pi \sin\theta/\lambda$, где 2θ — угол рассеяния, $\lambda = 0.1542$ нм — длина волны излучения. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

приведены результаты опытов по определению отношения кардиолипин : цитохром *c* в комплексе Цит-КЛ (схема опытов — на рис. 3). Данные оптической плотности при 525 нм выше 1.2 недостоверны, но по остальным точкам на кривой 525 нм

можно провести прямую, которая пересекается с осью абсцисс при соотношении кардиолипин : цитохром *c*, равном приблизительно 35 : 1. Очевидно, что в водных растворах тетраолеилкардиолипин образует нерастворимый комплекс с таким соотношением липидных и белковых молекул. После образования комплекса избыток кардиолипина остается в водной среде в виде сильно рассеивающего свет коллоидного раствора, а при недостатке цитохрома свободного кардиолипина в среде нет, и весь цитохром находится в форме, которая по всем спектральным свойствам не отличается от цитохрома в системе, не содержащей липида.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В водной фазе комплекса цит-КЛ не существует. Данные белковой кристаллографии не выявили каких-либо различий в структуре цитохрома *c*, кристаллы которого были выращены из раствора этого белка, и цитохрома, кристаллы которого были выращены из раствора, где наряду с цитохромом *c* находился кардиолипин с молярным соотношением липид : белок = 8 : 1. Опыты, проведенные методом центрифугирования и спектроскопии в последнее время, показывают, что в таких условиях весь кардиолипин должен был выпасть в осадок вместе с частью цитохрома, а в водном растворе оставался чистый цитохром *c*. Его

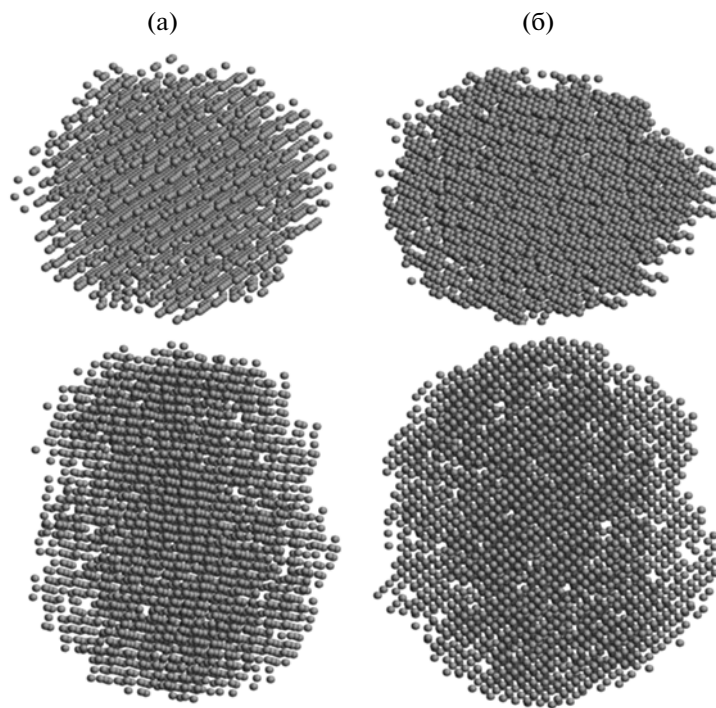


Рис. 6. Форма молекулы цитохрома в растворе (а) и раствора над осадком его комплекса с кардиолипином (б). Максимальный размер молекул 4 ± 0.1 нм. Структуры показаны по вертикали в двух перпендикулярных ориентациях.

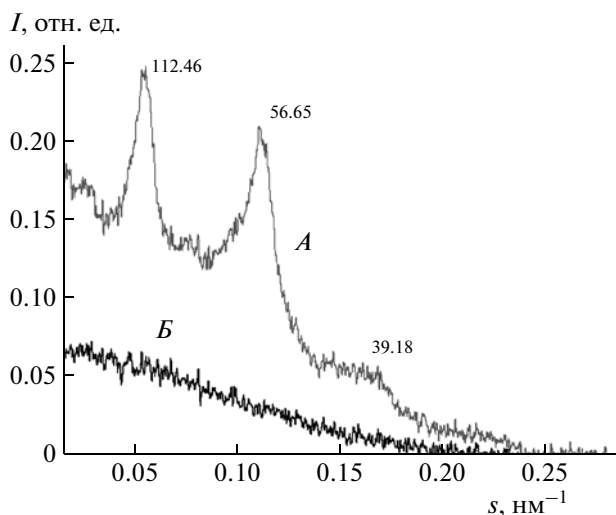


Рис. 7. Кривая малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в суспензии выпавшего осадка комплекса цитохрома *c* с кардиолипином (А). Цифры в максимумах рассеяния соответствуют межплоскостным расстояниям в микрокристаллах (межплоскостные расстояния даны в Å). Для сравнения приведены данные рассеяния чистого кардиолипина без добавления цитохрома *c* (Б). Концентрация цитохрома *c* – 10 мг/мл, кардиолипина – 36.4 мг/мл, калийфосфатный буфер (0.05 М, рН 6.58); молярное отношение цитохром:кардиолипин = 30:1.

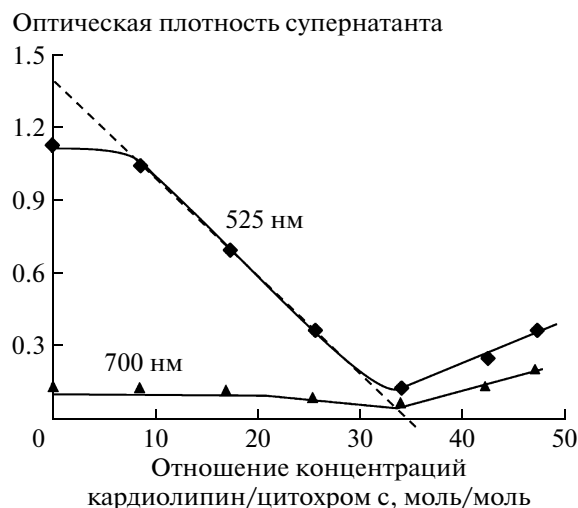


Рис. 8. Изменение оптической плотности раствора цитохрома *c* по мере добавления к нему малых объемов концентрированного раствора тетраолеилкардиолипина. Цифры у кривых – длина волны (нм), при которой измеряли оптическую плотность раствора. Данные были получены на основании измерения спектров поглощения цитохрома *c*.

структура не отличалась от структуры цитохрома *c*, кристаллы которого были выращены в среде без кардиолипина.

Совершенно аналогичными оказались и результаты по изучению малоуглового рассеяния водных растворов, полученных после центрифугирования смеси кардиолипина и цитохрома *c*: весь кардиолипин выпал в осадок в составе комплекса Цит-КЛ, а тот, который остался, сохранил все свойства неизмененного цитохрома *c*.

Эти данные заставляют пересмотреть значительную часть данных литературы об изменении свойств цитохрома *c*, присоединяющего разное число молекул кардиолипина к каждой молекуле белка в растворе смеси. Ничего подобного не происходит. Добавление кардиолипина приводит к образованию прочного, водонерастворимого комплекса с определенным соотношением липид:белок (около 35 : 1), и изменение свойств полученной системы – не что иное как сумма свойств чистого белка и Цит-КЛ комплекса с различным вкладом белка и комплекса в эту сумму.

Предполагаемое строение наночастицы Цит-КЛ. Почему наночастицы цит-КЛ нерастворимы в воде и, более того, образуют осадок, состоящий из микрокристаллов?

Ответ на этот вопрос может дать предполагаемая структура частицы Цит-КЛ (рис. 2). Каждая молекула кардиолипина присоединяется к по-

верхности цитохрома *c* своей полярной головкой, гидрофобные хвосты жирнокислотных цепей остаются в водной фазе. Присоединение второй и всех последующих молекул кардиолипина уменьшает площадь границы раздела воды и неполярной фазы, образуемой остатками жирных кислот на величину площади контакта соседних жирнокислотных цепей. Это присоединение одной за другой молекул кардиолипина заканчивается только тогда, когда вся поверхность цитохрома *c* будет покрыта головками кардиолипина.

Образовавшиеся таким образом частицы Цит-КЛ все равно обладают гидрофобной поверхностью, что в водной среде приводит к их “склеиванию”, и если частицы имеют стандартные размеры и форму, то – к возможному образованию микрокристаллов.

Интересно сопоставить поверхность молекулы цитохрома *c* поверхностью, занимаемой монослоем тех 35 молекул кардиолипина, которые по показателям (рис. 8) входят в состав комплекса Цит-КЛ. По данным малоуглового рассеяния цитохрома *c* (рис. 6), глобула этого белка имеет форму эллипсоида с соотношением осей 4.0 × 3.5 × 3.0 нм. Близкие данные были получены при рентгеноструктурном анализе выращенных кристаллов цитохрома *c*. Площадь поверхности такого эллипсоида примерно равна поверхности сферы диаметром 3.5 нм, т.е. 38.5 нм². На каждую из 35 молекул кардиолипина на этой поверхности приходится по 1.1 нм². В монослоях на поверхности раздела вода–воздух площадь, занимаемая молекулой кардиолипина, варьирует от 1.0 до

1.4 нм [13] в зависимости от химического состава углеводородных цепей и бокового давления, которое в данном случае определяется поверхностным натяжением на границе раздела водной и липидной фазы. Следует заметить также, что часть жирнокислотных цепей молекул кардиолипина уходит в глубь белковой глобулы, так что площадь поверхности, занимаемой молекулами кардиолипина, уменьшается. С этими оговорками можно считать, что схема на рис. 2 подтверждается данными, полученными в опытах.

Подтверждают схему также данные малоуглового рассеяния микрокристаллов комплексов, образующихся в смеси цитохрома *c* с кардиолипином (рис. 7). Как уже говорилось, максимальное межплоскостное расстояние в микрокристаллах равно 11 нм. Если ячейка кристаллов Цит-КЛ содержит одну частицу, и частицы плотно прижаты друг к другу, то размер межплоскостного расстояния должен быть равен сумме диаметра белковой молекулы и толщины двух монослоев фосфолипидов на ее поверхности. В таком случае последняя величина должна составлять $11 - 4 = 7$ нм. По данным [14], толщина липидного бислоя в различных биологических мембранах меньше: она варьирует от 4.5 до 6.5 нм. Наиболее точные данные, полученные методом дифракции рентгеновских лучей на волокнах миелина, дают 4.3–4.8 нм между центрами полярных групп ([14], с. 51); полная толщина слоя будет несколько больше. Молекулярная модель кардиолипина дает значение толщины монослоя 2.7–2.9 нм в зависимости от плотности упаковки молекул на поверхности раздела фаз [13]; для двух монослоев величины будут соответственно 5.4–5.8 нм. Таким образом, известные значения толщины двух монослоев фосфолипидов на 1–1.5 нм меньше, чем требуется моделью плотно упакованных в кристалле сфер комплекса Цит-КЛ, что можно было бы списать на неточность измерений. Но, по-видимому, дело в другом: *размеры глобулы цитохрома с увеличиваются* при образовании комплекса с кардиолипином. Это должно происходить уже по одной той причине, что жирнокислотные остатки кардиолипина, внедряясь в глобулу, занимают там некоторый объем. Заметим, что объем 35 жирнокислотных цепей примерно равен объему всей глобулы цитохрома и расчеты показывают, — если от каждой молекулы кардиолипина в белок внедрится по одному остатку жирной кислоты, радиус глобулы цитохрома *c* возрастет на одну треть. В пользу набухания глобулы напрямую свидетельствуют результаты измерения флуоресценции тирозиновых и триптофановых остатков цитохрома *c* при связывании последнего с кардиолипином [15]. В нативном цитохроме *c* эти остатки вообще не флуоресцируют из-за резонансного переноса энергии электронного возбуждения на гем. В комплексе появляется флуоресценция триптофа-

на и трех остатков тирозина из четырех вследствие увеличения расстояния между аминокислотными остатками и гемом, которое выходит за пределы радиуса Ферстера.

Все эти данные подтверждают схему строения комплекса Цит-КЛ, но для ее уточнения в дальнейшем потребуются дополнительные исследования свойств кристаллов, образуемых этим комплексом в водных средах.

Образование комплекса Цит-КЛ — решающая стадия апоптоза. Решающая роль реакции липидной перекисидации, катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, в запуске запрограммированной смерти клеток (апоптоза) в настоящее время может считаться доказанной [7, 8, 16, 17]. Однако механизм запуска самой этой реакции не так очевиден. Обычно предполагается, что каталитически активный комплекс всегда готов к действию и лимитирует перекисидацию наличие в среде основного субстрата: пероксида водорода. Данные, полученные в настоящей работе, позволяют предположить, что главным является образование самого каталитического комплекса. В данной работе было показано, что комплекс Цит-КЛ — это не просто молекулы цитохрома *c*, слабо связанные с поверхностью липидной мембраны и находящиеся в равновесии с белком, плавающим в окружающей водной среде, а нерастворимые в воде наноструктуры определенного химического состава, которые образуются при появлении кардиолипина в среде и полностью удаляют цитохром *c* из водной фазы. Там, где присутствует цитохром *c*, в том числе в межмембранном пространстве митохондрий, появление кардиолипина влечет за собой удаление соответствующего количества цитохрома, образование гидрофобных наночастиц и запуск каталитического окисления липидов в гидрофобной фазе мембран. Таким образом, согласно данной гипотезе, именно образование наночастиц Цит-КЛ есть первая стадия апоптоза.

Авторы выражают благодарность В.Р. Мелик-Адамянцу за участие в проведении исследований по белковой кристаллографии и обсуждение результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-01743-а) и Программой фундаментальных исследований РАН “Фундаментальные науки — медицине”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev V.P. // IUBMB Life. 2000. Т. 49. № 5. С. 365.
2. Skulachev V.P. // FEBS Lett. 1998. Т. 423. № 3. С. 275.
3. Skulachev V.P. // FEBS Lett. 1996. Т. 397. № 1. С. 7.
4. Fulda S., Debatin K.M. // Oncogene. 2006. Т. 25. № 34. С. 4798.

5. *Владимиров Ю.А.* // Дисрегуляция проницаемости мембран митохондрий, некроз и апоптоз. Дисрегуляционная патология / Под ред. Крыжановского Г.Н. М.: Медицина, 2002. С. 127.
6. *Владимиров Ю.А.* // Биологические мембраны. 2002. Т. 19. № 5. С. 356.
7. *Kagan V.E., Borisenko G.G., Tyurina Y.Y. et al.* // Free Radical Biol. Med. 2004. Т. 37. № 12. С. 1963.
8. *Kagan V.E., Tyurin V.A., Jiang J. et al.* // Nature Chem. Biol. 2005. Т. 1. С. 223.
9. *Sanishvili R.K.V., Westbrook E.M., Margoliash E.* // Structure. 1995. Т. 3. С. 707.
10. *Collaborative* // Acta Cryst. D. 1994. Т. 50. № 5. С. 760.
11. *Adams P.D., Afonine P.V., Bunkoczi G. et al.* // Acta Cryst. D. 2010. Т. 66. № 2. С. 213.
12. *Svergun D.I.* // Biophys. J. 1999. Т. 76. № 6. С. 2879.
13. *Houle A., Tschy F., Aghion J., Leblanc R.M.* // J. Lipid Res. 1982. Т. 23. № 3. С. 496.
14. *Ивко В.Г., Берестовский Г.Н.* Липидный бислой биологических мембран. Теоретическая и прикладная биофизика / Под ред. Иваницкого Г.Р. М.: Наука, 1982. 224 с.
15. *Kapralov A.A., Yanamala N., Tyurina Y.Y. et al.* // J. Biol. Chem. 2010 (in press).
16. *Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N. et al.* // Biochemistry. 2006. Т. 45. № 15. С. 4998.
17. *Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A. et al.* // Free Radical Biol. Med. 2009. Т. 46. № 11. С. 1439.
18. *Brown L.R., Wuthrich K.* // Biochim. Biophys. Acta. 1977. Т. 468. № 3. С. 389.
19. *Rytomaa M., Kinnunen P.K.* // J. Biol. Chem. 1994. Т. 269. № 3. С. 1770.
20. *Kinnunen P.K., Koiv A., Lehtonen J.Y. et al.* // Chem. Phys. Lipids. 1994. Т. 73. № 1–2. С. 181.