

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

БОЧКОВА ЖАННА ВЛАДИСЛАВОВНА

Изменение конформации и окислительно-восстановительного состояния
цитохромов дыхательной цепи митохондрий при окислительном стрессе и
патологиях

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** – **Браже Надежда Александровна**, кандидат биологических наук
- Официальные оппоненты** – **Лопина Ольга Дмитриевна** – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра биохимии, ведущий научный сотрудник
- Сурин Александр Михайлович** – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», главный научный сотрудник
- Горин Дмитрий Александрович** – доктор химических наук, профессор, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологии», центр Фотоники и фотонных технологий, профессор

Защита диссертации состоится «20» февраля 2025 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3268>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы

Дыхательная или электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) митохондрий является важным звеном в метаболизме и энергообмене клеток. Перенос электронов в ЭТЦ сопровождается электронно-конформационными изменениями редокс-пар доноров и акцепторов электронов, изменение структуры и конформации отдельных комплексов ЭТЦ влияет на скорость электронного транспорта, определяя активность АТФ-синтазы и генерацию супероксид-анион радикала (O_2^-) в комплексах I-III (Murphy, 2009; Cogliati et al., 2018). Несмотря на многочисленные исследования механизмов регуляции функционирования дыхательной цепи, в настоящее время не до конца понятны способы регуляции переноса электронов на уровне отдельных электрон-транспортных белков и их кофакторов. Цитохромы С и В-типов являются важными компонентами ЭТЦ митохондрий и представляют собой белки с кофактором гемом — железосодержащей простетической группой, отвечающей за акцептирование и донирование электрона (Hardison, 1996). Цитохром С (Цит С) является единственным переносчиком электронов в ЭТЦ, диффундирующим в межмембранном митохондриальном пространстве (ММП) и транспортирующим электрон с комплекса III на комплекс IV. Перенос электрона от цитохрома C1 комплекса III к цитохрому С происходит по туннельному механизму и зависит от гем-белковых и гем-гемовых взаимодействий цитохрома С с цитохромом C1 (Lange and Hunte, 2002; Skourtis et al., 2010). Замедление переноса электрона на цитохром С и затем на комплекс IV приводит к увеличению количества супероксид-анион радикала, образующегося в комплексах I-III ЭТЦ, а также к снижению эффективности работы АТФ-синтазы (Alvarez-Paggi et al., 2017). Таким образом, исследование механизмов регуляции активности цитохрома С в реакциях с его донорами и акцепторами электронов является актуальной задачей молекулярной и клеточной биофизики и биоэнергетики. Находясь в условиях молекулярного краудинга в межмембранном пространстве митохондрий, цитохром С подвергается внешним воздействиям, таким, как динамично изменяющиеся разность потенциалов внутренней мембраны ($\Delta\Psi$) и протонный градиент (Murphy and Brand, 1988). Кроме того, известно, что изоформы цитохрома С с измененной белковой частью обладают разным редокс-потенциалом, а фосфорилирование цитохрома С ингибирует электронный транспорт (Kalpage et al., 2019-2020). Поскольку именно гем задействован в акцептировании электрона, следует предположить, что факторы, влияющие на редокс-свойства цитохрома С, действуют опосредованно через изменение конформации гема.

Первоначальные представления о единственно возможной плоской конформации порфиринового кольца гемопротеинов были пересмотрены в ходе исследования гемов митохондриального цитохрома С и субъединиц гемоглобина — их гемы оказались искажены относительно плоскости пирролов (Berghuis and Brayer, 1992). В дальнейшем Шейдтом (W. R.

Scheidt) и Лии (Y. J. Lee) в 1987 году была введена классификация конформаций гема по минимальным энергиям внеплоскостных отклонений атомов вдоль шести нормальных координат. Выяснилось, что для разных функциональных классов гемопротеинов характерны определенные внеплоскостные конформации (Senge et al., 2015). Так, было установлено, что для гемов С характерна внеплоскостная искаженная конформация, названная в англоязычной литературе «ruffling». К концу 80-х годов появились первые работы, показывающие зависимость редокс-потенциала гемопротеинов и их аффинности к лигандам от конформации гема (Shelnutt et al., 1979; Perutz, 1979). Позже при моделировании гемов было показано снижение редокс-потенциала при внеплоскостных искажениях конформации (Imada et al., 2018; Kondo et al., 2022). Одновременно с этим было обнаружено, что цитохромы С-типа, выделенные из разных организмов, и мутантные формы цитохрома С отличаются степенью искаженности гема, коррелирующей со снижением способности цитохрома С акцептировать и донировать электрон (Sun et al., 2014; Chertkova et al., 2017). Существуют данные, указывающие на участие цитохромов ЭТЦ митохондрий и, в частности, цитохрома С, в развитии патологических процессов, связанных с гипоксией, окислительным стрессом и гибелью клеток (Ivanova et al., 2023). При нарушении целостности митохондрий окисленный цитохром С выходит в цитоплазму, где может инициировать апоптоз или вступить в редокс-реакцию с другим гемопротеином, нейроглобином (Нгб) (Tejero, 2020). При этом взаимодействие цитохрома С с нейроглобином осуществляется за счет того же белкового сайта связывания, что и с цитохромом С1 комплекса III, благодаря чему редокс-пара нейроглобин-цитохром С является удобной моделью для изучения электронно-конформационных изменений при переносе электрона от гема-донора к гему цитохрома С.

В данной работе мы исследовали роль конформационных изменений гемов в регуляции редокс-реакции цитохрома С с нейроглобином, влияние параметров микроокружения гема и макроокружения цитохрома С на конформацию гема С в норме и при патологиях, а также изменение редокс-состояния цитохромов митохондрий кардиомиоцитов при гипоксии и реоксигенации разной длительности.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы было исследовать изменение конформации гема цитохрома С при его функционировании в зависимости от микро- и макроокружения, а также состояние цитохромов С и В в норме и при патологиях в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Задачи:

1. Изучить роль функционально значимых аминокислотных остатков цитохрома С и нейроглобина в регуляции конформации гемов С и В и их влияние на протекание редокс-реакции между восстановленным нейроглобином и окисленным цитохромом С *in vitro*.

2. Исследовать зависимость конформации гема цитохрома С от разности потенциалов на внутренней мембране митохондрий кардиомиоцитов в норме и при спонтанной гипертонии.
3. Исследовать редокс-состояние цитохромов дыхательной цепи и характер конформационных изменений гема цитохрома С митохондрий кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии на изолированном сердце крысы.

Положения, выносимые на защиту

Конформационные изменения гема необходимы для регуляции электрон-акцепторных свойств цитохрома С *in vitro* и *in vivo*. Влияние микро- и макроокружения цитохрома С на конформацию гема имеет комплексный характер и реализуется в зависимости от локального электростатического окружения цитохрома С.

Развитие патологических процессов, в частности, спонтанной гипертонии и длительной ишемии/реоксигенации сердца, сопровождается отсутствием конформационных изменений гема цитохрома С в условиях, требующих ускорения электронного транспорта в дыхательной цепи митохондрий.

Научная новизна работы

Электрон-акцепторная активность цитохрома С определяется конформацией гема, в регуляции которой решающую роль играют микро- и макропараметры окружения: локальные заряды поверхностей гемовой щели цитохрома С и белка-донора электрона, жесткость Ω -петли цитохрома С, локальный pH в межмембранном пространстве митохондрий и разность потенциалов на внутренней митохондриальной мембране. Обнаружено, что при патологических состояниях — спонтанной гипертонии и длительной ишемии сердца — нарушается регуляция конформации гема цитохрома С. Предложенные КР-параметры, характеризующие конформацию гема цитохрома С, могут быть использованы для анализа эффективности регуляции электронного транспорта в дыхательной цепи митохондрий.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты работы демонстрируют функциональную значимость переходов между искаженной и плоской конформациями гема цитохрома С для регуляции активности электронного транспорта в дыхательной цепи митохондрий, а также показывают, как изменяется конформация гема С в результате акцептирования электрона цитохромом С от другого гема. Предложены КР-параметры, которые могут быть использованы для изучения редокс-реакций гем-содержащих белков. Показано, что адаптивное действие гипоксического preconditionирования, предотвращающее повреждение кардиомиоцитов сердца при реперфузии, сопровождается увеличением вероятности плоской конформации гема цитохрома С, способствуя быстрому переносу электронов на участке комплекс III — цитохром С — комплекс IV.

Методология и методы исследования

Для исследования конформации гема цитохрома С в зависимости от микро- и макроокружения, а также редокс-состояния цитохромов С и В в норме и при патологиях использовали очищенные препараты цитохрома С и нейроглобина; митохондрии кардиомиоцитов крыс линий WKY и SHR; зрелые кардиомиоциты и изолированные сердца крыс. В работе использовали спектроскопии КР и ГКР, флуоресцентную микроскопию и амперометрию.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов была проверена на основе релевантного статистического анализа достаточного количества повторов каждого измерения. Использование ряда методов для изучения модельных объектов позволило комплексно подойти к интерпретации результатов.

Основные результаты работы докладывались на семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, ГНЦ ИБХ РАН, МФТИ, на Российских конференциях и Российских конференциях с международным участием (Флуоресценция для биомедицины (Нижний Новгород, 2024), VII Съезде биофизиков России (Краснодар, 2023), 3-я Международная школа-конференция "Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем - 2021" (Москва, 2021), VI Съезд биофизиков России (Сочи, 2019).

Публикации:

Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI.

Объем и структура диссертации:

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Полный объем диссертации составляет 168 страниц с 35 рисунками и 5 таблицами. Список литературы содержит 152 наименования.

Основное содержание работы

Введение

Во введении и общей характеристике работы раскрываются уровень разработанности темы диссертации и ее актуальность, формулируются цели и задачи, приводятся положения, выносимые на защиту, обосновываются новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Обзор литературы

В обзоре литературы приведены основные темы, проанализированные в ходе работы. Описываются существующие представления о способах регуляции активности дыхательной цепи митохондрий, а также структуре и функционировании цитохрома С, приведены данные о строении и функциях гемопротейна нейроглобина. Особое внимание уделено современным представлениям о влиянии конформации гема цитохрома С на его физические свойства и механизмах регуляции

конформации гема цитохрома С. Отдельный раздел обзора посвящен спектроскопии КР и анализу спектров КР для определения конформации гемов и их редокс-состояния.

Материалы и методы

Объектами исследования были: цитохром С (WT и мутанты с аминокислотными заменами в сайте связывания K25E, K72E и в Ω -петле T78S/K79P, мутанты с аминокислотными заменами, имитирующими фосфорилирование, Y48E и Y97E); нейроглобин (WT и мутанты с аминокислотными заменами в сайте связывания E60K, E87K); митохондрии из сердец 18-недельных крыс WKY и крыс SHR с повышенным давлением, первичные культуры кардиомиоцитов и изолированные сердца крыс Sprague Dawley. Все эксперименты с животными были одобрены Комитетом по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол №82-О, от 08.06.2017). Образцы цитохрома С и нейроглобина предоставлены м.н.с., асп. Семеновой М.А. и с.н.с., к.б.н. Чертковой Р.В. (ГНЦ ИБХ РАН, лаборатория инженерии белка).

Спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния для исследования гемов цитохрома С и нейроглобина в восстановленном и окисленном состояниях

Спектры КР и ГКР растворов очищенных образцов Цит С и Нгб получали при лазерном возбуждении 532 нм, создающем условия резонансного КР и ГКР для гемов С и В-типов. Лазерная мощность составляла не более 1 мВт на область регистрации с диаметром не более 800 нм, длительность регистрации спектров составляла 30 с. Все спектры КР и ГКР получали с использованием конфокального КР-микроспектрометра NTEGRA Spectra (НТ-МДТ, Зеленоград). Положения максимумов и относительная интенсивность пиков на спектрах КР и ГКР позволяют оценить редокс-состояние гема (Fe^{2+} или Fe^{3+}), вероятность плоской или искаженной конформации гема, подвижность пиррольных колец и вероятность колебаний метильных радикалов гема, отражающих жесткость белкового микроокружения. Все препараты Цит С и Нгб были получены в окисленном состоянии, поэтому для исследования восстановленных форм Цит С(Fe^{2+}) и Нгб(Fe^{2+}) к исходным растворам окисленных белков добавляли восстановитель НАДФН, после чего регистрировали спектры КР. Интенсивность сигнала КР окисленных цитохромов С и В-типов и Нгб на 2-3 порядка меньше интенсивности восстановленных форм, поэтому для исследования гемов окисленных белков мы применяли метод ГКР с использованием плазмонных серебряных наноструктур, многократно усиливающих сигнал КР молекул в пределах 10 нм от поверхности структур. Каплю раствора окисленного белка помещали на серебряные наноструктуры и регистрировали спектр ГКР. Наноструктуры разработаны группой профессора Е.А. Гудилина на факультете Наук о материалах МГУ.

Спектроскопия КР для исследования изменения конформации гема дикого типа и мутантных форм Цит С в процессе редокс-реакции с диким типом и мутантными формами Нгб

Для проведения исследования использовали раствор окисленного Цит С ($\text{ЦитС(Fe}^{3+})$) и раствор восстановленного Нгб ($\text{Нгб(Fe}^{2+})$), полученный при внесении НАДФН в исходный раствор окисленного Нгб ($\text{Нгб(Fe}^{3+})$). Предложенный нами методический подход основан на анализе разностных спектров, получаемых в результате вычитания (1) КР спектра контрольного раствора Цит С(Fe^{2+}), восстанавливаемого за счет НАДФН в присутствии повторно окисленного Нгб, из (2) КР спектра экспериментального раствора Цит С(Fe^{2+}), восстанавливаемого за счет редокс-реакции с восстановленным Нгб(Fe^{2+}) и частично НАДФН, оставшегося в растворе после восстановления окисленного Нгб для получения его восстановленной формы. В обоих случаях спектры КР регистрировали в первую минуту после добавления Цит С(Fe^{3+}) к контрольному раствору НАДФН и ре-окисленного Нгб или к экспериментальному раствору восстановленного Нгб(Fe^{2+}) с остаточным количеством НАДФН. Время накопления сигнала 1 секунда. Итоговый разностный спектр обладает рядом пиков, происходящих из пиков на исходных спектрах КР Цит С(Fe^{2+}) и отражает конформационные изменения гема Цит С, сопутствующие акцептированию электрона от Нгб. Снижение амплитуды разностных пиков или полное их отсутствие говорит о нарушении редокс-реакции. Исследования проведены совместно с м.н.с. Семеновой М.А. и с.н.с., к.б.н. Чертковой Р.В. (ГНЦ ИБХ РАН).

Спектроскопия ГКР для исследования конформации гема окисленного цитохрома С в изолированных митохондриях кардиомиоцитов при изменении активности дыхательной цепи

Разбавленную суспензию изолированных митохондрий помещали на серебряные наноструктуры в присутствии субстратов цикла Кребса и АДФ и облучали лазером 532 нм. Зарегистрированный ГКР спектр митохондрий представляет собой ГКР-спектр окисленного цитохрома С. Активность дыхательной цепи изменяли с помощью вносимых к суспензии митохондрий реагентов: протонофора СССР, калиевого ионофора валиномицина, ингибитора АТФ-синтазы олигомицина. При разных режимах работы ЭТЦ определяли изменение конформации гема Цит С по спектрам ГКР митохондрий, скорость поглощения O_2 при помощи амперометрии и потенциал на внутренней мембране митохондрий при помощи флуоресцентной микроскопии с флуорофором MitoTrackerCMXRos.

Спектроскопия КР для исследования редокс-состояния цитохромов, конформации гема Цит С и содержания омб в сердце крысы в моделях ишемии/реперфузии

Изолированное сердце крысы присоединяли к перфузионной системе Лангендорфа через аорту. Гипоксию (ишемию) моделировали остановкой перфузии сердца на 15 или 60 мин, реоксигенацию – возобновлением перфузии. Гипоксическое preconditioning проводили за 5 минут до 60-ти минутной гипоксии за счет трехкратной остановки перфузии сердца на 5 мин с 5-ти минутными интервалами реперфузии после каждого краткого акта гипоксии. КР-спектры регистрировали с эпикардальной поверхности левого желудочка с помощью

рамановского микроспектрометра InVia (Renishaw, Великобритания), с использованием лазерного возбуждения с длиной волны 532 нм, мощностью лазера 3 мВт на область регистрации с диаметром 40 мкм.

Флуоресцентная микроскопия для оценки продукции H_2O_2 в кардиомиоцитах крыс в моделях гипоксии/реоксигенации

Первичную культуру выделенных зрелых кардиомиоцитов трансдуцировали вирусными частицами (10^4 частиц на клетку) с геном флуоресцентного биосенсора HyPer7-mito на H_2O_2 с митохондриальной локализацией через 24 часа после изолирования клеток, а эксперименты проводили на 5-е сутки. Гипоксию (ишемию) клеток вызывали током через чашку дезоксигенированного раствора без глюкозы. Регистрацию флуоресценции сенсора HyPer7-mito проводили *in vivo* при помощи флуоресцентного микроскопа Olympus Fluoview FV3000 (Olympus, Токио, Япония) с фильтрами DAPI/FITC/Cy3/Cy5 Quad smb LED Set для возбуждения флуоресценции ($\lambda_{ex}=370-420$ нм для окисленного и $\lambda_{ex}=447-503$ нм восстановленного HyPer7-mito) и регистрации флуоресценции ($\lambda_{em}=495-527$ нм для обеих форм сенсора). Содержание H_2O_2 в матриксе митохондрий оценивали по отношению интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм HyPer7-mito (параметр F_{470}/F_{395}).

Другие методы, используемые в работе:

Амперометрический метод оценки скорости потребления кислорода митохондриями осуществляли с помощью кислородного электрода Кларка на приборе Эксперт МТХ-001 (Эконикс-Эксперт, Россия); изменение $\Delta\Psi$ внутренней мембраны изолированных митохондрий оценивали по изменению обратной величины интенсивности флуоресценции зонда MitoTrackerCMXRos, возбуждаемой с использованием лазера 532 нм мощностью 0.05 мВт и конфокального спектрометра NTEGRA Spectra (НТ-МДТ, Россия).

Статистический анализ проводили с использованием непараметрического теста Манна-Уитни или Крускала-Уоллиса для всех вычислений, кроме сравнения параметров d разностных спектров – в этом случае был использован параметрический t-тест.

Результаты и их обсуждение

1. Исследование конформационных свойств гемов цитохрома С и нейроглобина при внесении аминокислотных замен в контактные поверхности и Ω -петлю гема С

Известно, что Цит С(Fe^{3+}) и Нгб(Fe^{2+}) вступают в редокс-реакцию в цитоплазме клетки после выхода Цит С(Fe^{3+}) из митохондрий, в результате чего Цит С восстанавливается и теряет способность взаимодействовать с белком Араф-1 и не инициирует апоптоз. Оба белка содержат гемы в качестве простетической группы. По их спектрам КР можно определить степень окисления гема, а также его тип – С (у Цит С) или В (у Нгб). На рисунке 1(а, б) показано, что КР спектры восстановленных форм этих белков в несколько раз интенсивнее спектров окисленных форм,

поэтому мы использовали ГКР спектроскопию для регистрации спектров окисленных мутантных форм белков. Ряд пиков характерны для обоих типов гемов в обоих редокс-состояниях – 748 см^{-1} (колебания всех связей в гемах), $1126\text{--}1128\text{ см}^{-1}$ (колебания метильных радикалов $\text{C}_\beta\text{--CH}_3$), 1170 см^{-1} (ассиметричные колебания пиррольных колец), 1586 см^{-1} (колебания метиновых мостиков и $\text{C}_\alpha\text{C}_\beta$ связи). На спектрах окисленных форм белков присутствуют пики с положениями максимумов 1638 см^{-1} (колебания метиновых мостиков) и $1371\text{--}1375\text{ см}^{-1}$ (так называемое «дыхание» пирролов). На спектрах КР восстановленных Цит С и Нгб максимумы пиков, связанных с этими же колебаниями, смещаются в положение 1600 см^{-1} и сливаются с интенсивными пиками $1586\text{--}1590\text{ см}^{-1}$ и в положение $1365\text{--}1368\text{ см}^{-1}$ (Рис. 1 (а,б)). Важно, что колебания метиновых мостиков и интенсивности соответствующих пиков на спектрах ГКР и КР зависят не только от степени окисления гемового железа, но и от конформации гемов. Так, при увеличении вероятности плоской конформации гемов (и, соответственно, при снижении вероятности искаженной конформации гемов) относительные интенсивности пиков с положениями максимумов 1638 и 1586 см^{-1} возрастают (Ma et al., 1998; Sun et al., 2014; Brazhe et al., 2023). Следует отметить, что симметричные растяжения - «дыхания» пирролов и, следовательно, интенсивности пиков с положениями максимумов $1371\text{--}1375\text{ см}^{-1}$ (для окисленных гемов) и $1365\text{--}1368\text{ см}^{-1}$ (для восстановленных гемов) не чувствительны к конформации гемов и внеплоскостным искажениям и, таким образом, связаны только с относительным количеством белков в конкретном редокс-состоянии (Ma et al., 1998; Sun et al., 2014; Brazhe et al., 2023). Спектры КР Цит С и Нгб также содержат пики, характерные только для гема С (пики с положениями максимумов 610 , 648 , 690 см^{-1} и 1313 см^{-1}) и только для гема В (1306 и 1342 см^{-1}).

Чтобы выяснить, могут ли потенциально критичные для образования комплекса Цит С-Нгб модификации участков связывания белков влиять на конформации их гемов, были внесены аминокислотные замены и получены мутантные формы белков: Цит С K25E, Цит С K72E (рисунок 2(а,б)) и Нгб E60K, Нгб E87K (рисунок 3(а,б)). Замены произведены по аминокислотам, задействованным в образовании электростатических связей между белками, и приводят к изменению локального заряда поверхности на противоположный по знаку, тем самым нарушая электростатические взаимодействия в комплексе Нгб-Цит С. Мутант Цит С T78S/K79P с заменами в Ω -петле, напротив, обладает интактной контактной поверхностью, однако менее подвижной Ω -петлей, координирующей гем.

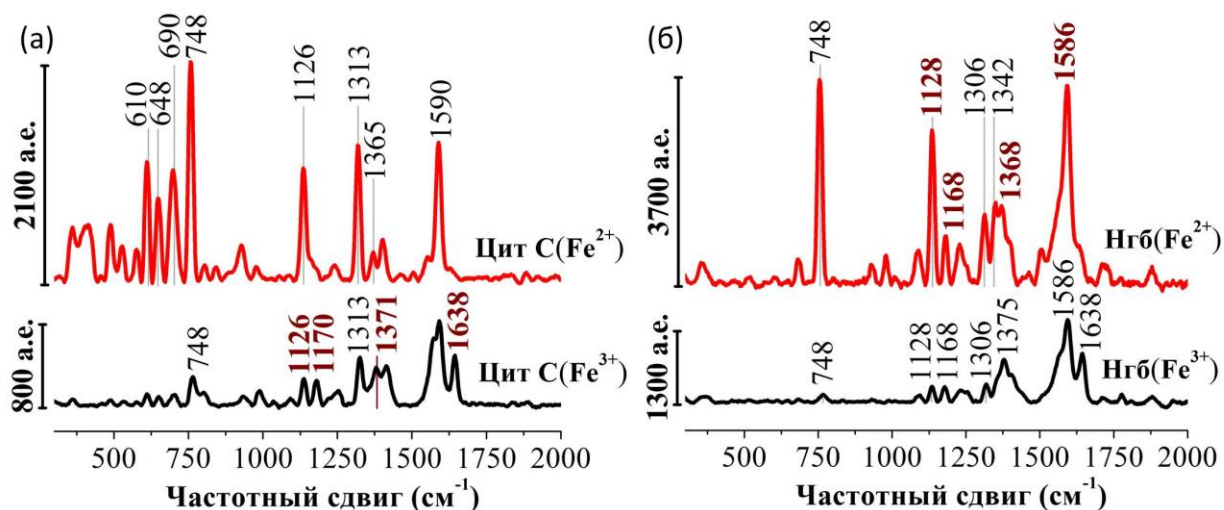


Рисунок 1. (а) КР спектр окисленного Цит С (1 мМ) и восстановленного Цит С(1 мМ) (б) КР спектр окисленного Hgb (1 мМ) и восстановленного Hgb(1 мМ) с подписанными максимумами ключевых пиков. Оси X соответствуют частотному сдвигу, который показан в см⁻¹. Темно-красным цветом выделены положения максимумов на спектре Цит С (Fe³⁺) и Hgb(Fe²⁺), которые в дальнейшем используются для расчёта конформационных параметров гемов диких типов и мутантных форм белков.

В связи с тем, что в дальнейших экспериментах мы исследовали изменения конформации гема окисленного цитохрома С при переносе электрона от восстановленного нейроглобина, мы регистрировали и анализировали ГКР спектры окисленных мутантов Цит С и КР спектры восстановленных мутантов Hgb. Для анализа конформационных свойств их гемов были использованы следующие спектральные параметры — соотношения интенсивностей выбранных пиков:

(1) I_{1638}/I_{1371} и I_{1586}/I_{1368} рассчитанные по спектрам ГКР окисленного цитохрома С и спектрам КР восстановленного Hgb соответственно, и характеризующие вероятность плоской конформации гемов Цит С(Fe³⁺) и Hgb(Fe²⁺) (Ma et al., 1998; Sun et al., 2014; Chertkova et al., 2017; Brazhe et al., 2023). Чем больше эти значения, тем более вероятно, что гемы принимают плоскую конформацию.

(2) I_{1170}/I_{1371} и I_{11168}/I_{1368} , характеризующие вероятность асимметричных колебаний-растяжений пиррольных колец гемов Цит С(Fe³⁺) и Hgb(Fe²⁺) и отражающие подвижность пиррольных колец.

(3) I_{1126}/I_{1371} и I_{1128}/I_{1368} характеризуют вероятность колебаний метильных радикалов гема в окисленном Цит С и восстановленном Hgb. Увеличение этих соотношений связано с увеличением вероятности колебаний метильных радикалов и со снижением жесткости белкового микроокружения гема (Chertkova et al., 2017).

Установлено, что аминокислотные замены в Ω-петле мутанта Цит С T78S/K79P приводят к искажению гема, а замена K25E в сайте связывания Цит С, напротив, к увеличению вероятности плоской конформации гема (рисунок 2(в)). Так же показано, что подвижность пиррольных колец

гемов Цит С K25E и Цит С T78S/K79P достоверно снижена (рисунке 2(г)). Аминокислотная замена K72E в сайте связывания не влияла на конформацию гема цитохрома С, что может объясняться отсутствием контакта между аминокислотным остатком в положении 72 и гемом. Вероятность колебаний метильных радикалов гемов мутантов не отличается (рисунок 2(д)).

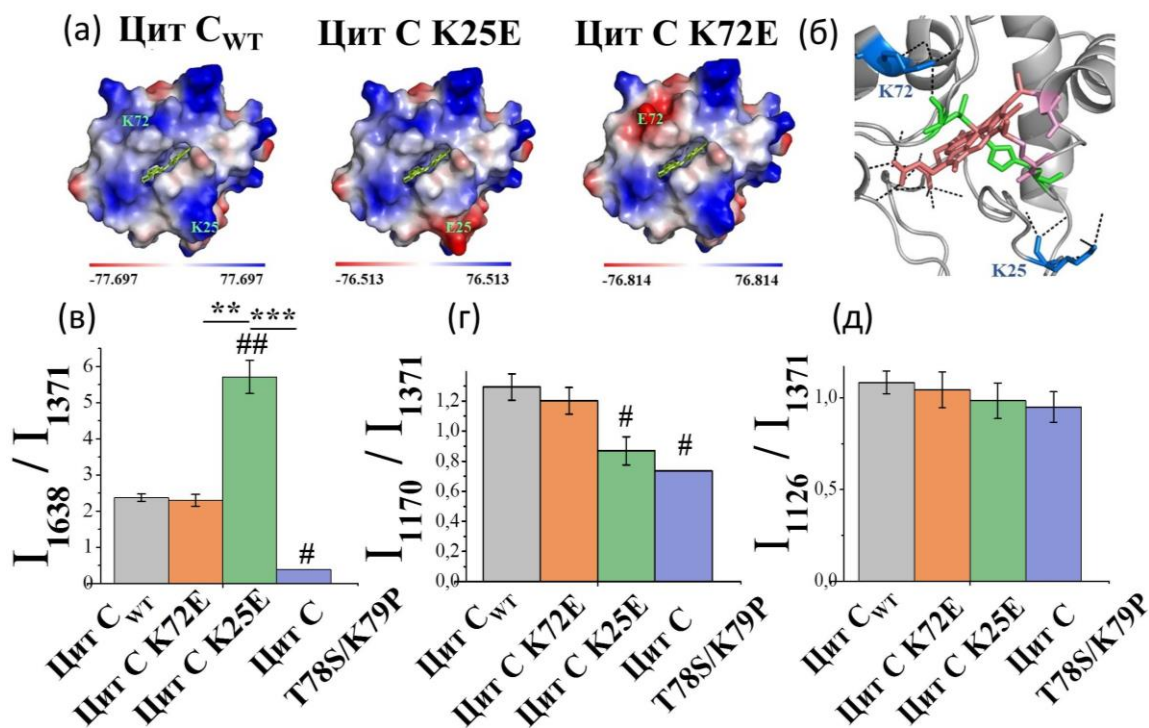


Рисунок 2. (а) Электростатические поверхности Цит С_{WT} (ID PDB: 1HRC) и его мутантных вариантов: Цит С K25E и Цит С K72E. Электростатический потенциал показан в соответствии с красно-синей шкалой (кТ/е). Гем показан светло-зеленым цветом. (б) Положение аминокислот белковой части Цит С, по которым производились замены, относительно гема (показан светло-коричневым цветом). Водородные связи показаны черными пунктирными линиями. Аксиальные лиганды гема изображены зеленым цветом (His18 и Met80). Изображения получены с помощью программы PyMOL. (в)-(д) Соотношения интенсивностей пиков, посчитанные на основе ГКР спектров Цит С(Fe³⁺) и его мутантов Цит С K25E, Цит С K72E и T78S/K79P. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ для мутантов Цит С по сравнению с Цит С_{WT}, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ для различных мутантов Цит С по сравнению друг с другом (непараметрический тест Манна–Уитни), $n = 5$.

Среди мутантов Нгб(Fe²⁺) замена по сайту E60K (рисунок 3(а,б)) вызывает изменение всех анализируемых параметров конформации гема по сравнению с диким типом и мутантом с заменой E87K: вероятность искаженной конформации гема Нгб E60K выше, подвижность пирролов гема снижена, а сам гем оказывается в более жестком белковом окружении (рисунок 3(в-д)). При этом известно, что Glu60 в сайте связывания Нгб расположен ближе к гему и образует с ним водородную связь через молекулу воды в отличие от Glu87, что может объяснять выраженное влияние аминокислотной замены в положении 60 на конформацию гема. Таким образом, мы обнаружили, что мутанты Цит С K25E, Цит С T78S/K79P и Нгб E60K обладают измененными

конформационными свойствами гемов, потенциально влияющими на эффективность транспорта электрона между редокс-партнерами Цит С(Fe^{3+}) и Нгб(Fe^{2+}).

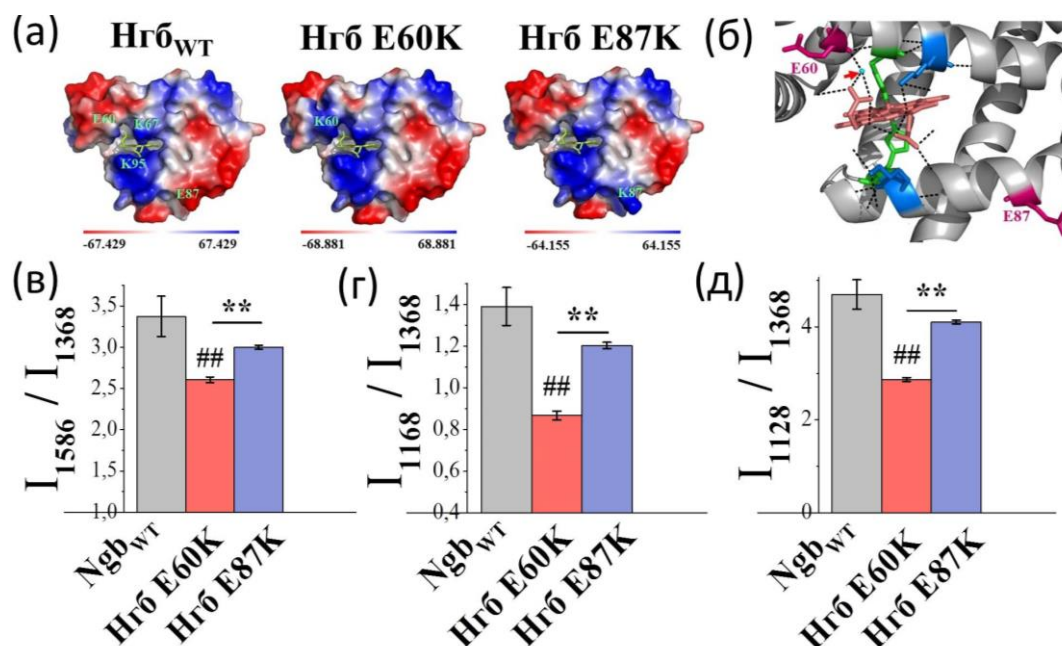
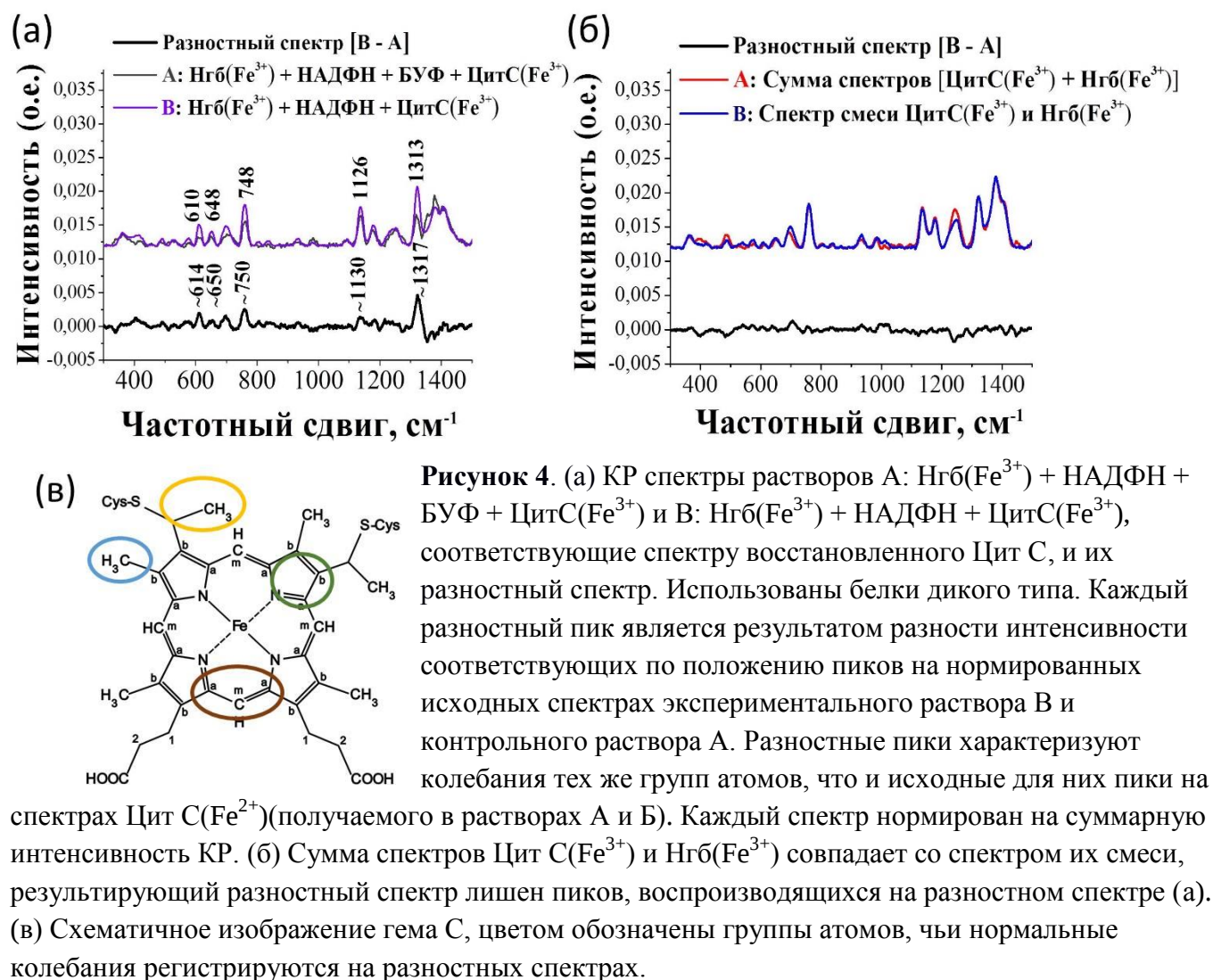


Рисунок 3. (а) Электростатические поверхности Нгб_{WT} (ID PDB: 4 MPM) и его мутантных вариантов. Электростатический потенциал показан в соответствии с красно-синей шкалой (kT/e). Гем показан зеленым цветом (б) Положение аминокислот белковой части Нгб, по которым производились замены, относительно гема (показан светло-коричневым цветом). Водородные связи показаны черными пунктирными линиями. Красная стрелка указывает на молекулу растворителя, которая соединяет Glu60 и гем Ngb. Аксиальные лиганды гема показаны зеленым цветом (His96 и His64). Изображения получены с помощью программы PyMOL. (в)-(д) Соотношения интенсивностей пиков, посчитанные на основе КР спектров Нгб(Fe^{2+}) и его мутантов. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ для мутантов Нгб по сравнению с Нгб_{WT}, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ для различных мутантов Нгб по сравнению друг с другом (непараметрический тест Манна–Уитни), $n = 5$.

2. Конформационные изменения гема цитохрома С дикого типа в редокс-реакции с нейроглобином дикого типа

Мы выяснили, что конформационные изменения гема цитохрома С дикого типа, восстанавливаемого от низкомолекулярного соединения (НАДФН), отличаются от изменений конформации гема, акцептирующего электрон у нейроглобина дикого типа (рисунок 4). На основе разностного спектра, показанного на рисунке 4(а), для пары диких типов Цит С и Нгб можно выделить следующие изменения гема С при акцептировании электрона цитохромом С от нейроглобина: увеличение вероятности плоской конформации гема (появление интенсивного пика 1317 см^{-1}), увеличение подвижности пиррольных колец (появление пиков 614 см^{-1} и 750 см^{-1}), сдвиг гема в гемовой щели (пик 650 см^{-1}). На разностных спектрах также присутствует низкоинтенсивный пик 1143 см^{-1} , происходящий от пика 1126 см^{-1} на КР-спектрах цитохрома С и отражающий вероятность колебаний метильных радикалов. Мы предполагаем, что обнаруженные

изменения конформации гема цитохрома С необходимы для принятия оптимальной ориентации относительно гема В нейроглобина и для сдвига гема С в его гемовой щели. Наши данные коррелируют с данными литературы, показывающими, что при восстановлении гема Цит С происходит его сдвиг на 0.14 Å (Takano and Dickerson, 1980). Важно, что при образовании комплекса между окисленными Нгб и Цит С конформации их гемов не изменяются (рисунок 4(б)). Это свидетельствует о том, что для конформационных изменений гема Цит С необходима восстановленная форма Нгб.



3. Влияние аминокислотных замен в микроокружении гемов и Ω-петле на редокс-реакцию цитохрома С и нейроглобина

Для того, чтобы изучить, от каких параметров микроокружения гема цитохрома С зависит акцептирование электрона от нейроглобина, мы исследовали конформационные изменения гема цитохрома С в ходе редокс-реакций в смесях 1) мутантных форм Цит С (с аминокислотными заменами в сайте связывания и Ω-петле) и дикого типа Нгб, 2) дикого типа Цит С и мутантных

форм Нгб (с аминокислотными заменами в сайте связывания) и 3) мутантных форм Цит С и мутантных форм Нгб (рисунок 5). Постановка эксперимента была такой же, как в случае исследования редокс-реакции между Цит С и Нгб дикого типа. Если разностные спектры исследованных редокс-пар мутантных форм Цит С и Нгб воспроизводили разностный спектр контрольной пары белков дикого типа, то делали вывод о протекании редокс-реакции и отсутствии влияния выбранной аминокислотной замены на перенос электрона. Если в разностных спектрах редокс-пар мутантных форм Цит С и Нгб пики исчезали или достоверно уменьшались, то делали заключение об отсутствии переноса электрона между Цит С и Нгб или снижении скорости данной реакции. На разностных спектрах, полученных для мутанта цитохрома С K25E и нейроглобина WT, отсутствуют пики с положениями 614, 650, 750, 1317 см^{-1} , характерные для разностного спектра взаимодействующих Цит С_{WT} и Нгб_{WT} (рисунок 5(а)). Разностные спектры мутанта Цит С T78S/K79P также обладают низкоинтенсивными пиками (614, 650, 1130, 1317 см^{-1}) (рисунок 5(а)). В совокупности эти данные свидетельствуют о нарушении редокс-реакции цитохрома С с нейроглобином при изменении электрического заряда в непосредственной близости от гема С и при увеличении жесткости Ω -петли, координирующей атом Fe гема С. Редокс-реакция между Нгб и мутантным цитохромом С не нарушалась при введении аминокислотной замены в положение 72, что говорит об отсутствии влияния локального заряда белковой части цитохрома С, удаленной от гема. Мы не наблюдали редокс-реакции между Цит С_{WT} и мутантным нейроглобином E60K (рисунок 5(б), красный спектр), хотя при этом протекала реакция между Цит С_{WT} и Нгб E87K. Данный результат свидетельствует, что для переноса электрона от Нгб к Цит С важен отрицательный заряд в положении 60 рядом с гемом В, а также водородные связи, которые образуют глутамат 60 и атом кислорода карбоксильной группы гема через молекулу H_2O . Изменение локального заряда в нейроглобине на отдалении от гема В не влияет на перенос электрона между Нгб и Цит С.

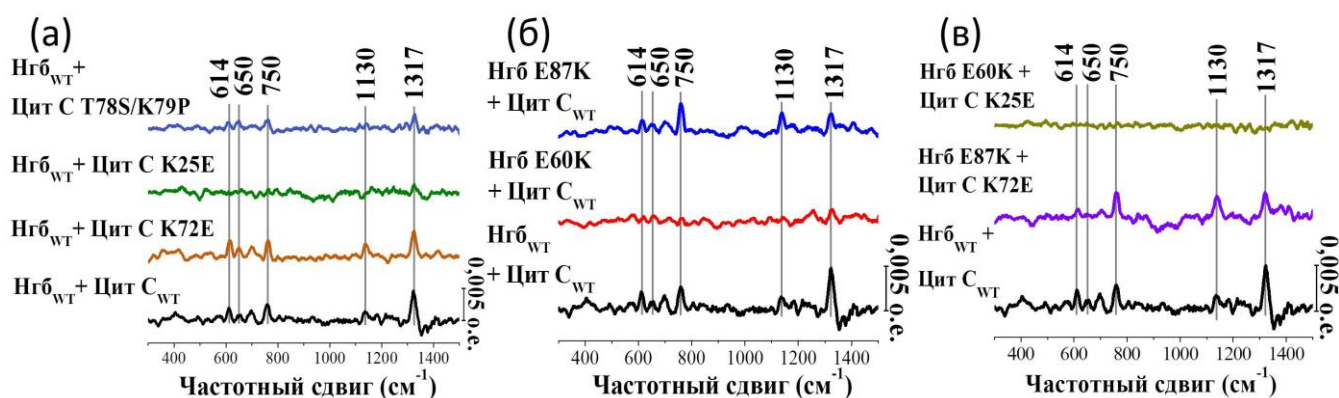


Рисунок 5. (а) Разностные спектры для редокс-пар Нгб_{WT}(Fe²⁺) + Цит С_{WT}(Fe³⁺) и редокс-пар Нгб_{WT} с мутантными Цит С; (б) редокс-пар мутантных Нгб(Fe²⁺) и Цит С_{WT}(Fe³⁺); (в) редокс-пар мутантных Нгб(Fe²⁺) с мутантными Цит С(Fe³⁺). Серыми вертикальными линиями отмечены положения максимумов разностных пиков, используемых в сравнительном анализе амплитуд.

Шкала 0,005 отн.ед. демонстрирует амплитудный диапазон разностных спектров для редокс-пары диких типов белков.

Для того, чтобы определить, важны ли для протекания редокс-реакции конформации гемов цитохрома С и нейроголобина или важно только электростатическое взаимодействие белков, мы провели анализ конформационных изменений гема Цит С в смеси мутантов: 1) Нгб E87K + Цит С K72E и 2) Нгб E60K + Цит С K25E. В первой паре мутантов конформационные свойства гемов обоих белков не отличаются от соответствующих для диких типов. Как и ожидалось, мы не зарегистрировали отклонений в протекании редокс-реакции между ними (рисунок 5(в), фиолетовый спектр). Во второй паре оба мутанта характеризуются измененными конформационными параметрами гемов (рисунки 2 и 3), и разностный спектр, зарегистрированный для этой пары не содержит никаких пиков, что свидетельствует об отсутствии переноса электрона между Нгб E60K и Цит С K25E. Следовательно, единичные нарушения электростатических связей в комплексе Нгб-Цит С не приводят к нарушению переноса электрона в отличие от мутаций, вызывающих изменение конформации гемов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для переноса электрона между восстановленным нейроголобином и окисленным цитохромом С необходимы следующие конформационные изменения гемов: увеличение вероятности плоской конформации гемов В и С, увеличение подвижности гемовых пирролов, а также сдвиг гема цитохрома С в гемовой щели за счет S-С связей с белком. Мы предполагаем, что указанные конформационные изменения необходимы для оптимальной ориентации гемов нейроголобина и цитохрома С друг относительно друга, что обеспечивает туннельный перенос электрона между их атомами железа. В свою очередь, изменение конформационных параметров гемов В и С зависит от локальных электрических зарядов в гемовой щели, подвижности Ω -петли цитохрома С и наличия водородной связи между глутаматом 60 нейроголобина, молекулой H_2O и атомом кислорода карбоксильного бокового радикала гема В. Мы считаем, что такие же изменения конформации гемов необходимы для переноса электрона между цитохромом С1 комплекса III и цитохромом С в ЭТЦ митохондрий.

4. Регуляция конформации гема цитохрома С в дыхательной цепи митохондрий при изменении макропараметров среды

Выявление конформационных изменений гема цитохрома С, необходимых для акцептирования электрона от нейроголобина, а также обнаружение зависимости конформации гема от локального заряда дает возможность предположить, что изменение конформации гема цитохрома С также может наблюдаться в митохондриях и может быть использовано для регуляции эффективности электронного переноса от комплекса III к цитохрому С. В связи с этим в следующей части работы мы исследовали изменение конформации гема цитохрома С от макропараметров среды — локального pH и потенциала на внутренней митохондриальной

мембране ($\Delta\Psi$). С использованием метода ГКР и серебряных плазмонных наноструктур мы зарегистрировали спектры ГКР от интактных митохондрий при разных режимах работы ЭТЦ: при добавлении субстратов цикла Кребса и АДФ, внесении протонофора CCCP и K^+ -ионофора валиномицина или ингибитора АТФ-синтазы олигомицина. Ранее мы показали, что ГКР-спектры митохондрий являются спектрами окисленного Цит С вследствие того, что серебряные наноструктуры усиливают сигнал КР только от гема окисленного цитохрома С, диффундирующего в межмембранном пространстве митохондрий и наиболее близко расположенного к поверхности наноструктур (рисунок 6(а)) (Brazhe et al, 2015; Brazhe et al, 2023). Внесение субстратов цикла Кребса к суспензии митохондрий активировало потребление кислорода на IV комплексе и, следовательно, электронный транспорт в дыхательной цепи, что приводило к формированию протонного градиента и потенциала ($\Delta\Psi$) на внутренней мембране митохондрий (ВММ). Внесение протонофора CCCP вызывало снижение протонного градиента и, как следствие, разобщение процессов переноса электронов в ЭТЦ и потребления протонного градиента АТФ-синтазой.

На спектрах ГКР цитохрома С в интактных митохондриях, как и в случае ГКР-спектра окисленного изолированного цитохрома С присутствуют интенсивные пики, характеризующие симметричные и асимметричные колебания колец пирролов (1371 и 1170 см^{-1}), метильных радикалов (1127 см^{-1}) и метиновых мостиков (1638 см^{-1}). Спектральный параметр I_{1638}/I_{1371} , посчитанный на основе спектров ГКР цитохрома С в митохондриях при разных режимах работы ЭТЦ (рисунок 6(б)), был выбран в качестве маркера конформации гема С: чем он больше, тем выше вероятность плоской конформации гема. Как было показано в предыдущем разделе, способность гема принимать плоскую конформацию является необходимым фактором для эффективного акцептирования электрона. При этом известно, что гем Цит С в плоской конформации обладает повышенной окислительной способностью.

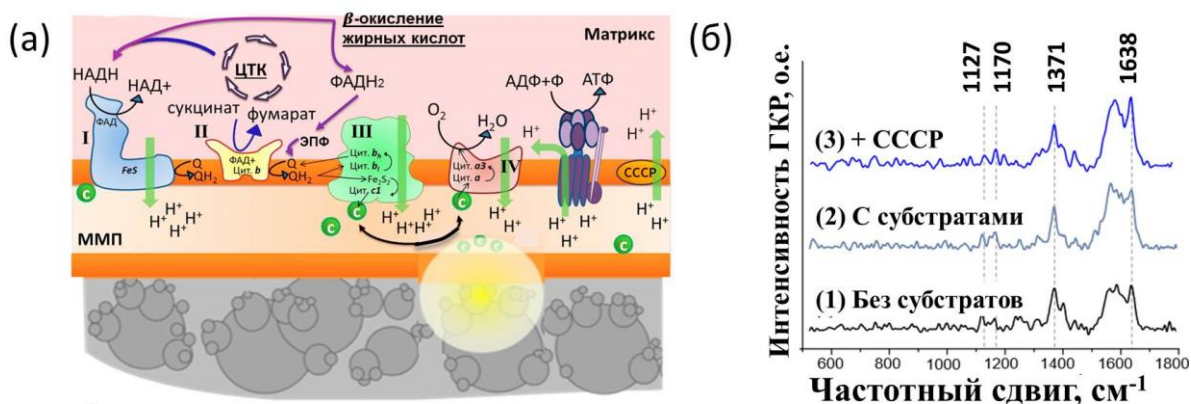


Рисунок 6. (а) Схема ЭТЦ митохондрии, расположенной на серебряных наноструктурах. Желтый круг – область усиления сигнала КР, захватывающая наружную мембрану митохондрии и окисленный Цит С. CCCP – протонофор, вносимый к интактным митохондриям для снижения

протонного градиента на ВММ. (б) ГКР спектры Цит С(Fe^{3+}) интактных митохондрий при (1) нормальном режиме работы ЭТЦ (2) активном режиме ЭТЦ при внесении субстратов цикла Кребса (малат, пируват, сукцинат и АДФ) (3) разобщении окислительного фосфорилирования и переноса электронов по ЭТЦ за счет внесения протонофора СССР (0.5 мкМ) к суспензии митохондрий. Все спектры нормированы на пик 1371 см^{-1} . Прерывистыми линиями обозначены пики, используемые в анализе конформации гема Цит С.

На рисунке 7(а) показано, что увеличение I_{1638}/I_{1371} положительно коррелирует со скоростью потребления кислорода митохондриями и отрицательно — с величиной $\Delta\Psi$ на ВММ. При максимальной скорости потребления O_2 и минимальным $\Delta\Psi$ на ВММ вследствие внесения СССР и валиномицина вероятность плоской конформации гема максимальна, в то время как при ингибировании потребления кислорода и максимальным $\Delta\Psi$ вследствие внесения олигомицина — вероятность плоской конформации гема минимальна. Мы также зарегистрировали ГКР спектры митохондрий и рассчитали параметр I_{1638}/I_{1371} при разном рН в суспензии митохондрий (рисунок 7(б)). Показано, что при более щелочной среде в суспензии митохондрий и, следовательно, в межмембранном митохондриальном пространстве вероятность плоской конформации гема цитохрома С увеличивается. Таким образом, регуляция активности ЭТЦ на уровне цитохрома С для синтеза АТФ и снижения образования супероксид-анион радикала в комплексе III связана с $\Delta\Psi$ -зависимыми переходами между плоской и искаженной конформациями гема цитохрома С.

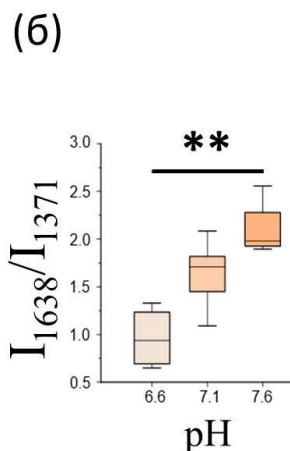
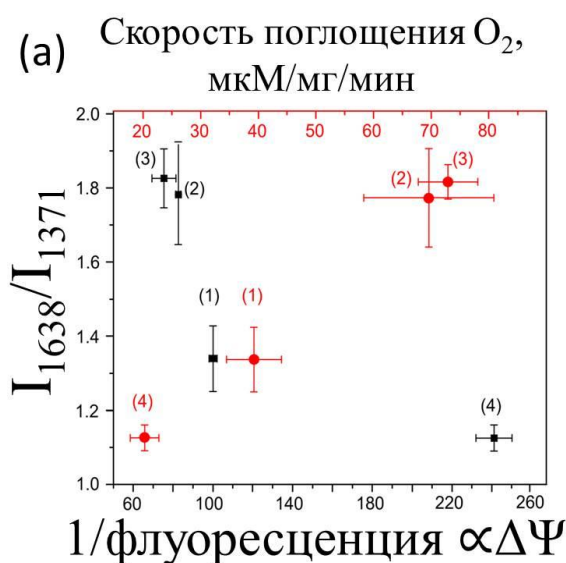


Рисунок 7. (а) Изменение соотношения I_{1638}/I_{1371} (вероятности плоской конформации гема С) в зависимости от скорости потребления кислорода митохондриями (красные кружки, красная ось X) и в зависимости от потенциала на внутренней мембране митохондрий ($\Delta\Psi$), который

оценивали по изменению обратной величины интенсивности флуоресценции MitoTracker CMXRos (черные квадраты, черная ось X). Измерения обоих показателей проводили для следующих состояний ЭТЦ: с использованием субстратов ЭТЦ (состояние 1), с последовательным добавлением либо СССР (состояние 2), либо валиномицина (состояние 3), либо олигомицина (состояние 4). Данные представлены в виде средних значений и ошибок среднего значения. (б) Зависимость параметра I_{1638}/I_{1371} от рН в митохондриальном буфере. Посчитано на основе 4 ГКР спектров митохондрий. $**p < 0,01$, непараметрический тест Крускала-Уоллиса с поправкой Данна на множественное сравнение после тестирования.

5. Нарушение регуляции конформации гема цитохрома С в митохондриях кардиомиоцитов крыс с повышенным артериальным давлением

Линия молодых крыс SHR (2-3 мес) с повышенным артериальным давлением (рисунок 8(а)) на фоне развивающейся спонтанной гипертензии, переходящей с возрастом в сердечную недостаточность, была использована в качестве модели сердечно-сосудистого заболевания. Методом просвечивающей электронной микроскопии было показано, что митохондрии кардиомиоцитов крыс SHR имеют более округлую форму с разбухшим матриксом и большим расстоянием между мембранами.

Было проведено ГКР-исследование конформации гема Цит С митохондрий крыс SHR в присутствии субстратов цикла Кребса (малат, пируват, сукцинат и АДФ) и при внесении протонофора CCCP. Было установлено, что при снижении $\Delta\Psi$ на ВММ за счет CCCP, конформация гема Цит С митохондрий крыс SHR не изменяется (рисунок 8(б-г)) в отличие от Цит С здоровых крыс линии WKY (рисунки 6(б) и 7(а)). Два других параметра, характеризующих подвижность пирролов гема и жесткость белкового микроокружения, не изменяются, что также наблюдалось для митохондрий крыс WKY. Мы предполагаем, что нарушение структуры крист и больший объем межмембранного пространства в кардиомиоцитах крыс при спонтанной гипертензии влияют на протонный градиент и локальное значение $\Delta\Psi$, в результате чего гем цитохрома С не изменяет конформацию при внесении CCCP.

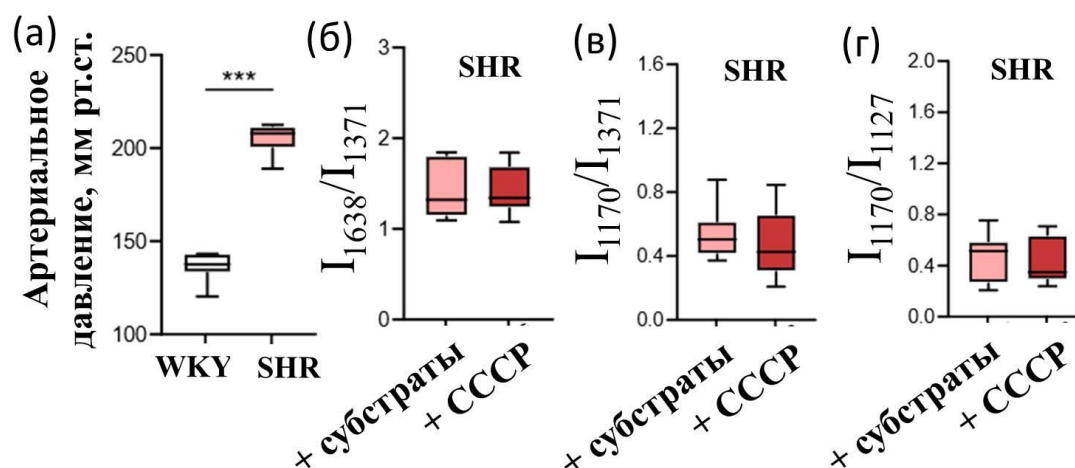


Рисунок 8. (а) Сравнение артериального давления крыс линий WKY и SHR. *** $p < 0.001$. Параметры, характеризующие (б) вероятность плоской конформации гема Цит С, (в) подвижность гемовых пирролов и (г) вероятность колебания метильных радикалов, посчитанные на основе ГКР спектров митохондрий крыс линии SHR: в присутствии субстратов цикла Кребса (розовые ящики) и при внесении 0,5 мкМ протонофора CCCP (красные ящики), нивелирующего протонный градиент и потенциал на ВММ. Посчитано на основе 6 независимых экспериментов. Непараметрический тест Крускала-Уоллиса с поправкой Данна на множественное сравнение после тестирования.

6. Фосфорилирование цитохрома С как потенциальный механизм регуляции конформации гема С в митохондриях

Переключение конформации гема Цит С между плоской и искаженной в функционирующей митохондрии в зависимости от макрофакторов среды $\Delta\Psi$ и pH подразумевает универсальные механизмы воздействия на диффундирующие в ММП молекулы Цит С. Мы исследовали, может ли фосфорилирование Цит С служить механизмом переключения конформации гема С. По спектрам ГКР мутантов Цит С (Y48E и Y97E), несущих дополнительный отрицательный заряд, имитирующий заряд остатка фосфорной кислоты, были рассчитаны конформационные параметры их гемов. Выяснилось, что вероятность плоской конформации гемов Цит С Y48E и Цит С Y97E достоверно снижена по сравнению с гемом дикого типа Цит С (рисунок 9(a)). Также для обоих мутантов-фосфомиметиков наблюдается увеличение жесткости белкового окружения гема (рисунок 9(в)). Мы предполагаем, что механизмом обнаруженного ранее снижения электрон-акцепторной активности фосфорилированного цитохрома С и ингибирования ЭТЦ является переход гема цитохрома С в искаженную конформацию и снижение подвижности пирролов, вызванные $\Delta\Psi$ -зависимым фосфорилированием цитохрома С по остаткам Y48 и Y97.

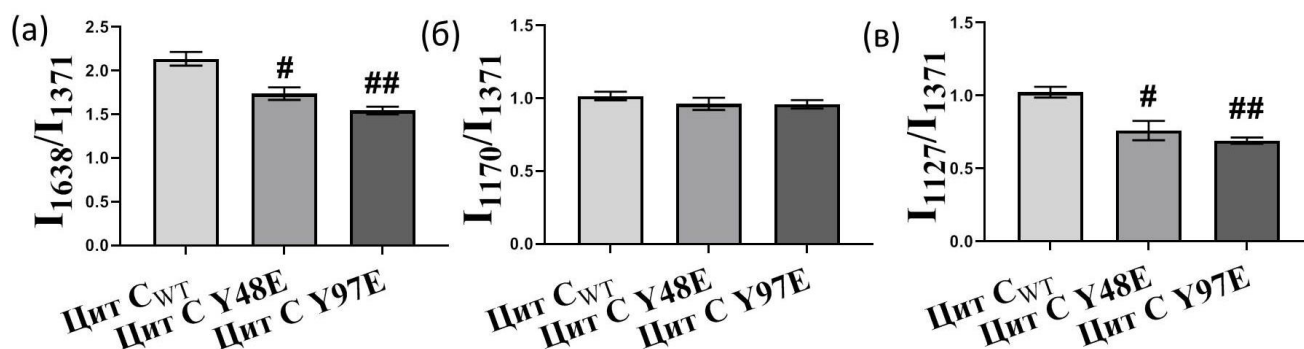


Рисунок 9. Конформационные параметры окисленных гемов дикого типа Цит С (светло-серые столбики) и мутантных цитохромов: Цит С Y48E (серые столбики) и Цит С Y97E (темно-серые столбики) с заменами по предполагаемым сайтам фосфорилирования нативного Цит С в ЭТЦ митохондрий. Параметры посчитаны на основе 5-ти независимых экспериментов. # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ для мутантов Цит С по сравнению с Цит С_{WT}, непараметрический тест Манни-Уитни.

7. Влияние гипоксии/реперфузии и гипоксического preconditionирования на конформацию гема цитохрома С и редокс-состояние цитохромов С и В-типов дыхательной цепи митохондрий кардиомиоцитов изолированного сердца

В следующей серии экспериментов мы исследовали, меняется ли конформация гема цитохрома С в митохондриях кардиомиоцитов изолированного сердца при разных режимах гипоксии, приводящей к гибели клеток, и гипоксическом preconditionировании, обладающим защитным действием на кардиомиоциты при последующей длительной гипоксии и реоксигенации

сердца. В ходе гипоксии происходит восстановление компонентов ЭТЦ с одновременной деполяризацией ВММ, так как протонный градиент продолжает потребляться АТФ-синтазой. Последующая реоксигенация вызывает всплеск продукции АФК, основным источником которых являются комплексы I и III ЭТЦ митохондрий. С помощью спектроскопии КР изолированных сердец мы показали, что в моделях краткой и длительной гипоксии (ишемии) и длительной гипоксии с гипоксическим прекондиционированием (ГПК) наблюдается значительное восстановление цитохромов С и В-типов (увеличение отношений I_{750}/I_{1000} и I_{1127}/I_{1000} соответственно, рисунок 10(в,г)) и снижение пула оксигенированного миоглобина (оМб) $I_{1377}/(I_{1358} + I_{1377})$ (рисунок 10(а)). Последующая реперфузия приводит к возвращению редокс-состояния цитохромов до предгипоксических значений на всех моделях кроме длительной гипоксии – для нее наблюдается избыточное окисление цитохромов. Измерение флуоресценции ФАД, кофермента комплекса II ЭТЦ, показало, что он более окислен в результате реперфузии в модели длительной ишемии по сравнению с гипоксией после ГПК (рисунок 10(е)). Совокупно эти наблюдения говорят об адаптационной роли ГПК, так как оно предотвращает избыточное окисление компонентов ЭТЦ по сравнению с длительной ишемией. Конформацию гема Цит С в спектрах КР сердца оценивали по соотношению интенсивностей пиков I_{570}/I_{750} (рисунок 10(б)). Уменьшение данного соотношения свидетельствует об уменьшении вероятности искаженной конформации гема. Изменение конформации гема ЦитС при гипоксии согласуется с нашими предыдущими наблюдениями: содержание Цит С с гемом в искаженной конформации падает при истощении протонного градиента в ходе гипоксии и возрастает до предишемических значений при восстановлении градиента после этапа реперфузии. При этом в случае длительной гипоксии без ГПК этот показатель существенно превышает предишемическое значение, что может быть связано с большей гиперполяризацией ВММ, которая не возникает в случае ишемии с ГПК. Данный результат свидетельствует о том, что после длительной гипоксии цитохром С из-за искаженной конформации гема обладает сниженной способностью к акцептированию электрона от комплекса III, что будет приводить к замедлению электронного транспорта в ЭТЦ и увеличению генерации супероксид-анион радикала.

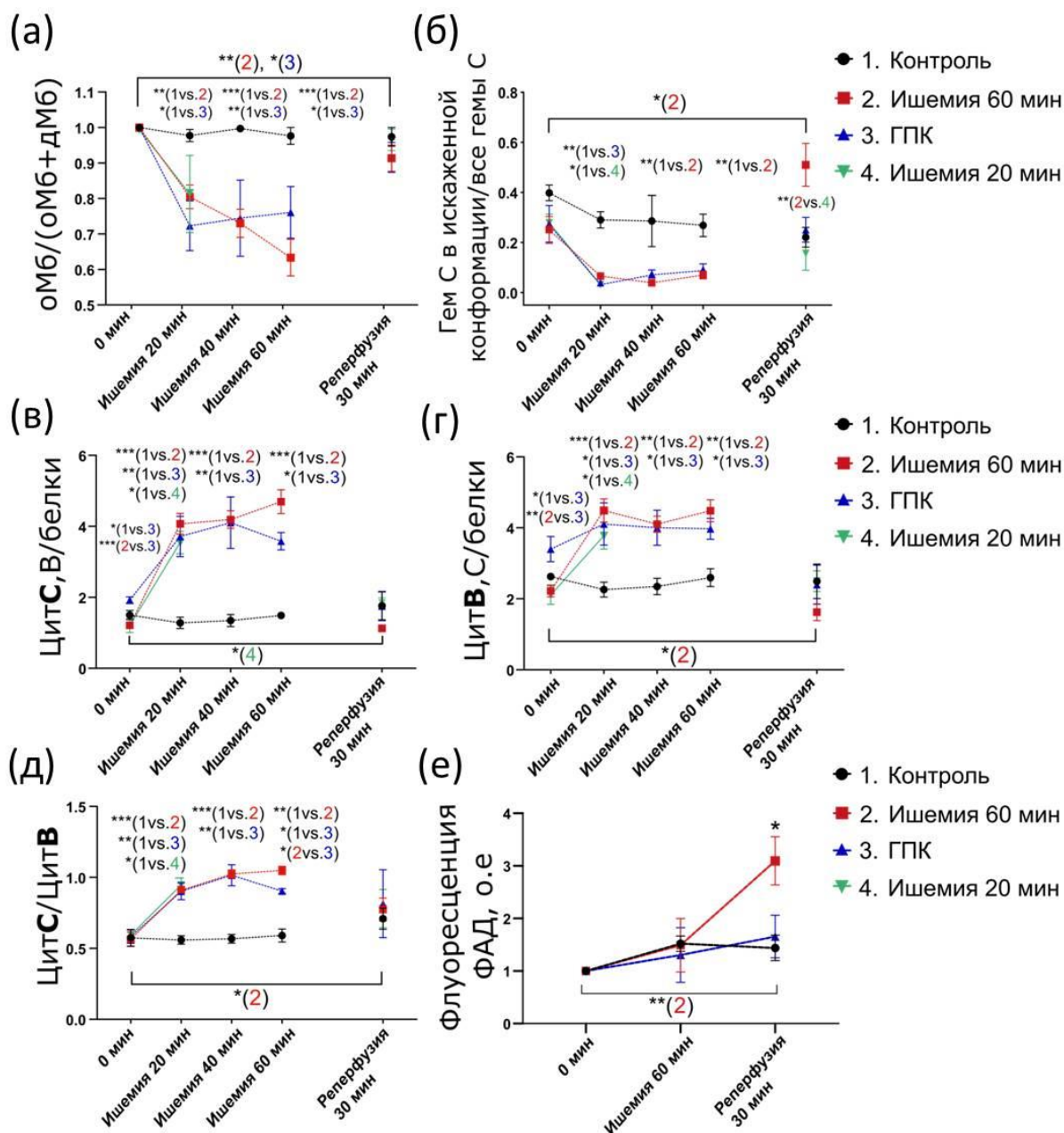


Рисунок 10. Кинетики изменений относительного содержания: оМб (а), восстановленных цитохромов С и В-типов относительно белков (в) и (г), восстановленных цитохромов С-типа относительно восстановленных цитохромов В-типа (д) и окисленного ФАД (е) в кардиомиоцитах сердец крыс при разных режимах гипоксии и реоксигенации и в контроле. (б) Изменение вероятности искаженной конформации гема цитохрома С. *, **, *** - значения $p < 0.05$, 0.01 и 0.001 соответственно (критерий Манна-Уитни).

Мы также выяснили, что в течение первых 10 мин реперфузии в модели с ишемией после ГПК происходит более медленная оксигенация дМб по сравнению с длительной ишемией (рисунок 11(а)) и более медленное окисление цитохромов С и В (рисунок 11(б, в)). Опираясь на литературные данные, мы предполагаем, что длительная ишемия приводит к увеличению проницаемости микрососудов и более активному поступлению кислорода к клеткам, что вызывает крайне быструю оксигенацию пула Мб и окисление компонентов ЭТЦ. В то же время было

показано, ГПК способствует сохранению интактности эпителия сосудов (Richard et al., 1994; Kharbanda et al., 2001).

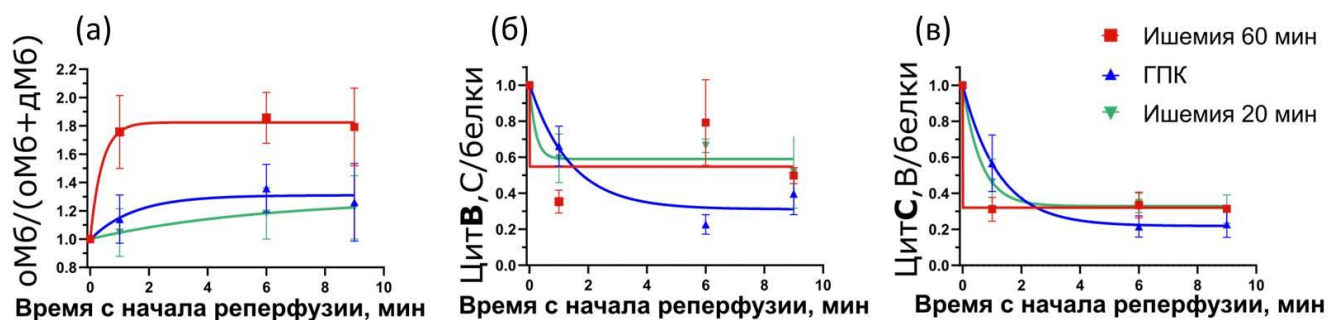


Рисунок 11. Динамика изменения относительного содержания оМб (а), динамика изменения содержания восстановленных Цит С (б) и Цит В (в) в тканях изолированного сердца крысы в течение реперфузии после длительной ишемии 60 мин (красная линия), после длительной ишемии с ГПК (синяя линия), после краткой ишемии 20 мин (зеленая линия). Данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего по измерениям 7 сердец за 1, 6 и 9 минуты реперфузии.

8. Продукция H_2O_2 в митохондриях кардиомиоцитов в модели ишемии/реоксигенации с гипоксическим прекондиционированием

С помощью флуоресцентной микроскопии мы показали, что короткие периоды гипоксии в ходе ГПК приводят к увеличению продукции пероксида водорода в митохондриях изолированных кардиомиоцитов, однако этот показатель снижается в течение последующего этапа длительной ишемии и к 35-ой минуте достоверно ниже по сравнению с моделью длительной ишемии без ГПК (рисунок 12(а)). Эти результаты согласуются с наблюдениями редокс-состояния компонентов ЭТЦ, которые оказываются более окислены в результате реперфузии в модели длительной ишемии. Таким образом, одним из протекторных механизмов ГПК является снижение степени продукции АФК. На рисунке 12(б) показано, что экзогенное внесение H_2O_2 после этапа реперфузии приводит к более интенсивному сигналу флуоресцентного биосенсера в случае длительной ишемии без ГПК. Это может говорить об активации антиоксидантных систем клетки в модели с ГПК, что, в свою очередь, обуславливает сниженную продукцию H_2O_2 .

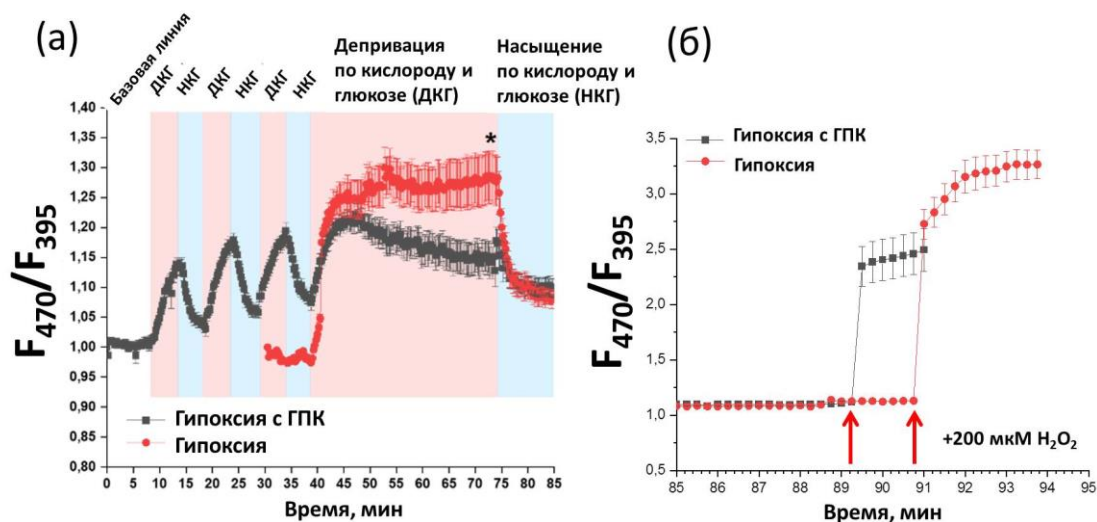


Рисунок 12. (а) Динамика изменения уровня H_2O_2 в матриксе митохондрий кардиомиоцитов в условиях гипоксии/реоксигенации с прекондиционированием (серая кривая) и без него (красная кривая). (б) Динамика изменения уровня H_2O_2 в матриксе митохондрий кардиомиоцитов, испытавших ($n=43$) и не испытавших ($n=40$) прекондиционирование, в ответ на экзогенную добавку $200 \text{ мкМ } H_2O_2$. Сигнал биосенсора HyPer7-mito (соотношение F_{470}/F_{395}) нормализован и усреднен. Количество повторностей измерения каждой клетки $N=3$, планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

Заключение

Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что переходы между плоской и искаженной конформациями гема цитохрома С могут быть универсальным механизмом регуляции активности цитохрома С в редокс-реакции с его гемсодержащими донорами электронов: цитохромом С1 комплекса III ЭТЦ и нейроглобином.

Показано, что акцептирование электрона окисленного цитохрома С от восстановленного нейроглобина зависит от вероятности плоской конформации гемов С и В и подвижности их пирролов. При переносе электрона от гема нейроглобина к гему цитохрома С происходит дополнительное увеличение вероятности плоской конформации гема С, чему способствуют заряды аминокислотного окружения в области гемов С и В и подвижность Ω -петли, координирующей гем С. Перенос электрона также обеспечивается сдвигом гема С в гемовой щели, в результате чего уменьшается расстояние между гемами Цит С и Нгб. Мутанты цитохрома С, которые характеризуются снижением подвижности пирролов (Цит С K25E, Цит С T78S/K79P) и снижением вероятности плоской конформации гема (Цит С T78S/K79P), не вступают в редокс-реакцию с Нгб. Известно, что цитохром С обладает универсальным сайтом связывания, за счет которого осуществляется взаимодействие как с Нгб, так и с цитохромом С1 комплекса III, что позволяет предполагать, что редокс-реакция цитохрома С с цитохромом С1 зависит от таких же конформационных изменений гемов, как и в случае реакции с нейроглобином.

Установлено, что переходы между плоской и искаженной конформациями гема цитохрома С зависят от разности потенциалов на внутренней мембране митохондрий ($\Delta\Psi$) и от pH в

межмембранном пространстве, при этом $\Delta\Psi$ является основным фактором, влияющим на конформацию гема и электрон-акцепторную способность цитохрома С в митохондриях. Обнаружено, что вероятность плоской конформации гема и подвижность пирролов мутантов-фосфомиметиков Цит С Y48E и Y97E снижены, что препятствует эффективному переносу электронов. Эти данные свидетельствуют о том, что $\Delta\Psi$ -зависимое фосфо- и дефосфорилирование цитохрома С может служить механизмом регуляции электрон-транспортной активности ЭТЦ за счет переходов между искаженной и плоской конформациями гема цитохрома С. В то же время при патологических условиях регуляция переходов гема Цит С между плоской и искаженной конформациями нарушена — конформация гема С нечувствительна к снижению $\Delta\Psi$ на внутренней мембране митохондрий кардиомиоцитов крыс со спонтанной гипертонией в отличие от гема Цит С митохондрий крыс с нормальным давлением. Возможно, это объясняется измененной морфологией митохондрий крыс SHR: нарушение структуры крист и большой объем межмембранного пространства влияют на протонный градиент и локальное значение $\Delta\Psi$, в результате чего изменяется вероятность перехода гема цитохрома С между его конформациями. Длительная гипоксия с последующей реперфузией, вызывающей гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны кардиомиоцитов сердца, переводит пул митохондриальных цитохромов С в состояние с искаженным гемом, возможно, вследствие $\Delta\Psi$ -зависимого фосфорилирования, что замедляет перенос электронов цитохромом С между комплексами III и IV. Применение серии кратких периодов гипоксии сердца перед длительным интервалом гипоксии приводит к поддержанию способности гема Цит С принимать плоскую конформацию после реперфузии и, следовательно, сохраняется электрон-акцепторная активность цитохрома С.

Таким образом, в условиях *in vitro* и *in vivo* мы установили, что конформация гема цитохрома С и его функциональная активность зависят как от свойств собственного белкового окружения, непосредственно определяющего белок-гемовые взаимодействия и координацию гема, так и от макропараметров среды в межмембранном пространстве митохондрий. Конформационные изменения гема цитохрома С, в свою очередь, необходимы для эффективной регуляции электрон-акцепторной функции цитохрома С и активности электронного транспорта в дыхательной цепи митохондрий.

Выводы

1. Применение спектроскопий КР и ГКР с лазерным возбуждением 532 нм позволяет оценить редокс-состояние цитохромов С и В-типов и нейроглобина, вероятность реализации плоской конформации гемов, подвижность пирролов, сдвиг гема С в гемовой щели, а также исследовать изменение конформационных параметров гема цитохрома С при акцептировании электрона от редокс-партнера в условиях *in vitro* и *in vivo*.

2. Установлено, что в окисленном цитохроме С аминокислотная замена T78S/K79P в Ω -петле, участвующей в координации атома гемового железа, приводит к уменьшению подвижности пиррольных колец и вероятности плоской конформации гема (проявляется как снижение соотношений интенсивностей пиков КР I_{1170}/I_{1371} и I_{1638}/I_{1371} , соответственно). Аминокислотная замена K25E в цитохроме С вызывает уменьшение подвижности пирролов, а замена K72E никак не влияет на конформационные параметры гема.
3. Показано, что в восстановленном нейроглобине аминокислотная замена E60K в сайте взаимодействия приводит к снижению вероятности плоской конформации гема, уменьшению подвижности пиррольных колец и снижению вероятности колебания гемовых метильных радикалов (уменьшение соотношений I_{1586}/I_{1368} , I_{1168}/I_{1368} , I_{1128}/I_{1368} , соответственно), что может быть связано с близким расположением указанного аминокислотного остатка к гему и наличием водородной связи между глутаматным остатком в положении 60, молекулой H_2O и карбоксильной группой гема. Аминокислотная замена E87K в сайте взаимодействия Нгб не влияет на конформацию гема.
4. Эффективность акцептирования электрона гемом цитохрома С от нейроглобина зависит от локальных зарядов поверхности гемовой щели, подвижности Ω -петли цитохрома С, вероятности реализации плоской конформации гемов Цит С и Нгб, подвижности пиррольных колец гемов и сдвига гема С в гемовой щели.
5. Макропараметры локального окружения цитохрома С, такие, как рН в межмембранном пространстве митохондрий и разность потенциалов на внутренней митохондриальной мембране, влияют на конформацию гема окисленного цитохрома С в интактных митохондриях: увеличение рН в среде с митохондриями от 6.6 до 7.6, аппликация протонифора CCCP или K^+ -ионофора валиномицина сопровождаются увеличением вероятности плоской конформации гема цитохрома С, а добавление ингибитора АТФ-синтазы олигомицина приводит к уменьшению вероятности плоской конформации гема цитохрома С.
6. Установлено, что аминокислотные замены тирозина на глутамат в положениях 48 и 97, имитирующие фосфорилирование цитохрома С, снижают вероятность плоской конформации гема С. Возможным механизмом регуляции активности цитохрома С в редокс-реакции с комплексом III является фосфорилирование белковой части Цит С по Y48 и Y97, происходящее при повышении $\Delta\Psi$ и увеличивающее вероятность искаженной конформации гема, что снижает способность цитохрома С акцептировать электрон от комплекса III.
7. Показано, что в митохондриях кардиомиоцитов здоровых крыс в условиях ускорения митохондриального дыхания увеличивается вероятность плоской конформации гема

цитохрома С, что способствует ускорению переноса электрона между комплексом III и цитохромом С. В митохондриях крыс с повышенным артериальным давлением условия, требующие ускорения работы дыхательной цепи, не приводят к изменению конформации гема цитохрома С.

8. Установлено, что гипоксическое preconditioning, проведенное перед длительной гипоксией сердца, приводит к снижению генерации H_2O_2 в митохондриях кардиомиоцитов при гипоксии, а также предотвращает избыточное окисление цитохромов дыхательной цепи и сопровождается увеличением вероятности плоской конформации гема цитохрома С в ходе реперфузии после гипоксии.

Основные публикации Бочковой Жанны Владиславовны по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1. Semenova M. A., **Bochkova Z. V.**, Smirnova O. M., Maksimov G. V., Kirpichnikov M. P., Dolgikh D. A., Brazhe N. A., and Chertkova R. V. Charged Amino Acid Substitutions Affect Conformation of Neuroglobin and Cytochrome c Heme Groups // *Current Issues in Molecular Biology*. — 2024. — Vol. 46, № 4. — P. 3364–3378. doi: [10.3390/cimb46040211](https://doi.org/10.3390/cimb46040211) (JIF: 2.8, Объем: 1.7325 п.л./Вклад: 0,693 п.л.)
2. Brazhe N. A., Nikelshparg E. I., Baizhumanov A. A., Grivennikova V. G., Semenova A. A., Novikov S. M., Volkov V. S., Arsenin A. V., Yakubovsky D. I., Evlyukhin A. B., **Bochkova Z. V.**, Goodilin E. A., Maksimov G. V., Sosnovtseva O., and Rubin A. B. SERS uncovers the link between conformation of cytochrome c heme and mitochondrial membrane potential // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2023. — Vol. 196. — P. 133–144. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2023.01.013](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.01.013) (JIF: 7.1, Объем: 1.386 п.л./ Вклад: 0,416 п.л.)
3. Семенова М.А., **Бочкова Ж.В.**, Смирнова О.М., Игнатова А.А., Паршина Е.Ю., Зиганшин Р.Х., Бочаров Э.В., Браже Н.А., Максимов Г.В., Кирпичников М.П., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Разработка системы биосинтеза, выделения и очистки холоформы рекомбинантного нейроглобина и его физико-химическая характеристика // *Биоорганическая химия*. — 2023. — Т. 49, № 3. — С. 319–330. doi: [10.31857/S013234232303020X](https://doi.org/10.31857/S013234232303020X) (ИФ РИНЦ: 0.81, Объем: 1.386 п.л./ Вклад: 0,416 п.л.)
4. **Бочкова Ж.В.**, Ли В., Браже Н.А., Жгун А.А., Максимов Г.В. Исследование с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния конформации флавинадениндинуклеотида – кофермента оксидазы D-аминокислот // *Биофизика*. — 2023. — Т. 68, № 5. — С. 878–884. DOI: [10.31857/S000630292305006X](https://doi.org/10.31857/S000630292305006X) (ИФ РИНЦ 0.99, Объем: 0.693 п.л./ Вклад: 0,347 п.л.)
5. Chertkova R. V., Firsov A. M., Brazhe N. A., Nikelshparg E. I., **Bochkova Z. V.**, Bryantseva T. V., Semenova M. A., Baizhumanov A. A., Kotova E. A., Kirpichnikov M. P., Maksimov G. V., Antonenko Y. N., Dolgikh D. A. Multiple Mutations in the Non-Ordered Red Ω -Loop Enhance the Membrane-Permeabilizing and Peroxidase-like Activity of Cytochrome c. // *Biomolecules*. — 2022. — Vol. 12, №. 5. — P. 665. doi: [10.3390/biom12050665](https://doi.org/10.3390/biom12050665) (JIF: 4.8, Объем: 1.7325 п.л./ Вклад: 0,293 п.л.)
6. Nikelshparg E. I., Baizhumanov A. A., **Bochkova Z. V.**, Novikov S. M., Yakubovsky D. I., Arsenin A. V., Volkov V. S., Goodilin E. A., Semenova A. A., Sosnovtseva O., Maksimov G. V., and Brazhe N. A. Detection of Hypertension-Induced Changes in Erythrocytes by SERS Nanosensors // *Biosensors*. — 2022. — Vol. 12, №. 1. — P. 32. doi: [10.3390/bios12010032](https://doi.org/10.3390/bios12010032) (JIF: 4.9, Объем: 1.386 п.л./ Вклад: 0,416 п.л.)