

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**БОЧКОВА ЖАННА ВЛАДИСЛАВОВНА**

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

Специальность (1.5.2., «Биофизика»)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
к.б.н., Браже Надежда Александровна

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность и степень разработанности темы .....	6
Цели и задачи исследования .....	8
Положения, выносимые на защиту: .....	9
Научная новизна работы.....	9
Теоретическая и практическая значимость .....	9
Методология и методы исследования.....	10
Степень достоверности и апробация результатов .....	10
Публикации.....	10
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	11
1.1. Функциональное разнообразие гемопротейнов и структура порфиринового макроцикла.....	11
1.1.1 Структура и функциональная активность цитохрома С.....	13
1.1.2 Структура гема В нейроглобина и его функциональная активность	18
1.2 Конформации порфиринового цикла и их функциональная значимость...	23
1.2.1 Регуляция редокс-потенциала гемопротейна посредством конформационных деформаций .....	28
1.3 Спектроскопия комбинационного рассеяния, как метод регистрации конформационных состояний гема в составе белков, изолированных органелл и клеток.....	30
1.3.1 Принцип спектроскопии комбинационного (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР).....	30
1.3.2 Основные характеристики спектров КР и ГКР гемов С и В в восстановленном и окисленном состояниях .....	35
1.3.3 Регистрация ГКР спектров от изолированных митохондрий.....	40
1.4 Дыхательная цепь митохондрий .....	44
1.4.1 Организация комплексов ЭТЦ.....	47
1.4.2 Клеточная регуляция активности дыхательной цепи.....	48

1.5	Заключение .....	53
2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	55
2.1.	Синтез диких и мутантных форм Цит С и Нгб .....	55
2.1.1.	Реактивы и оборудование для синтеза рекомбинантных Цит С и Нгб . .....	55
2.1.2.	Протокол внесения мутаций в генные последовательности Цит С и Нгб .....	56
2.1.3.	Экспрессия и выделение диких и мутантных форм ЦитС и Нгб.....	57
2.2.	Регистрация и обработка РКР и ГКР спектров диких и мутантных форм ЦитС и Нгб.....	58
2.2.1.	Реактивы и оборудование для синтеза наноструктур и проведения РКР измерений.....	58
2.2.2.	Приготовление наноструктур для ГКР спектроскопии .....	59
2.2.3.	Регистрация и анализ РКР спектров восстановленных форм Цит С и Нгб и ГКР спектров окисленных форм соответственно .....	60
2.2.4.	Методология регистрации редокс-реакции между Нгб( $Fe^{2+}$ ) и Цит С( $Fe^{3+}$ ) и их мутантными формами с помощью РКР-спектроскопии.....	64
2.3.	ГКР методология для регистрации конформационных изменений гема Цит С интактных митохондрий .....	70
2.3.1.	Животные: крысы линий WKY и SHR .....	70
2.3.2.	Реактивы и оборудование для выделения митохондрий, и проведения ГКР исследований .....	71
2.3.3.	Измерение систолического давления крыс .....	72
2.3.4.	Выделение митохондрий и определение общей концентрации белка в суспензии митохондрий.....	73
2.3.5.	Измерение активности митохондриального дыхания.....	74
2.3.6.	Исследование конформационных изменений гема Цит С в интактных митохондриях .....	77
2.4.	КР спектроскопия интактных сердец крыс.....	78
2.4.1.	Животные: крысы линии Sprague Dawley .....	78
2.4.2.	Реагенты и оборудование для извлечения и перфузирования сердец	78
2.4.3.	Выделение и перфузия сердец крыс.....	79
2.4.4.	Индукция ишемии изолированных сердец.....	80
2.4.5.	Регистрация КР-спектров от сердец.....	80
2.4.6.	Анализ КР спектров сердца.....	80

2.5.	Мониторинг уровня синтеза $H_2O_2$ в зрелых кардиомиоцитах крыс в условиях кислородно-глюкозной депривации и последующей реперфузии с прекондиционированием и без него.....	82
2.5.1.	Выделение и трансдукция зрелых кардиомиоцитов .....	82
2.5.2.	Моделирование условий кислородно-глюкозной депривации с гипоксическим прекондиционированием и без .....	83
2.5.3.	Измерение сигнала флуоресцентного биосенсора на содержание $H_2O_2$ в зрелых кардиомиоцитах в условиях гипоксии/реоксигенации .....	83
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ и ОБСУЖДЕНИЯ.....	85
3.1.	Исследование конформационных свойств гемов цитохрома С и нейроглобина при внесении аминокислотных замен в контактных поверхностях и $\Omega$ -петле гема .....	85
3.1.1.	Ключевые характеристики спектров комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния диких форм цитохрома С и нейроглобина .....	85
3.1.2.	Белковые и гемовые отличия мутантных форм нейроглобина с аминокислотными заменами в сайте связывания .....	88
3.1.3.	Белковые и гемовые отличия форм цитохрома С с аминокислотными заменами в сайте связывания и $\Omega$ -петле .....	92
3.2.	Влияние аминокислотных замен в микроокружении гемов и $\Omega$ -петле на редокс-реакцию цитохрома С и нейроглобина .....	97
3.2.1.	Конформационные изменения гема цитохрома С дикого типа в редокс-реакции с нейроглобином дикого типа .....	97
3.2.2.	Влияние аминокислотных замен в микроокружении гемов и $\Omega$ -петле на редокс-реакцию цитохрома С и нейроглобина .....	101
3.2.3.	Исследование протекания редокс-реакции между диким типом Цит С( $Fe^{3+}$ ) и мутантными формами Нгб( $Fe^{2+}$ ) .....	105
3.2.4.	Оценка вероятности прохождения редокс-реакции между мутантными формами Цит С( $Fe^{3+}$ ) и мутантными формами Нгб( $Fe^{2+}$ ) по спектральным параметрам гема С .....	108
3.3.	Регуляция конформации гема цитохрома С в дыхательной цепи митохондрий при изменении макропараметров среды .....	112
3.3.1.	Изменение конформации гема Цит С при модуляции работы дыхательной цепи митохондрии.....	112
3.3.2.	Чувствительность конформации гема Цит С к рН и $\Delta\Psi$ на внутренней митохондриальной мембране.....	117
3.3.3.	Регуляция конформации гема Цит С посредством фосфорилирования его белковой части .....	121
3.4.	Нарушение регуляции конформации гема цитохрома С в митохондриях кардиомиоцитов крыс с повышенным артериальным давлением .....	124

3.4.1.	Отличия в ультраструктуре сердечной ткани крыс с нормальным давлением и с артериальной гипертонией.....	124
3.4.2.	Нарушение регуляции конформации гема Цит С в условиях артериальной гипертонии.....	125
3.5.	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 .....	127
3.5.1.	КР спектроскопия изолированного сердца крысы в разных моделях ишемии/реперфузии.....	127
3.5.2.	Влияние ГПК на динамику редокс-состояния цитохромов С и В и оксигенацию Мб в ходе ишемии и реперфузии изолированного сердца.....	132
3.5.3.	Влияние ГПК на динамику редокс-состояния цитохромов С и В и оксигенацию Мб в ходе реперфузии.....	139
3.6.	Динамика содержания $H_2O_2$ в изолированных зрелых кардиомиоцитах при длительной гипоксии/реоксигенации и при гипоксии/реоксигенации с гипоксическим preconditionированием.....	142
3.7.	Заключение.....	145
ВЫВОДЫ .....		147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		149
Благодарности.....		167

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВММ — внутренняя митохондриальная мембрана  
 ГКР — гигантское комбинационное рассеяние  
 КР — комбинационное рассеяние  
 ММП — межмембранное пространство митохондрий  
 Нгб — нейроглобин  
 Цит В — цитохром В  
 Цит С — цитохром С  
 ЭТЦ — электрон-транспортная цепь

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 С1 комплекса III к цитохрому С происходит по туннельному механизму и зависит от гем-белковых и гем-гемовых взаимодействий цитохрома С с цитохромом С1 (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 гемопротейнов 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 Ли (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 гемопротейнов 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 гемопротейнов 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  $\Omega$ -петли цитохрома С, локальный рН 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 C, способствуя быстрому переносу электронов на участке комплекс III — цитохром C — комплекс IV.

### **Методология и методы исследования**

Для исследования конформации гема цитохрома C в зависимости от микро- и макроокружения, а также редокс-состояния цитохромов C и B в норме и при патологиях использовали очищенные препараты цитохрома C 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.

# 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1. Функциональное разнообразие гемопротеинов и структура порфиринового макроцикла

Гемопротеины – семейство гем-содержащих белков, отвечающих за широкий профиль биохимических функций. Один из первых и наиболее изученных гем-содержащих белков – гемоглобин, который относится к группе переносчиков низкомолекулярных газообразных лигандов (Perutz, 1979). К этой же группе принадлежит миоглобин, запасующий кислород в мышцах. Другой хорошо изученный гем-содержащий белок – цитохром С представляет функциональную группу переносчиков электронов, участвующих в редокс-реакциях с другими белками, (Bertini *et al.*, 2006) вместе с цитоглобином и относительно недавно описанным нейроглобином (Van Doorslaer, *et al.*, 2004). Часть гемопротеинов выполняют антиоксидантную функцию (каталазы, пероксидазы) и катализируют ферментативные реакции разных типов (Цит Р450, циклазы, лигниназы) (Jentzen *et al.*, 1998).

При разнообразии вторичной и третичной структур, моно- или полимерности, самостоятельности или включённости в белковый комплекс, все эти белки объединяет наличие кофактора – консервативного жёсткого и относительно плоского порфиринового цикла (Cuesta and Sessler, 2009). Его основу представляют четыре пиррольных кольца, соединённых между собой метиновыми мостиками. Четыре атома азота пиррольных колец, расположенные в одной плоскости, координируют центральный атом металла ковалентными и донорно-акцепторными связями. Сопряжённая система двойных связей порфиринового цикла с перекрывающимися  $\pi$ -орбиталями придаёт изолированной структуре гема жёсткость и плоскостную конформацию. Порфириновый макроцикл состоит из 20 атомов углерода и 4 атомов азота, традиционно их обозначают не только по номерам, но и в связи с их положением относительно соседних атомов. Так,  $C_\alpha$  атомы связаны с азотами,  $C_\beta$  – только с другими атомами углерода, а  $C_m$  – углероды метиновых мостиков, соединяющие два пиррольных кольца (Hu *et al.*, 1993).

Гемы подразделяются на типы в зависимости от боковых радикалов, присоединённых к 3, 8 и 18 углеродным атомам гема: гемы А, В и С (Schweitzer-Stenner, 2022). Также гемы отличаются количеством координационных связей атома металла в перпендикулярной к гему плоскости. Наиболее распространёнными и изученными являются гемы С и В типов, на которых мы акцентируемся (Рисунок 1).

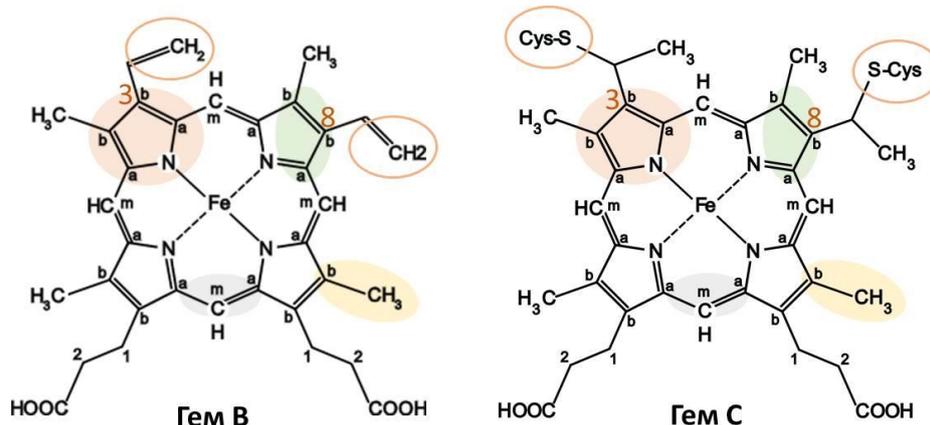


Рисунок 1. Схематичное изображение гемов В и С типа. Прерывистыми линиями обозначены донорно-акцепторные координирующие связи атома Fe. Окружностями выделены боковые радикалы в 3-ем и 8-ом положениях, отличающиеся у гемов разного типа.

Гем В включает две винильные группы ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) в 3 и 8 положениях и метильный радикал в 18. Он может быть пятикоординированным за счёт связи атома железа с гистидином аминокислотной цепи белка. В этом случае гем принимает пирамидную конформацию и уплощается при связывании  $\text{O}_2$  или  $\text{CO}$  в качестве лиганда (Shelnutt *et al.*, 1979; Perutz, 1979; Brazhe *et al.*, 2009). Такой гем В содержится в гемоглобине и миоглобине, обеспечивая их способность связывать и переносить кислород, а также в цитохроме В-типа третьего комплекса ЭТЦ митохондрий. Нейроглобин, цитоплазматический белок, также содержит гем В, при этом он шестикоординированный, связанный с остатками гистидина в белковом кармане (Hamdane *et al.*, 2004).

Гем С – единственный гем, ковалентно связанный с белковым карманом через тиоэфирные связи с двумя цистеиновыми остатками Cys14 и Cys17 в 3 и 8 положениях гема. Это шестикоординированный гем, чей атом железа кроме четырех связей с атомами азота пиррольных колец координирован также двумя боковыми лигандами аминокислотных цепей белка (Ciaccio *et al.*, 2017). Содержащие гем С белки цитохромы участвуют в окислительно-восстановительных (редокс) реакциях. Наибольшее количество цитохромов С-типа содержится в митохондриях, где они обеспечивают перенос электронов с третьего на четвёртый комплекс электрон транспортной цепи (ЭТЦ). Цит С – единственный переносчик электронов, совершающий трёх-и двухмерную диффузию в межмембранном пространстве митохондрий (ММП) (Berndtsson *et al.*, 2020). Особое положение Цит С делает его удобной мишенью для исследования зависимости конформации гема от модуляции условий работы ЭТЦ. Являясь «белком жизни» благодаря участию в энергетических процессах клетки, Цит С также участвует в цепи реакций инициации апоптоза, в окисленном виде формируя апоптосому с фактором апоптотической протеазы 1 (Araf-1) при выходе в цитоплазму, которая в свою очередь активирует каскад каспаз (Okada *et al.*, 2012).

Гем А несет длинный боковой радикал в положении 3 и альдегидную группу в 18. Он так же, как и гем В, координируется боковыми цепями аминокислот и не связан ковалентно с апопротеином. Гем А содержится в четвертом комплексе ЭТЦ, цитохром с-оксидазе (Taanman, 1997).

Мы подробнее рассмотрим функциональность двух гемопротеинов, обладающих гемами С и В типа: Цит С и нейроглобина (Нгб) соответственно. Исследованию их конформационных свойств и связи с активностью гемопротеинов во многом посвящена эта работа.

### 1.1.1 Структура и функциональная активность цитохрома С

Цит С критически важен для поддержания нормального протекания клеточных процессов, участвуя с одной стороны в регуляции работы «энергетической

станции» клетки, ЭТЦ, а с другой – в регуляции клеточной смерти за счет редокс-реакций с Araf-1 и нейроглобином, ингибирующим апоптоз на ранних этапах.

Цит С – мономерный белок, содержащий 104 аминокислоты, которые уложены в 5  $\alpha$ -спиралей и 6  $\beta$ -слоев. Денатурация Цит С протекает при рН 2.2 и 1.5 М NaCl, при этом белок переходит в т.н. А-состояние, характеризующееся частичным разворачиванием петель и раскрытием гемового кармана. В этом кармане располагается шестикоординированный низкоспиновый гем, причем две координационные связи обеспечиваются аксиальными лигандами железа: гистидином (His18) и метионином (Met80). Met80 в качестве лиганда критичен для эффективной электрон-транспортной функции. В работе Jordan *et al.*, 1995 разворачивали аминокислотную цепь с помощью гидрохлорида гуанидиния (GdHCl) и заменили Met80 на имидазол, что вызвало сдвиг аминокислотных остатков и нарушение конформации гема.

Кроме того, два остатка цистеина (Cys14 и Cys17) на двух пиррольных кольцах присоединяют гем к протеиновой части через тиоэфирные связи. Два противоположных пиррольных кольца содержат по одной пропионовой группе. Гем С находится в расщелине, окруженный гидрофобными аминокислотами, и только одно его кольцо А с пропионатом вдавливается в гидрофобный слой, а также примыкающая к нему Cys17-тиоэфирная связь. Кольцо А образует водородные связи с Arg 38, Tyr 48 (с пропионатом кольца), Asn52, и Trp59. Второе кольцо D с пропионатом образует водородные связи с Thr49 и Thr78 (Jordan *et al.*, 1995; Berezina *et al.*, 2003).

Близкое расположение гема Цит С относительно белковой поверхности и многочисленные водородные связи, связывающие его с аминокислотами, считаются основной причиной того, что конформация гема Цит С отличается от плоской. Двумя аминокислотными мотивами, в наибольшей степени влияющими на искажение плоскости гема, являются: 1) мотив между двумя цистеинами Cys14XXCys17H, ковалентно связанный с гемом и находящийся на N-конце белка (XX – аминокислоты Ala15 и Glu16 для человеческого Цит С) (Liptak *et al.*, 2010;

Sun *et al.*, 2014). Его разворачивание ведет к изменению конформации порфиринового цикла. Авторы предполагают, что таким образом конформация гема может регулироваться, в свою очередь влияя на физико-химические свойства белка (Sun *et al.*, 2013). 2) фрагмент Ω3 петли (76-83 по счету аминокислоты), включающий остаток Met80, который координирует атом железа гема. Внесение аминокислотных замен, приводящее к изменению упорядоченности и уменьшению лабильности этой петли, как было показано, влияет на снижение скорости переноса электрона с III комплекса ЭТЦ на гем С (Semenova *et al.*, 2023; Naiyer *et al.*, 2022). Эксперименты с последовательной денатурацией Цит С и модельных гемопротейнов показали, что спектральные признаки внеплоскостных искажений гема снижаются, то есть гем становится более плоским при денатурации белка.

В митохондриальной дыхательной цепи Цит С восстанавливается в ходе Q-цикла на цитохроме С<sub>1</sub> (Цит С<sub>1</sub>) III комплекса ЭТЦ (Рисунок 2), окисляется на IV, отдавая электрон иону меди, который в дальнейшем переносится на Цит А. Перенос электрона с комплекса III на Цит С осуществляется по туннельному механизму.

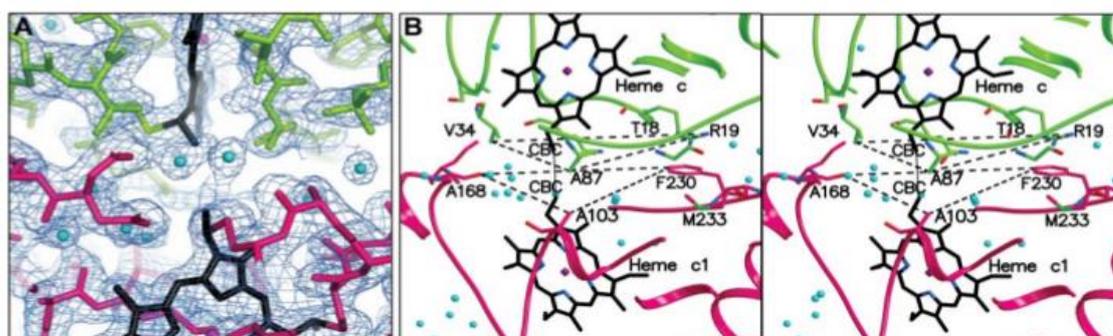


Рисунок 2. Интерфейс взаимодействия Цит С (зеленый цвет) и Цит С<sub>1</sub> (розовый цвет). Прерывистой линией показаны плоскости контакта (Solmaz and Hunte, 2008).

Цит С обладает универсальным сайтом связывания – контактной поверхностью вокруг гемового кармана, несущей положительно заряженные аминокислоты (в основном Lys). Примечательно, что один и тот же сайт участвует в реакциях

образования комплексов Цит С с разнообразными партнерами: с Цит С<sub>1</sub> комплекса III, с кардиолипином внутренней митохондриальной мембраны, с нейроглобином и фактором Araf-1 в цитоплазме (Naiyer *et al.*, 2022; Solmaz and Hunte, 2008; Tejero, 2020). Согласно современной концепции, универсальный сайт связывания состоит из центрального гидрофобного домена, стабилизирующего гем-гемовое взаимодействие, и окружающего электростатического домена, определяющего правильную пространственную ориентацию контактирующих белков – положительно заряженные остатки Lys и несколько остатков Gln. Аминокислоты сайта связывания The 28, Pe 81 участвуют в гидрофобных и ван-дер-вальсовых взаимодействиях (Chertkova *et al.*, 2017).

Образование комплекса между Цит С и редокс-партнером ЦитС<sub>1</sub> комплекса III ЭТЦ сопровождается сближением их гемов до минимального расстояния 9.4 Å (Рисунок 3). Скорость электронного транспорта составляет  $1,2 \times 10^9 \text{ c}^{-1}$ , энергию реорганизации комплекса оценивают в 0,7-1 эВ (Lange and Hunte, 2002).

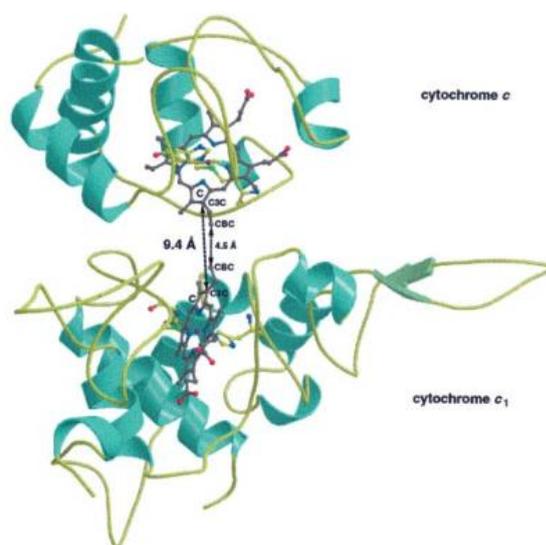


Рисунок 3. Схема интерфейса взаимодействия Цит С и Цит С<sub>1</sub>. Пунктирной линией обозначены расстояния между атомами пиррольных С колец, обращенных к растворителю (Lange and Hunte, 2002).

Цит С содержится на внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны (ВММ) в межмембранном пространстве (ММП). Даже его мембрано-

связанная фракция в отличие от других комплексов ЭТЦ может быть удалена из мембраны относительно мягкими методами, такими как изменения рН или ионной силы (Berezhna *et al.*, 2003). Он также участвует во взаимодействиях с белками внешней мембраны, например, Цитохромом *b5*. Связывание Цит С с мембраной приводит к изменению его четвертичной структуры и потере Met80, как лиганда, который заменяется His33 (или His26) или молекулой воды. Авторы Sun *et al.*, 2013 предполагают, что в ходе связывания нарушаются водородные связи пентапептида Cys14-Ala15-Glu16-Cys17-Hys18, и гем релаксирует в плоскую конформацию.

При этом взаимодействие Цит С с фосфолипидами внутренней митохондриальной мембраны дает по меньшей мере две разные конформации белковой части Цит С. Первая реализуется за счет электростатических взаимодействий положительно заряженных аминокислот сайта связывания Цит С с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов. Эта фракция чувствительна к ионной силе, поверхностному заряду и рН. Вторая конформация реализуется, когда Цит С частично внедряется в бислой мембраны посредством гидрофобных взаимодействий. Гидрофобно-связанные фракции реагируют на нарушение структуры мембраны или модификацию митохондриальных липидов, в частности кардиолипина.

В работе (Berezhna *et al.*, 2003) резонансные спектры комбинационного рассеяния были также зарегистрированы для двух фракций митохондрий (супернатанта и гранул), полученных из набухших митохондрий после дифференциального центрифугирования. Спектр КР Цит С отличается для интактных и набухших митохондрий. Большая часть молекул Цит С в митохондриях являются мембрано-связанными, и конформация гема Цит С изменялась при связывании. Авторы предположили, что мембранное связывание приводит к частичному раскрытию гемового кармана и изменению гем-тиоэфирных связей.

Связывание с кардиолипином может нести еще одно важное следствие. По данным ЯМР-спектроскопии было высказано предположение, что связывание кардиолипина и Цит С увеличивает расстояние между Met80 и гемом, тем самым

облегчая доступ  $H_2O_2$  или  $NO$  к гемовому железу (Osipov *et al.*, 2007). В случае с  $H_2O_2$  эти перестройки приводят к резкому повышению пероксидазной активности Цит С, что может инициировать перекисное окисление липидов и разрушить митохондриальную мембрану. Тем самым вызывается высвобождение Цит С, которое наблюдается на ранних стадиях апоптоза, и, как следствие, происходит образование апоптосомы и инициируется каскада каспаз. При этом было высказано предположение, что сам связанный с мембраной Цит С может быть важным фактором активации каспазы при апоптозе. Однако участие непосредственно мембраносвязанной фракции в апоптозе представляется противоречивым, учитывая, что Цит С должен взаимодействовать с Araf-1, dATP и прокаспазой-9 в цитозоле для образования апоптосомы (Ow *et al.*, 2008).

Многочисленными исследованиями *in vitro* и *in vivo* предоставлено достаточно информации о структуре и функции Цит С, тем не менее, регуляция активности этого белка в физиологических условиях живых и патологических клеток остается слабо изученной.

### 1.1.2 Структура гема В нейроглобина и его функциональная активность

Нейроглобин (Нгб) – обнаруженный в 2000-х годах гемопротейн, который в наибольшей степени содержится в нервной, эндокринной системах и сетчатке глаза позвоночных животных (от 1 до 100 мкМ в клетке) (Bentmann *et al.*, 2005). В качестве его кофактора выступает гем В, не связанный ковалентно с белковым каркасом. Исследования указывают на высокую гибкость белковых петель в области гемового кармана нейроглобина (Kriegl *et al.*, 2002; De Simone *et al.*, 2021). Нейроглобин находится в клетке преимущественно вблизи митохондрий, но также известно о его фракции внутри митохондрий в условиях клеточного стресса (Yu *et al.*, 2012; Fiocchetti *et al.*, 2021).

Нейроглобин – это мономерный белок массой 17 кДа, состоящий из восьми  $\alpha$ -спиралей (А-Н) и считающийся ближайшим структурным аналогом миоглобина (Vallone *et al.*, 2004). Однако, в отличие от пятикоординированных миоглобина и гемоглобина, его гем шестикоординированный, и в отсутствие экзогенных лиган-

дов аксиальные положения занимают His96 и His64. Эта структура, однако, находится в равновесии с небольшим количеством пятикоординированной формы, которая образуется при появлении внешнего O<sub>2</sub> или NO лиганда. Диссоциация His64 от гемового железа является необходимым этапом для связывания экзогенного лиганда (Pesce *et al.*, 2003; Guimarães *et al.*, 2014).

Нейроглобин способен обратимо связывать газообразные лиганды, и его сродство к кислороду такое же, как у миоглобина (Dewilde *et al.*, 2001), поэтому было высказано предположение, что он выполняет функцию депо кислорода, подобно миоглобину, и высвобождает его при гипоксии. Однако этой гипотезе противоречит относительно низкое содержание нейроглобина в клетках и высокие константы автоокисления ( $0,23 \pm 0,03 \text{ мин}^{-1}$ ) (Tejero *et al.*, 2015; Fago *et al.*, 2004). Кроме того, он может действовать как дезоксигеназа, катализирующая дезоксигенирование NO до NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Tiso *et al.*, 2011).

Человеческий нейроглобин содержит внутримолекулярный дисульфидный мостик Cys46–Cys55, который играет существенную роль в связывании лигандов и окислительно-восстановительных свойствах: восстановление (разрушение) дисульфидного мостика снижает сродство к кислороду в 10 раз (Guimarães *et al.*, 2014; Bellei *et al.*, 2018). Предполагается, что низкое содержание кислорода в митохондриях приводит к накоплению восстановительных эквивалентов НАДФН, которые восстанавливают цистеины нейроглобина, разрушая дисульфидный мостик, тем самым высвобождая O<sub>2</sub>. Однако эти наблюдения обнаружены *in vitro*, и нет никаких данных о физиологической функции этого дисульфидного мостика в клетке.

Сейчас основная роль нейроглобина в нервной системе определяется, как нейропротекторная. Многочисленные работы *in vitro* и *in vivo* демонстрируют, что нейроглобин способствует выживанию нейронов при таких патологиях, как ишемия, гипоксия, болезни Альцгеймера и Хантингтона, окислительный стресс, инсульт, повреждение спинного мозга, дегенерация сетчатки, отравление мышьяком (Fiocchetti *et al.*, 2021; Ascenzi *et al.*, 2016; Ciccone *et al.*, 2021). Нейропротектор-

ная функция нейроглобина тесно связана с его участием в различных биохимических каскадах клетки. Так, нейроглобин может разрушать активные формы кислорода и азота. Кроме того, белок–белковые взаимодействия между нейроглобином и  $\alpha$ -субъединицами гетеротримерного G-белка и Цит С также могут способствовать нейропротекции (Watanabe *et al.*, 2012).

Наибольший интерес для нас представляет ОВ реакция между восстановленным нейроглобином и окисленным Цит С, выходящим из митохондрий на начальных стадиях апоптоза. Известно, что нейроглобин способен восстанавливать Цит С, предотвращая образование апоптосомы с фактором Araf-1 (Fago *et al.*, 2006). Восстановление Цит С фиксировали на иммобилизованном нейроглобине с помощью нанопористого золотого электрода (Mie *et al.*, 2020), а также с помощью stop flow спектроскопии (Tejero, 2020). Были сформированы две гипотезы взаимодействия между восстановленным Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) и окисленным Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) *in vivo* (Mie *et al.*, 2020; Fago *et al.*, 2008; Brittain *et al.*, 2010).

Согласно одной из них, Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) в дезокси форме предотвращает сборку апоптосом и запуск апоптоза, восстанавливая молекулы Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ), выходящие из митохондрий в цитоплазму. Следует отметить, что такой механизм в нормальных условиях ингибирует последствия «случайного» высвобождения Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) из митохондрий (Fago *et al.*, 2008). Необходимость «тормоза» апоптоза не стоит недооценивать, так как покидающий митохондрии Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) связывается с инозитол-1,4,5-трифосфатными рецепторами в эндоплазматическом ретикулуме, вызывая высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму (Voehning *et al.*, 2003). А повышение уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , в свою очередь, дополнительно стимулирует высвобождение Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) из митохондрий. Таким образом, запускается самоусиливающийся процесс выхода Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) в цитоплазму. Механизм «сброса» порогового уровня Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) посредством редокс-реакции с Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) может предотвратить апоптоз. Эта гипотеза также объясняет, почему наибольшие концентрации Нгб наблюдаются в нейронах и клетках сетчатки (Schmidt *et al.*, 2003) — потоки клеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в этих высокоспециализированных и метаболически актив-

ных клетках в норме высокие, в результате, эти типы клеток могут с большей вероятностью входить в апоптоз в результате «случайного» высвобождения Цит С ( $\text{Fe}^{3+}$ ) в цитоплазму. Следовательно, для защиты этих клеток от апоптоза требуются более высокие клеточные концентрации Нгб. Важно отметить, что эта модель предполагает возможность успешной инициации апоптоза при соответствующих обстоятельствах (Fago *et al.*, 2008).

Согласно другой модели, восстановление Цит С нейроглобином происходит только при окислительном стрессе, когда окисленные цистеины нейроглобина образуют дисульфидный мостик Cys46-Cys55, и в результате изменяющейся конформации белка становится возможным донирование электрона на Цит С (Mie *et al.*, 2020). Действительно, известно, что экспрессия гена NGB увеличивается в ответ на различные стрессовые сигналы (например, окислительный стресс, повышение концентрации NO, гипоксия и т.д.) (Solar Fernandez *et al.*, 2021). Учитывая, что содержание Нгб в большинстве типов клеток низкое в норме (1 мкМ), повышение его концентрации при окислительном стрессе может служить механизмом защиты от апоптоза до определенного уровня. Роль дисульфидного мостика Нгб в редокс-реакциях, тем не менее, точно не определена. Обе гипотезы не противоречат друг другу и, возможно, реализуются в разных типах клеток за счет ключевой роли дисульфидного мостика, модулирующего работу Нгб в зависимости от редокс-условий.

Тем не менее, существуют сложности с детальным изучением Нгб/Цит С комплекса. Из-за его высокой константы диссоциации ( $k = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  близка к известным физиологически значимым константам скорости редокс-реакций Цит С) (Schmidt *et al.*, 2003) комплекс короткоживущий, что не позволяет выделить его для проведения рентген-структурного анализа (Bønding *et al.*, 2008). С этой же проблемой связаны сложности оценки критических для образования комплекса белковых сайтов редокс-партнеров. До сих пор использование рекомбинантных Нгб человека и крысы не обнаружило разницы в константах диссоциации комплекса с Цит С (Tiwari *et al.*, 2015).

В итоге, основные методы, описывающие взаимодействие Цит С и нейроглобина – компьютерные, такие как молекулярный докинг (Tejero, 2020; Solar Fernandez *et al.*, 2021; Bønding *et al.*, 2008; Guidolin *et al.*, 2014), молекулярная динамика (Feng *et al.*, 2022) и предсказание Alphafold2 (Tiwari *et al.*, 2018). Согласно их результатам, контакты редокс-партнеров обусловлены электростатическими и водородными связями. Разные исследования выделяют пять положительно-заряженных остатков сайта связывания Цит С (наиболее вероятные Lys25, Lys27 критически важные для формирования комплекса Цит С с Араф-1 (Alvarez-Paggi *et al.*, 2017; Josephs *et al.*, 2015), которые связываются электростатически с отрицательно заряженными Glu60, Asp63, Asp73, Glu 87 и Glu151 нейроглобина. При этом считается, что Asp73 имеет решающее значение для формирования комплекса, а Glu60, Asp63 и Glu87 также вносят значительный вклад. Так, аминокислотные остатки нейроглобина Glu60 и Glu87 предположительно взаимодействуют с остатками Цит С Lys72 и Lys 25 соответственно (Tejero, 2020; Solar Fernandez *et al.*, 2021; Tiwari *et al.*, 2015). Важно отметить, что, несмотря на бесспорную роль электростатических взаимодействий комплекса Нгб/Цит С, гидрофобные взаимодействия с участием Ile81 из Цит С (Solar Fernandez *et al.*, 2021) и водородные связи, между Thr77(Нгб)-Lys7(Цит С) (Tiwari *et al.*, 2018) а также Val99(Нгб)-Gln16(Цит С) (Zanetti *et al.*, 2017) могут играть значительную роль в стабилизации комплекса, как это было показано в случае других редокс-комплексов с участием Цит С (Sun *et al.*, 2013; Maneg *et al.*, 2004; Millett and Durham, 2004; Bertini *et al.*, 2005; Shimada *et al.*, 2017).

Однако эмпирических данных, полученных *in vitro*, подтверждающих эти модели, недостаточно. В связи с этим актуально изучение вклада отдельных аминокислотных остатков в образование комплекса Нгб/Цит С с использованием мутантных вариантов белка с заменами на предполагаемых контактных поверхностях.

## 1.2 Конформации порфиринового цикла и их функциональная значимость

Многообразие реакций, участниками которых являются гемопротейны, требуют от них разных физических и химических свойств, и для регулирования таких свойств, как константы связывания лигандов, редокс-потенциалы, максимумы поглощения, время жизни в возбужденном состоянии должны существовать механизмы на субмолекулярном уровне (Senge *et al.*, 2015). В течение долгого времени, с тех пор появились подходящие методы (ЭПР, ЯМР, рентген-структурный анализ) внимание исследователей было сосредоточено на конформационных изменениях белковой части гемопротейнов и их связи с функциональностью (Bertini *et al.*, 2006). Порфириновый цикл, при его бесспорной функциональной значимости, считался менее вариативной и, следовательно, менее способной к регуляции процессов структурой. Знаменательная структура фталоцианина, полученная Робертсоном (J. M. Robertson) и Вудвордом (I. Woodward) в середине 1930-х годов, представляющая планарный макроцикл, давала повод считать, что родственные порфирины также должны быть «плоскими от природы» (Senge *et al.*, 2015). Несмотря на асимметричное расположение боковых радикалов, множество гем-белковых контактов и реально наблюдаемые отклонения мезоуглеродов от плоскости (0,19 Å), макроцикл обычно описывали плоским с D<sub>4h</sub> симметрией (Spiro, 1985; Hu *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1996). Это объяснялось ароматическим характером сопряжения  $\pi$ -орбиталей и предполагаемым отсутствием электронного взаимодействия боковых радикалов и макроцикла. Предполагалось, что единственное отклонение – смещение пятикоординированного восстановленного атома металла относительно плоскости кольца (Perutz *et al.*, 1974).

То, что такая модель излишне упрощена, показали результаты рентгено-структурного анализа митохондриального Цит С в обеих степенях окисления (Berghuis and Brayer, 1992) и двух субъединиц насыщенного кислородом гемоглобина (Shaanan, 1983). У последнего гемы сохраняли некоторую степень куполообразной конформации, которая более выражена в дезоксо-восстановленном состоянии. Рентген-структурный анализ показал, что все выделенные Цит С в обоих

редокс-состояниях обладают гемом, который в разной степени искажен относительно плоскости, образованной атомом Fe и пиррольных азотов. Причем пирролы гема Цит С, которые ковалентно связаны с белком, более искажены. Еще одним свидетельством отклонения от идеальной симметрии  $D_{4h}$  являются ЭПР (Salmeen and Palmer, 1968) и ЯМР (Zoppellaro *et al.*, 2008) данные, которые для Цит С свидетельствуют о сильно асимметричном распределении спина. Спектроскопии резонансного комбинационного рассеяния (РКР) света и кругового дихроизма (КД) показали наличие электронных и вибронных возмущений, индуцирующих деформацию (Dragomir *et al.*, 2007, Alessi *et al.*, 2011). Применяются два основных метода изучения конформации гема в кристаллических белках: рентгеновская кристаллография и вибронная спектроскопия. Для изучения конформации в растворе – спектроскопические методы и ЯМР.

Возникает вопрос, являются ли эти гемовые деформации, снижающие симметрию, функционально значимыми. С помощью компьютерного анализа рентгеновских структур гемовых белков было обнаружено, что белки, принадлежащие к одному и тому же функциональному классу, имеют одинаковые типы неплоских искажений гема (Senge *et al.*, 2015; Liptak *et al.*, 2010; Schweitzer-Stenner, 2022). При том, что внеплоскостные искажения энергетически невыгодны для гема, так как происходит перекрытие  $\pi$ -орбиталей порфиринового цикла с  $d$ -орбиталями атома железа, их эволюционное сохранение подразумевает, что они имеют биологическое значение. Есть несколько свидетельств этому для модельных порфиринов в растворе (Sun *et al.*, 2014; Jentzen *et al.*, 1995). Функциональное значение, в частности, внеплоскостных деформаций, было выявлено только недавно.

Рассмотрим более подробно возможные внеплоскостные конформации и их значимость для белка. Шейдт (W. R. Scheidt) и Лии (Y. J. Lee) в 1987 году получили современную стереохимическую классификацию внеплоскостных отклонений (Senge *et al.*, 2015; Scheidt and Lee, 1987). Классифицируют внеплоскостные деформации порфиринов в соответствии с отклонениями атомов вдоль шести нормальных координат, которым соответствуют низкочастотных нормальные мо-

ды симметрии: куполообразная  $A_{2u}$  (dom), искаженная  $B_{1u}$  (rufl), седловидная  $B_{2u}$  (sad), пропеллерная ( $A_{1u}$ ) и вырожденная волнистая мода [ $E_g(x)$  и  $E_g(y)$ ] (wav) (Senge *et al.*, 2015; Jentzen *et al.*, 1998; Jentzen *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1993; Schweitzer-Stenner, 2022; Scheidt and Lee, 1987). Это значит, что у макроцикла с, например, искаженной симметрией  $B_{1u}$  есть мода с наиболее низкой частотой нормальных колебаний, которая отражает определенные внеплоскостные колебательные деформации. Для симметрии  $B_{2u}$  седловидной конформации нормальная низкочастотная мода  $\gamma_{18}$  дает пик  $30 \text{ см}^{-1}$ , для куполообразной конформации симметрии  $A_{2u}$  наиболее низкочастотная нормальная мода  $\gamma_9$  дает пик  $32 \text{ см}^{-1}$  (Jentzen *et al.*, 1995).

Эти низкочастотные моды гема ( $<200 \text{ см}^{-1}$ ) требуют наименьшей энергии, поэтому, скорее всего, являются функционально значимыми из-за их термической доступности (Kubo *et al.*, 2008). Укладка белковых спиралей и слоев может оказывать достаточно влияния для изменения структуры гема, по крайней мере, в этих низкочастотных модах. Поскольку эти низкочастотные режимы потенциально участвуют в активации переходных или туннельных состояний, это позволяет предположить, как повсеместно распространенный макроцикл может “настраивать” свою активность в различных белковых структурах для выполнения такого широкого спектра функций (Kubo *et al.*, 2008; Barkigia *et al.*, 1988; Shelnut *et al.*, 1998). Напротив, высокочастотные моды имеют “жесткие” силовые константы и значительно менее вероятно, что они отреагируют на незначительные возмущения окружающей среды (Kubo *et al.*, 2008).

Стоит отметить, что плоскостные деформации гема классифицируют аналогично по наиболее низкочастотным модам типов симметрии: ( $B_{2g}$ ) мезорастяжение, может быть представлено как растяжение вдоль оси, содержащей углероды  $C_5$  и  $C_{15}$ , ( $B_{1g}$ ) плоскостное перемещение двух пиррольных колец друг от друга, а оставшихся двух – навстречу друг другу, изменение угла  $C_a-N-C_a$ , [ $E_u(x)$  и  $E_u(y)$ ] сдвиг пирролов, ( $A_{1g}$ ) «дыхательная мода» задействует все связи, не нарушает симметрию и служит компенсирующим внеплоскостное искажение ме-

ханизмом и ( $A_{2u}$ ) вращение на месте (Senge *et al.*, 2015; Schweitzer-Stenner, 2022; Levantino *et al.*, 2005).

Тип конформации сохраняется в пределах функционального класса. Конформация «скручивание» (ruffling, дальше в тексте зовется «искаженной») характерна для гемов белков, выполняющих электрон-транспортную функцию, для комплексов фермент-субстрат с гемовыми оксигеназами, переносчиков NO (нитрофорины) и связывающих кислород белков. Седловидная конформация характерна для пероксидаз, а куполообразная для белков, связывающих и переносящих кислород, таких как миоглобин или гемоглобин (Senge *et al.*, 2015; Liptak *et al.*, 2010; Schweitzer-Stenner, 2022).

Для гема С-типа наиболее характерна искаженная конформация. Это самая низкочастотная нормальная мода симметрии  $B_{1u}$ . При этом углероды пирролов, лежащие по разные стороны от «разрезающей» пиррольное кольцо Fe–N связи отклоняются от гемовой плоскости в противоположных направлениях. А вместе с ними попеременно выше и ниже отклоняются  $C_m$  – мезоуглероды (Senge *et al.*, 2015; Liptak *et al.*, 2010; Jentzen *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1993; Jentzen *et al.*, 1995). Искажение приводит к отклонению  $p_z$  орбиталей атомов азота от нормали гема и вызывает перекрытие порфириновой  $\pi$  орбитали, имеющей симметрию  $a_{2u}$  в точечной группе  $D_{4h}$ , с орбиталью  $d_{xy}$  железа, в то время как  $3d_{xz}$ - и  $3d_{yz}$ -орбитали железа смешиваются с набором порфириновых  $\pi^*$ -орбиталей с симметрией  $e_g$ . Таким образом, искажение увеличивает электронную плотность в железном центре, что делает перенос электронов из мезоуглерода гема на орбиталь железа  $3d_{xy}$  менее энергетически выгодным (Liptak *et al.*, 2010). Искажение дестабилизирует все три  $d$  молекулярные орбитали атома Fe, она также уменьшает положительную и отрицательную спиновую плотность  $\beta$ -пиррола и мезоуглерода соответственно. Следовательно, ожидается, что скорость переноса электронов к гему трехвалентного железа уменьшится при искаженной конформации (Liptak *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014). При этом так как  $d$ -орбитали заняты шестью электронами в гемах  $Fe^{2+}$  и только пятью в  $Fe^{3+}$  гемах, увеличение общей электронной энергии при увеличе-

нии степени искажения гема, является более резким для состояния  $\text{Fe}^{2+}$  по сравнению с состоянием  $\text{Fe}^{3+}$ , что приводит к падению редокс-потенциала  $\text{Fe}^{3+}$  (Такаута *et al.*, 2009).

Неплоскостное искажение гема Цит С, вероятно, является результатом сил, оказываемых (1) ковалентными связями между гемом и белковой частью, (2) водородными связями между пропионовыми группами гема и аминокислотами белка, (3) взаимодействиями с аксиальными лигандами и (4) стерическими взаимодействиями с боковыми цепями белка, контактирующими с гемом. Степень возможного искажения зависит от пространственного отталкивания между периферийными радикалами и  $\beta$ -углеродами, а также водородами пиррольных колец (Jentzen *et al.*, 1998; Jentzen *et al.*, 1995).

Седловидная конформация похожа на искаженную, но принадлежит группе симметрии  $B_{2u}$  (пиррольные кольца отклоняются целиком, а мезоуглероды остаются в гемовой плоскости). Ее можно получить вращением конформера в искаженной конформации (ruf1) вокруг основной  $C_2$ -оси на  $45^\circ$  градус, она описывает аналогичное попеременное смещение пиррольных колец относительно плоскости (Senge *et al.*, 2015; Jentzen *et al.*, 1998; Jentzen *et al.*, 1995).

Куполообразная конформация гема обладает  $A_{2u}$  симметрией. Представляет собой согласованное смещение всех четырех пиррольных колец из плоскости в одном направлении. Эта деформация часто наблюдается в 5-координированных гемах, когда связывание шестого лиганда приводит к выходу атома металла из плоскости гема, что наблюдается для гемоглобина или миоглобина при связывании  $O_2$ , CO или NO. Также бывает в 6-координированных с различными аксиальными лигандами. (Senge *et al.*, 2015; Jentzen *et al.*, 1998; Jentzen *et al.*, 1995).

Наиболее легко реализуются деформации sad и ruf1 (9,1 и 6,5 кДж/моль для модели деформации в  $1\text{\AA}$ ), менее легко - деформациям dom (41,3 кДж/моль) и wav (67,3 кДж/моль) и почти никогда - деформации rpo (238,4 кДж/моль) (Jentzen *et al.*, 1998). Однако фактические наблюдаемые деформации зависят не только от энергии, но и от того, насколько эффективно конкретная нормальная деформация

ослабляет возмущающее воздействие. Общая амплитуда деформаций для разных гемов колеблется в пределах от 0,6 до 1,1 Å (Senge *et al.*, 2015; Jentzen *et al.*, 1995).

### 1.2.1 Регуляция редокс-потенциала гемопротейна посредством конформационных деформаций

Были установлены корреляции между физико-химическими свойствами гемов: редокс-потенциалом, эффективностью акцептирования-дониорования электрона, аффинностью к лигандам и степенью внеплоскостных деформаций. Укладка аминокислотных цепей вокруг гема вызывает внеплоскостные искажения его конформации, которые в свою очередь изменяют способность атома железа принимать/отдавать электрон и связывать лиганды (Senge *et al.*, 2015; Liptak *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014).

Увеличение степени искажения конформации гема Цит С коррелирует с экспоненциальным снижением редокс-потенциала белка (Imada *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2014). Кроме теоретических предсказаний (Barkigia *et al.*, 1988) этого эффекта и результатов молекулярного моделирования гемов с разной степенью внеплоскостных деформаций (Takano *et al.*, 2020), рядом авторов были проведены измерения редокс-потенциала *in vitro* (Ravikanth and Chandrashekar, 1995). Так, группа Sun Y. с коллегами сравнили Цит С, выделенный из сердца лошади – hhЦит С, другой тип Цит С<sub>551</sub> и его мутант Цит С<sub>551</sub>F7A (Sun *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014). Среди этих трех белков hhЦит С обладал наиболее искаженной конформацией, а Цит С<sub>551</sub> наиболее плоской. Точечная мутация в остатке 7 Цит С<sub>551</sub>, который образует водородную связь с Cys12 (первым остатком в мотиве CXXCH), вызывает искажение гема, и редокс-потенциал этого мутанта Цит С<sub>551</sub>F7A снижается на 100 мВ (Liptak *et al.*, 2010). Кинетика фоторедукции всех трех белков выявила экспоненциальную корреляцию между степенью искажения гема и поперечным сечением фоторедукции, которое является отражением скорости переноса электронов от данного донора к гему. Таким образом, было определено непосредственное влияние белкового окружения на конформацию гема и его физико-химические свойства.

Изменение укладки мотива CysXXCysH вызывает изменение конформации гема и предлагается в качестве одного из механизма регуляции редокс-потенциала белка (Bowman and Bren, 2008; Ma *et al.*, 1998). Так, группа Michel синтезировали цитохромы с мутациями по этому мотиву в белковом кармане и разной степенью искажения гема (Michel *et al.*, 2007). Физически увеличение искажения гема в мутантах по пентапептиду CysXXCysH объясняется тем, что более гидрофобное окружение этого мотива усиливает его сцепление с гемом за счет большего количества водородных связей внутри пентапептида по сравнению с диким типом Цит С. Авторами было установлено, что снижение мобильности этого пентапептида в окисленном геме влияет на сдвиг координирующего атом железа остатка His и коррелирует с падением редокс-потенциала гема.

В другой работе (Simeonov *et al.*, 2005), где сравнивали окисленные митохондриальный и микросомальный ЦитВ<sub>5</sub>, обнаружили, что у митохондриального Цит В<sub>5</sub> меньшая мобильность участка белкового кармана, окружающего проксимальный His гема. В результате более плотная гидрофобная упаковка вокруг активного центра гема усиливала His–Fe<sup>3+</sup> координационную связь, и коррелировала с меньшим редокс-потенциалом. Схожий эффект был получен в еще одной работе с моделированием гем-белковых структур: более высокая мобильность белковой части коррелировала с более высоким редокс-потенциалом. Причем авторы установили, что корреляция более выражена для координационной связи His–Fe<sup>3+</sup>, чем для His–Fe<sup>2+</sup>. На степень искажения конформации гема Цит С влияет не только белковая упаковка вблизи His-лиганда, но и вблизи второго аксиального лиганда – Met80. Так, замена нативного лиганда Met80 экзогенными N-донорными лигандами в Цит С приводит к снижению редокс-потенциала за счет стабилизации окисленного состояния.

Из-за влияния искажения гема на координирующую железо связь внеплоскостную деформацию гема можно рассматривать, как регулировку расстояния между гемами донора и акцептора в реакции переноса электронов (Sun *et al.*, 2014; Skourtis *et al.*, 2010). Среди других изменений физических свойств, вызыва-

емых искажением порфиринового макроцикла, наблюдают: абсорбционный сдвиг Q-полос и сокращение времени жизни флуоресценции возбужденных состояний молекулы (Schweitzer-Stenner, 2022).

Интересно, что для седловидной конформации гема была рассчитана противоположная зависимость (Imada *et al.*, 2018; Takano *et al.*, 2020) – в молекулярных моделях увеличение степени этой деформации коррелировало с экспоненциальным ростом редокс-потенциала, то есть более деформированный гем становился лучшим окислителем и худшим восстановителем.

Для гемоглобина и миоглобина хорошо изучена куполообразная конформация и её связь с аффинностью к кислороду. Пятикоординированный гем в куполообразной конформации обладает атомом Fe, находящимся на вершине основания из 4-х пирролов. Связывание одного из 4-х гемов молекулы гемоглобина с 6-м лигандом (молекулой O<sub>2</sub>) приводит к переходу гема в более плоскую конформацию (Shelnutt *et al.*, 1979). Исследование корреляции степени куполообразной конформации гема и аффинности к кислороду выявило повышенную способность связываться с лигандами для гема в плоской конформации и сниженную – в куполообразной (Bikiel *et al.*, 2010; Kondo and Takano, 2022).

### **1.3 Спектроскопия комбинационного рассеяния, как метод регистрации конформационных состояний гема в составе белков, изолированных органелл и клеток**

#### **1.3.1 Принцип спектроскопии комбинационного (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР)**

Эффект комбинационного рассеяния (КР) — это рассеяние света веществом, сопровождающееся изменением частоты рассеянного света, что вызывается неупругим столкновением фотонов с молекулами. Представляется, что при неупругом рассеянии происходит переход молекулы на виртуальный возбужденный электронный уровень и последующее излучение на колебательный подуровень основного электронного состояния. В зависимости от того, взаимодействуют ли

падающие фотоны света с молекулой в ее основном или возбужденном колебательном состоянии основного электронного уровня, энергия рассеянного фотона будет либо ниже (стоксовая область) либо выше (антистоксовая область) энергии падающих фотонов. Изменение энергии рассеянного света:  $\Delta E = h\nu^M = h(\nu^L - \nu^S)$ , где энергия рассеянных фотонов  $h\nu^S$  изменяется относительно энергии излучаемых фотонов  $h\nu^L$  на энергию характерных молекулярных колебаний  $h\nu^M$ , где  $\nu^M$  – частота этих характерных колебаний и носит название частотного сдвига. Для сложных молекул со взаимосвязанными колебаниями группы атомов, одновременно проходящих положение равновесия, говорят о частоте нормальных групповых колебаний.

Следовательно, пики на спектре комбинационного рассеяния представляют собой распределение интенсивности сигнала по колебательным частотам конкретных групп атомов в анализируемом веществе (или зависимость интенсивности от частотного сдвига) (Ковба и Пупышев). В связи с этим спектр КР нередко называют «отпечатком» молекулы. Конформационные модификации молекулы, в том числе вызванные изменением её редокс-состояния, также отражаются на КР-спектре, что позволяет получить информацию о состоянии молекулы при данных условиях. Мощность комбинационного рассеяния зависит от интенсивности возбуждающего света  $I_L$  и поперечного сечения комбинационного рассеяния  $\sigma^R$  (1). Сигнал КР, как правило, слабый. Типичные поперечные сечения КР составляют от  $10^{-31}$  до  $10^{-29}$  см<sup>2</sup> на молекулу.

$$(1)P_{RS} \propto \sigma^R \cdot I_L$$

Одним из вариантов усиления сигнала КР является метод резонансного комбинационного рассеяния (РКР). Усиление возникает только при условии, что энергия возбуждающего света соответствует энергии электронного перехода на возбужденные энергетические уровни в анализируемой молекуле, то есть, резонансный эффект комбинационного рассеяния избирательно усиливает интенсивность сигнала от тех молекул, которые поглощают длину волны возбуждения. РКР обладает большими значениями поперечного сечения (от  $10^{-27}$  до  $10^{-25}$  см<sup>2</sup>) по

сравнению с КР, тем не менее, сигнал остаётся относительно слабым: для сравнения, эффективные поперечные сечения флуоресцентной спектроскопии лежат между  $10^{-17}$  и  $10^{-16}$  см<sup>2</sup>. РКР (или Рамановская) спектроскопия кроме очевидных преимуществ – возможности зарегистрировать сигнал от низких концентраций молекул в жидкой среде (до  $10^{-6}$  М) и определить конформационные отличия, сопровождается рядом сложностей. Наибольшая из них – пренебрежительно малая интенсивность КР сигнала по сравнению с флуоресценцией. Кроме того, чтобы избежать фотоповреждения живых объектов, максимальная мощность лазера должна быть ограничена, что вызывает сложности с регистрацией низкоинтенсивных сигналов от, например, окисленных гемопroteинов (Kneipp *et al.*, 2010).

Задача усиления сигнала КР и нивелирования вклада флуоресценции в спектр стала приоритетной, за последние годы были разработаны модификации спектроскопии КР. Например, существует также метод двухфотонного КР (hyperRaman spectroscopy, HRS). Поперечные сечения HRS –  $10^{-65}$  см<sup>2</sup>, что на 35 порядков меньше поперечных сечений однофотонного КР и на 15 порядков ниже типичных сечений двухфотонной флуоресценции, что определило бесполезность использования HRS в качестве практического спектроскопического инструмента (Kneipp *et al.*, 2010).

Зарекомендовавшей себя модификацией метода КР стала спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР или SERS) с использованием наноструктур благородных металлов (Eremina *et al.*, 2018). По сравнению с обычным КР она обладает следующими преимуществами: усиление интенсивности КР, выравнивание базовой линии за счет «гашения» флуоресценции, высокая спектральная специфичность, возможностью работать на одной длине волны с разными КР-активными соединениями, так как не требуется условие резонанса. Следует отметить, что спектры ГКР и РКР Цит С не в точности воспроизводят друг друга, и на спектрах ГКР можно обнаружить дополнительные пики (Kneipp *et al.*, 2010; Brazhe *et al.*, 2015). Интенсивность сигнала ГКР превышает интенсивность КР для молекул, расположенных вблизи серебряных или золотых наноструктур, вплоть

до 10 порядков (Кнепп *et al.*, 2006). Наноструктуры могут быть в виде золей, либо представлять собой напыление металла на твёрдую подложку. Усиление сигнала ГКР объясняется двумя эффектами (Otto, 1984):

- 1) За счет локальных оптических полей металлических наноструктур, находящихся в резонансе с внешним полем излучателя (усиление электромагнитного поля)
- 2) молекула, контактирующая с металлом (наноструктурой), претерпевает рассеяние с большим поперечным сечением КР по сравнению с поперечным сечением свободной молекулы (химическое или электронное усиление).

Уравнение интенсивности сигнала ГКР аналогично уравнению КР (2). Полный стоксовый ГКР сигнал пропорционален поперечному сечению  $\sigma_{ads}^R$ , интенсивности возбуждения лазера  $I_L$  и числу молекул  $N$ , участвующих в процессе рассеяния.  $\sigma_{ads}^R$  описывает поперечное сечение КР молекулы в контакте с металлом. Этот параметр включает химическое или электронное усиление. Параметры  $A(\nu_L)$  и  $A(\nu_S)$  выражают локальные коэффициенты усиления для возбуждающего поля лазера и для рассеянного поля КР соответственно; то есть они учитывают электромагнитное усиление:

$$(2)P_{SERS} \propto N \cdot I_L \cdot |A(\nu_L)|^2 \cdot |A(\nu_S)|^2 \cdot \sigma_{ads}^R$$

- (а) Электромагнитное усиление.

На границе металла и диэлектрика возникают собственные коллективные электронные возбуждения, которые принято называть поверхностным плазмоном. Частота собственных коллективных колебаний свободных электронов в металле называется плазмонной частотой и определяется самим материалом и морфологией металлических наноструктур. В большинстве металлов ее величина порядка  $10^{15} \text{ с}^{-1}$ , то есть совпадает с частотами электромагнитных волн в ультрафиолетовой части спектра. Межзонные пе-

реходы сдвигают частоту, на которой вещественная часть диэлектрической проницаемости обращается в ноль, в видимую область спектра. В методе ГКР повышение интенсивности возбуждения КР происходит за счёт усиления электромагнитного поля вблизи наноструктур - в результате резонанса оптических полей (возбуждающих и рассеянных полей) с поверхностными плазмонами. В общем случае сдвиг частот между длиной волны возбуждения и рассеянным светом мал по сравнению с шириной плазмонного резонанса. Поэтому, коэффициенты усиления для поля возбуждения лазера и поля КР примерно одинаковы:  $A(\nu_L) \sim A(\nu_S) \sim A(\nu)$ . Таким образом, усиление электромагнитного поля выражается в виде четвертой степени коэффициента усиления поля –  $|A(\nu)|^4$ . Электромагнитное усиление сильно ограничено в пределах нескольких нанометров вблизи металлических наночастиц.

(b) Химическое усиление.

Химическое или электронное усиление включает эффекты, связанные с электронной связью между молекулой и металлом (Otto, 1984; Persson, 1981). Например, вклады металла могут изменять поперечное сечение КР системы молекула-металл. Тем не менее, многие экспериментальные наблюдения и теоретические результаты свидетельствуют о том, что электромагнитное усиление на основе плазмонных резонансов вносит наиболее важный вклад в усиление ГКР.

Существует также гигантское гипер-комбинационное рассеяние (SEHRS), которое возникает при усилении сигнала от двухфотонного (HRS) возбуждения (Yeo *et al.*, 2008). Механизмы аналогичны усилению однофотонно-возбужденных сигналов в ГКР. Интересно, что HRS даже в большей степени выигрывает от высоких локальных оптических полей, чем нормальное комбинационное рассеяние из-за нелинейной зависимости SEHRS от усиленного возбуждающего поля. Высокое усиление поля для двухфотонного процесса может компенсировать чрезвычайно малое поперечное сечение HRS, что позволяет измерять спектры SEHRS при неожиданно высоком уровне сигнала для двухфотонного процесса (Kneipp *et al.*, 2010; Kneipp *et al.*, 2006).

### 1.3.2 Основные характеристики спектров КР и ГКР гемов С и В в восстановленном и окисленном состояниях

Применять КР спектроскопию для изучения гем-содержащих белков начали еще в первой половине 20-ого века. Принцип, по которому определяли принадлежность конкретных полос спектра к колебательным частотам определенных групп атомов, в общем приближении строится на замене атомов исследуемой молекулы на их изотопы и сравнении спектров КР для нормальных структур и с атомными заменами. основополагающая работа 1993 года, позволившая расшифровать большинство полос на спектрах Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) и Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ) принадлежит Ну S. С соавторами (Ну *et al.*, 1993), в дальнейшем коротковолновые и длинноволновые области спектра подвергались детальному анализу (Jordan *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2013; Kubo *et al.*, 2008), также были получены и расшифрованы спектры цитохромов В-типа. Следует помнить, что ИК и РКР методы не могут распознать моды ниже  $150 \text{ см}^{-1}$  в водной фазе из-за сильного поглощения, рэлеевского рассеяния и квазиупругого рассеяния воды (Sun *et al.*, 2013).

Основные колебательные моды макроцикла, положения их максимумов и описание представлены в Таблице 1. Часть колебательных мод является общей для гемов С и В ввиду их общей структуры. Первыми наиболее изученными модами стали колебательные моды  $\nu_2$  (положение максимума пика КР  $1596 \text{ см}^{-1}$ ),  $\nu_3$  ( $1502 \text{ см}^{-1}$ ),  $\nu_{10}$  ( $1638 \text{ см}^{-1}$ ),  $\nu_{19}$  ( $1585 \text{ см}^{-1}$ ). Колебательная мода  $\nu_2$  ( $1596 \text{ см}^{-1}$ ) связана преимущественно с колебательной энергией растяжения  $\text{C}_\beta\text{C}_\beta$  связи, она чувствительна к размеру порфиринового кольца (увеличению двугранного угла  $\text{NC}_\alpha\text{--C}_\text{m}\text{C}_\alpha$ ). Восстановление гема от  $\text{Fe}^{3+}$  к  $\text{Fe}^{2+}$  согласуется с небольшим ( $0,01 \text{ \AA}$ ) расширением ядра (Ну *et al.*, 1993). Положение соответствующего пика КР  $\nu_2$  сдвигается по оси частотного сдвига влево при расширении макроцикла вследствие изменения обычного низкоспинового на высокоспиновое состояния. Мода  $\nu_3$  ( $1502 \text{ см}^{-1}$ ) также чувствительна к спиновому состоянию и размеру макроцикла и ведет себя аналогично, в эту колебательную частоту вносят равноценный вклад растяжения связей групп атомов  $\text{C}_\beta\text{C}_\beta$  и  $\text{C}_\alpha\text{C}_\text{m}$ .

Колебания третьей моды этой группы  $\nu_{10}$  ( $1638 \text{ см}^{-1}$ ) и  $\nu_{19}$  ( $1585 \text{ см}^{-1}$ ) преимущественно связаны с колебательной энергией растяжения связи  $C_{\alpha}C_m$  метиновых мостиков. Положение пиков также зависит от спинового состояния, но в отличие от мод  $\nu_2$  и  $\nu_3$  пик  $1638 \text{ см}^{-1}$  чувствителен к редокс-состоянию гема: для  $Fe^{3+}$  он наиболее интенсивен. По его положению можно понять, сколько координационных связей – 5 или 6 в восстановленном состоянии гема. Мода  $\nu_{10}$  демонстрирует наибольшие изменения в высокочастотной области спектров КР, он наиболее чувствителен к внеплоскостному искажению порфирина (Ma *et al.*, 1998). К этой группе причисляют еще моды  $\nu_{28}$  (или  $\nu_{11} - 1551 \text{ см}^{-1}$ ), тоже реагирующих на размер кольца (Jentzen *et al.*, 1995). Спиновое состояние гема меняется при замене или исчезновении аксиальных лигандов, при денатурации. В норме у Цит С два аксиальных лиганда с сильными полями, пик  $1551$  присутствует в случае 6-ти лигандов.

Мода  $\nu_4$  ( $1373 \text{ см}^{-1}$  для окисленного гема и  $1368 \text{ см}^{-1}$  для восстановленного) фигурирует в большинстве работ, посвященных КР порфиринов. В нее вкладываются симметричные колебания растяжения  $C_{\alpha}N$  и  $C_{\alpha}C_{\beta}$  пирролов, и положение ее пика зависит от степени окисления железа. Служит маркером редокс-состояния.

Для КР спектра Цит С характерна «насыщенная» пиками низкочастотная область по сравнению с КР спектром гема В. Она связана с особенностями структуры порфиринового кольца, ковалентно связанного с белковым окружением, является признаком закрытой гемовой щели и сильных пространственных ограничений для гема (Berezhna *et al.*, 2003). Две нормальные моды связаны с тиоэфирными связями:  $397 \text{ см}^{-1}$  соответствует колебаниям  $\delta(C_{\beta}C_{\alpha}S)$ , а  $693 \text{ см}^{-1}$  колебаниям растяжения связи  $\nu(C-S)$ . Последний пик в некоторых других работах относят к колебаниям связей пиррольных колец, по всей видимости, он смешанного происхождения, чувствителен к разворачиванию. Пик  $397 \text{ см}^{-1}$  рассматривать как характерный пик нативной третичной структуры гемового кармана (его интенсивность тоже падает при денатурации). Пик в

области  $640 \text{ см}^{-1}$  в некоторых работах также относят к колебанию связи C–S (Rygula *et al.*, 2013).

Следующий набор низкочастотных мод соответствует колебательным частотам групп атомов при внеплоскостных деформациях гема:  $\nu_{21}$  ( $553$  и  $566 \text{ см}^{-1}$ ),  $\nu_{22}$  ( $445 \text{ см}^{-1}$ ),  $\nu_{33}$  ( $480 \text{ см}^{-1}$ ),  $\nu_{12}$  ( $521 \text{ см}^{-1}$ ),  $\nu_{20}$  ( $655$  и  $666 \text{ см}^{-1}$ ),  $\nu_5$  ( $731 \text{ см}^{-1}$ ),  $\nu_{15}$  ( $750 \text{ см}^{-1}$ ). Все они являются результатом отклонения конформации гема от плоской  $D_{h4}$  симметрии (когда  $C_{\beta}C_{\beta}$  отклоняются на  $10.5^\circ$  ( $0,16 \text{ \AA}$ ) от плоскости атомов азота пирролов, угол между пиррольной плоскостью и плоскостью четырех атомов азота составляет всего  $2,6$  и  $4.3^\circ$  при среднем отклонении атомов от плоскости  $0,04 \text{ \AA}$ ) (Senge *et al.*, 1997). Колебательные моды, такие как  $\nu_{21}$ , устраняют свое вырождение за счет снижающего симметрию внеплоскостного искажения гема (Jordan *et al.*, 1995). Затем вырожденная мода распадается на дублет, в которой один компонент – симметричное колебание, подвергающееся резонансному усилению. Так, моды  $\nu_{20}$  и  $\nu_{21}$  происходят из симметричных и ассиметричных пиррольных колебаний. Эти полосы исчезают только при полной денатурации белка, когда гем принимает более плоскую конформацию из-за уменьшения контактов его частей с белковыми участками. Наибольший интерес для нас представляет мода  $\nu_{21}$  ( $566\text{-}570 \text{ см}^{-1}$ ), именно для нее установлена положительная зависимость между интенсивностью и степенью искажения гема, но только для Цит С.

Группа плоскостных колебательных мод включает:  $\nu_{51}$  ( $304 \text{ см}^{-1}$ ) и  $\nu_7$  ( $701 \text{ см}^{-1}$ );  $\nu_6$  ( $804 \text{ см}^{-1}$ ) – «дыхание пирролов»;  $\nu_9$  ( $804/271 \text{ см}^{-1}$ ) и  $\nu_8$  ( $347 \text{ см}^{-1}$ ) – мода растяжения связи Fe–N;  $\nu_{48}$  ( $633/642 \text{ см}^{-1}$ ) – симметричное растяжение пирролов;  $\nu_{50}$  ( $360 \text{ см}^{-1}$ ) –  $E_u$  мода отнесена к C–C–C и C–C–S модам отклонения пропионовых групп гема;  $\nu_{14}$  ( $1131 \text{ см}^{-1}$ ) – симметричное колебание  $C_{\beta}\text{-CH}_3$  групп – свободных радикалов;  $\nu_{22}$  ( $1128 \text{ см}^{-1}$ ) – симметричное колебание пиррольных полуколец,  $C_{\alpha}\text{-N}$  связь;  $\nu_{21}$  ( $1313 \text{ см}^{-1}$ ) – колебание сгибания связи  $C_m\text{H}$ . Последний пик считается характерным для гема С-типа.

Интенсивный пик  $1170\text{ см}^{-1}$  редко упоминается в обзорных статьях, посвященных Цит С, хотя присутствует на КР спектрах гемов С и В в обоих редокс-состояниях. В литературе его относят к моде  $\nu_{30}(\text{B}_{2g})$  (Yeo *et al.*, 2008). Этот же пик описывается на спектрах гемоглобина, как соответствующий ассиметричным колебаниям пиррольных полуколец.

У гема В также наблюдаются собственные характерные пики:  $1306$  и  $1342\text{ см}^{-1}$ . Интенсивность пика  $1342\text{ см}^{-1}$  существенно возрастает при восстановлении.

Таблица 1. Описание основных колебательных мод гемов С и В составлено на основе статей: (Spiro, 1985; Hu *et al.*, 1993; Jordan *et al.*, 1995; Berezina *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Jentzen *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1998; Yeo *et al.*, 2008; Delfino *et al.*, 2005; Pätzold *et al.*, 2008; Adar and Erecinska, 1977; Ogawa *et al.*, 2009; Kakita *et al.*, 2012). Надстрочным <sup>1</sup> обозначены низкоинтенсивные пики.

Гем С (Цит С) Положение пиков, $\text{см}^{-1}$		Гем В (Нейроглобин Цитохромы В-типа) Положение пиков, $\text{см}^{-1}$		Мода	Характеристика пика
$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Fe}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Fe}^{2+}$		
—	397	—	—		Колебания $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{S})$ , чувствителен к редокс-состоянию и денатурации
—	570	—	—	$\nu_{21}$	Колебания $\text{C}_\alpha\text{C}_m$ , чувствителен к искажению гема, редокс-состоянию
—	648	—	—	$\nu_{20}$	Колебания растяжения связей С-S и пирролов, чувствителен к редокс-состоянию

610 <sup>i</sup>	610	–	–	–	Характерный пик гема С. Плоскостные колебания пирролов.
–	690	–	–		Колебания растяжения связей С-S и пирролов, пик чувствителен к редокс-состоянию и денатурации белка
748	748	748	748	$\nu_{15}$	Все колебания в геме, чувствителен к искажению гема
1126-1128	1126	1130	1130	$\nu_{14}$	Колебание боковых радикалов (связи $C_bCH_3$ ). Пик чувствителен к жесткости белкового микроокружения
1170	1170 <sup>i</sup>	1168	1168		Ассиметричные колебания пиррольных колец, чувствительные к подвижности пирролов
–	–	1306 <sup>i</sup>	1306	Гем В	Характерен для гема В
1313	1313	–	–	$\nu_{21}$	Колебание сгибания связи $C_mH$ характерные для гема типа С
–	–	–	1342	Гем В	Характерен для гема В
1371	1365	1375	1368	$\nu_4$	симметричные колебания $C_aN$ , $C_aC_b$ групп пирролов - «дыхание» пирролов. Пик чувствителен только к редокс-состоянию атома железа

1502	1502			$\nu_3$	Колебания растяжения $C_\beta C_\beta$ и $C_\alpha C_m$ , чувствительность к спину и размеру макроцикла
1551 <sup>i</sup>	1551 <sup>i</sup>	1551	1551	$\nu_{11}$	колебания $C_\alpha C_m$ , $C_\alpha C_m H$ , $C_\alpha C_b$ групп в окисленных гемопро-теинах. Пик чувстви-телен к наличию акси-альных лигандов, редокс-состоянию атома Fe, внеплос-костным искажениям гема
1590	1590	1586	1586	$\nu_{19}$	колебания $C_\alpha C_m$ , $C_\alpha C_b$ , $C_\alpha N$ . Пик чувстви-телен к спину атома Fe, атома Fe, внеплос-костным искажениям гема
1596	1596			$\nu_2$	Колебания растяжения $C_\beta C_\beta$ , чувстви-тельность к спину и разме-ру макроцикла и его внеплоскостным ис-кажениям
1638	–	1638	–	$\nu_{10}$	колебания $C_\alpha C_m$ , $C_\alpha C_m H$ , $C_\alpha C_b$ групп. Пик чувствителен к спину и редокс-состоянию атома Fe и внеплоскостным ис-кажениям гема

### 1.3.3 Регистрация ГКР спектров от изолированных митохондрий

Поскольку интенсивность КР сигнала от окисленных цитохромов в не-сколько раз ниже, чем от восстановленных, при работе с изолированными функ-

ционирующими митохондриями, у которых все комплексы ЭТЦ восстановлены частично, и степень восстановления динамично меняется, получение сигнала от окисленных комплексов представляет сложную задачу. Обычно оценку степени восстановления ЭТЦ получают, вычитая спектры образцов, восстановленных дитионитом натрия, из спектров нативных митохондрий.

Метод ГКР помогает обойти это затруднение: как восстановленные, так и окисленные цитохромы обладают интенсивными спектрами ГКР, и их можно отличить друг от друга (Таблица 2). Ограничением метода ГКР является невозможность снимать спектры Цит С в невыделенных из клеток митохондриях, так как эффект усиления действует не более 10 нм от серебряных наноструктур. В этих условиях принципиальную роль играет выбор наноструктур и молекулы-репортёра.

Например, в работе (Brazhe *et al.*, 2015) проводили исследования ГКР Цит С в живых митохондриях, расположенных на серебряных наноструктурах с иерархической морфологией. Серебряные наноструктуры представляли собой сильно перекрывающиеся серебряные кольца сложной морфологии с многоуровневым расположением. Рассеяние света металлическими наночастицами на плоской металлической поверхности (что и представляют собой подложки с напылением), характеризуется следующими правилами:

1) Если размер наночастицы значительно меньше длины волны падающего света, то наночастицу можно рассматривать, как электрический дипольный рассеиватель с соответствующей дипольной поляризацией.

2) Индуцированный дипольный момент этой наночастицы определяется падающим и отраженным электрическими полями и взаимодействием наночастица-поверхность

Усиление комбинационного рассеяния обусловлено иерархической структурой колец напыленных по типу "кунжутного семени". Благодаря этой структуре увеличивается число контактов между митохондриями и частицами серебра, сами митохондрии становятся менее подвижны, усиливается электрическое поле вбли-

зи колец за счет индуцированных светом нормальных компонент электрических диполей наночастиц. Дополнительное усиление КР сигнала возможно в результате эффекта поверхностного плазмонного резонанса. Более простые поверхности, состоящие из нескольких слоев сферических наночастиц диаметром 10-50 нм без иерархической структуры, не позволяли регистрировать ГКР спектры от расположенных на них митохондрий.

Возникает вопрос, сигнал от каких именно цитохромов усиливается. Цит С в митохондриях существует в нескольких фракциях:

- 1) иммобилизованный пул, связанный с кардиолипином на поверхности внутренней митохондриальной мембраны,
- 2) подвижный пул 3D и 2D-диффузионных молекул Цит С, движущихся в межмембранном пространстве вблизи или между внутренними и внешними митохондриальными мембранами
- 3) молекулы Цит С, кратковременно связанные с комплексами III или IV, принимающие или отдающие электроны

На основе литературных данных авторы предположили, что расстояние между серебряными подложками и Цит С меняется в пределах 7-17 нм и может ещё увеличиться, если межмембранное пространство станет шире. Расстояние между Цит С, связанным с комплексом III, и подложкой составляет не менее 13 нм. Цит С, связанный с ВММ или комплексом IV, отдалён от подложек примерно на 17 нм. Следовательно, сигнал ГКР исходит в большей степени от 3D-диффундирующего Цит С, в то время как Цит С, взаимодействующий с комплексом IV или кардиолипином ВММ не вносит вклад в спектры. Это предположение основано на том, что Цит В, чей спектр также возбуждается зелёным лазером, находится на внутренней поверхности ВММ и не вносит вклада в общий спектр ГКР.

Таблица 2. Положения характерных пиков на спектрах КР цитохрома С, миоглобина, митохондрий, кардиомиоцитов (КМ), сердца крысы на основе статей (Berezhna *et al.*, 2003; Brazhe *et al.*, 2015; Brazhe *et al.*, 2012; Brazhe *et al.*, 2013).

Положение пика, см <sup>-1</sup>	На спектрах каких объектов представлены являются пики КР
<b>570</b>	На спектрах Цит С, кардиомиоцитов, на спектре сердца крысы
<b>604</b>	На спектрах Цит С, КМ, на спектре сердца крысы
<b>750</b>	На спектрах восстановленных Цит С и С <sub>1</sub> , митохондрий, КМ, на спектре сердца крысы
<b>1125</b>	На спектрах восстановленных цитохромов В (В <sub>high</sub> , В <sub>low</sub> и В560), митохондрий, кардиомиоцитов, на спектре сердца крысы
<b>1300</b>	На спектрах Цит В
<b>1310</b>	На спектрах Цит С
<b>1313</b>	На спектрах Цит С
<b>1337</b>	На спектрах Цит В
<b>1358</b>	На спектрах дезоксимиоглобина, КМ и сердца при гипоксии
<b>1377</b>	На спектрах дезоксимиоглобина, КМ и сердца при нормоксии
<b>1582</b>	На спектрах восстановленного Цит С, на спектрах сердца и КМ при восстановлении, на спектре изолированных митохондрий как обработанных, так и не обработанных дитионитом
<b>1585</b>	На спектрах восстановленных Цит С, С <sub>1</sub> , В и оксимиоглобина. Чётко выражен в спектре КМ (и при обработке дитионитом)
<b>1638</b>	На спектре РКР чистого окисленного Цит С, оксимиоглобина, КР спектрах КМ и сердца
<b>1658</b>	Соответствует колебанию связи С=О в белковых α-спиралях, присутствует в КР спектрах клеток разных типов

Следует отметить, что спектры ГКР митохондрий показывают пик при  $1313\text{ см}^{-1}$  (в качестве специфического для Цит С) и не имеют пиков при  $1300$  и  $1337\text{ см}^{-1}$ , которые специфичны для Цит В, миоглобина и гемоглобина. Это свидетельствует о том, что спектры ГКР митохондрий соответствуют спектру только цитохрома С. Данный эффект позволяет селективно исследовать конформационные изменения гема Цит С при работе дыхательной цепи в интактных митохондриях

#### 1.4 Дыхательная цепь митохондрий

Митохондрия – двумембранная органелла размером примерно  $1 \times 2\text{ мкм}$ , присутствующая в большинстве эукариотических клеток. У класса млекопитающих она присуща клеткам всех типов ткани, кроме эритроцитов. Одной из главных функций митохондрий является аккумуляция энергии катаболизма соединений за счёт клеточного дыхания.

Дыхание эукариотических клеток является критически важным условием жизни и здорового функционирования клеток, основные процессы и участники дыхания локализованы в митохондриях. Любые изменения в этих процессах влияют на жизнедеятельность клетки, и наоборот, условия питания, стадия жизненного цикла, детерминированность и патологии клетки влияют на её дыхательную способность. Существуют доказательства того, что изменения морфологии митохондрий, их дыхательной активности и активности отдельных участников сопутствуют заболеваниям, таким как сердечная недостаточность, гипертония, диабет (Vafai and Mootha, 2012).

Клеточное дыхание принято представлять тремя последовательными этапами (Gnaiger, 2008): (1) происходящее в цитоплазме расщепление молекулярных субстратов клетки на двухуглеродные фрагменты, связанные с коферментом А – ацетил-СоА; (2) окисление этих фрагментов в митохондриальном цикле Кребса – замкнутой последовательности из 8-ми реакций, в результате которой энергия катаболизма молекул запасается в виде высокоэнергетических молекул водорода в составе НАД(Ф)Н, ФАДН<sub>2</sub>; (3) на третьей стадии эти восстановленные кофермен-

ты окисляются, при этом образуются  $H^+$  и высокоэнергетические электроны, которые передаются по дыхательной цепи на молекулярный кислород и восстанавливают его до  $H_2O$ . В ходе этого процесса энергия запасается в виде потенциала на ВММ, который используется для реакций окислительного фосфорилирования на АТФ-синтазе.

Рассмотрим подробнее третий этап клеточного дыхания (Рисунок 3). Во внутренней мембране митохондрий (ВММ) локализована электронтранспортная цепь (ЭТЦ) (Rich and Maréchal, 2010). Электроны поступают в ЭТЦ через комплексы I и II от НАДН и сукцината, соответственно, и переносятся на конечный акцептор электронов – кислород, восстанавливаемый на IV комплексе до  $H_2O$ . В процессе дыхания комплексы I, III и IV переносят протоны из матрикса в межмембранное пространство (ММП), тем самым генерируя протонный градиент на ВММ, который затем используется для фосфорилирования АДФ на АТФ-синтазе. Пройдя через всю цепь переносчиков от НАДН ( $E_0' = -32$  В) к кислороду ( $E_0' = +0,82$  В), электроны потеряют значительную часть свободной энергии, поскольку разность между стандартными потенциалами ОВ пар НАДН/НАД<sup>+</sup> и  $H_2O/ \frac{1}{2} O_2$  относительно велика.

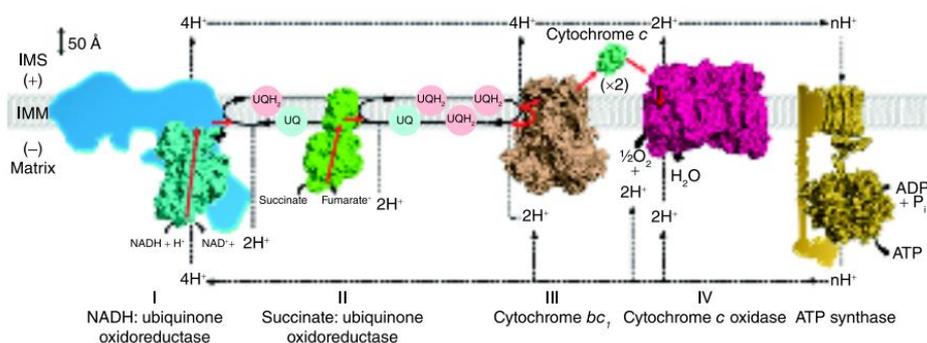


Рисунок 3. Схема комплексов дыхательной цепи, полученная с помощью электронного микроскопирования индивидуальных комплексов и рентгеновской кристаллографии с высоким разрешением (Нельсон Д.Л., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера, 2014).

В ЭТЦ выделяют 4 основных дыхательных комплекса (Rich and Maréchal, 2010, Скулачев и др. Мембранная биоэнергетика, 2010). Все они встроены во ВММ. В каждый из комплексов включены коферменты, формирующие цепь переноса электронов от первичных доноров к кислороду. Они расположены в порядке увеличения стандартных окислительно-восстановительных (ОВ) потенциалов.

- 1) Комплекс I, НАДН:убихинон-оксидоредуктаза, окисляет НАДН за счёт работы протонной группы — флавиномононуклеотида, ФМН, при этом в результате окисления одной молекулы НАДН образуется 2 восстановительных эквивалента. Перенос пары электронов через железосерные центры комплекса I сопряжён с передачей 4 протонов из матрикса в межмембранное пространство.
- 2) Убихинон, или кофермент Q – это растворимый хинон. Когда восстановительные эквиваленты переходят от Комплекса I на убихинон, тот восстанавливается в убихинол  $QH_2$  через промежуточную семихиноновую форму.
- 3) Комплекс II (сукцинат:убихинон-оксидоредуктаза), являющийся также участником цикла Кребса, обладает флавиновым кофактором ФАД и железосерными кластерами. Субстратом ему служит сукцинат, поставляемый из цикла Кребса. Перенос электронов через комплекс не сопровождается созданием протонного градиента.
- 4) Комплекс III (комплекс цитохромов  $bc_1$ ) содержит в качестве кофакторов цитохромы В типа (содержит два гема:  $b_L$  и  $b_H$ ),  $c_1$  и железосерный центр Рискс. Действуя в определённой последовательности, посредством Q-цикла, цитохромы переносят электроны от убихинола  $Q_0$  на Цит С и на окисленный убихинон. Разделение путей в Q-цикле связано со способностью глобулярного домена Рискс менять свою ориентацию в пространстве и образовывать пути переноса электронов то с  $Q_0$  на Цит С, то на гем  $b_L$  и далее на окисленный убихинон  $Q_i$ . При этом в сумме 2 протона забираются

из матрикса, 4 протона попадают в межмембранное пространство и 2 цитохрома С восстанавливаются.

- 5) Цит С – единственный переносчик, не погруженный в мембрану, он движется по наружной поверхности ВММ и диффундирует в ММП, транспортируя электроны от комплекса III к комплексу IV.
- 6) Комплекс IV (Цит-С-оксидаза). Цит-С-оксидаза катализирует транспорт электронов от восстановленного Цит С к молекулярному кислороду. В процессе работы IV комплекса происходит перекачка 4 протонов из матрикса в межмембранное пространство. Таким образом, IV комплекс вносит вклад в потенциал на ВММ.
- 7) Комплекс V (АТФ-синтаза). Молекула АТФ-синтазы состоит из каталитической субъединицы  $F_1$  и субъединицы  $F_0$ , отвечающей за перенос протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Фермент состоит из 2 субъединиц, кодируемых митохондриальной ДНК и 10-11 субъединиц, которые кодируются ядром клетки. Механизм синтеза АТФ митохондриальной АТФ-синтазой за счёт вращательного движения нескольких субъединиц приводит к функциональному связыванию протонного потока и синтеза АТФ (Anibh, 2003).

#### 1.4.1 Организация комплексов ЭТЦ

На схемах ЭТЦ комплексы, как правило, изображены строго расположенными в ряд отдельными структурами, в то время как в живой митохондрии способы организации комплексов разнообразны и несут регуляторную функцию. Исторически первая модель расположения комплексов на кристах называлась текущей и представляла перенос электронов по ЭТЦ, как результат случайного столкновения флуктуирующих в липидном бислое комплексов. Двадцать лет назад была выдвинута другая модель, согласно которой участники ЭТЦ образуют суперкомплексы – белковые конгломераты со стехиометрически определенным отношением отдельных комплексов. Близкое расположение комплексов в таких объединениях служит ускорению электронного транспорта и снижает вероятность образо-

вания активных форм кислорода (АФК). Наконец, пластичная или гибридная теория допускает, что комплексы могут менять форму организации, собираясь в суперкомплексы (иначе - респирасомы) и распадаясь, регулируя тем самым активность ЭТЦ (Xavier, 2020).

В действительности респирасомы были выделены из разных тканей крыс: из кортекса, скелетных и сердечных мышц, из клеток печени. При этом в суперкомплексы собираются преимущественно I, III и IV комплексы. Были определены малые суперкомплексы III<sub>2</sub> IV<sub>1</sub>, а также большие респирасомы I<sub>1</sub> III<sub>2</sub> IV<sub>x</sub> (x = 0-3). При этом большие суперкомплексы, содержащие комплекс IV, более стабильны, следовательно, функционально более эффективны. Действительно, удельная активность суперкомплекса I<sub>1</sub> III<sub>2</sub> IV<sub>1</sub> наиболее высока, и содержание этого суперкомплекса в митохондриях крыс головного мозга увеличивается с возрастом относительно других суперкомплексов. Вероятно, это частично компенсирует общее снижение содержания дыхательных суперкомплексов с возрастом и снижение активности АТФ-синтазы (Frenzel *et al*, 2010).

Диссоциация суперкомплексов наблюдалась при таких заболеваниях человека, как синдром Барта, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет и старение. У собак с индуцированной сердечной недостаточностью в течение трех недель регистрировали снижение содержания респирасом и увеличение относительного содержания отдельных комплексов I, III и IV, что говорит о возможном вкладе диссоциации респирасом в митохондриальную дисфункцию кардиомиоцитов. В другой работе, тоже на модели сердечной недостаточности собак, было показано, что при нормальном расходе АДФ на восстановленную до воды молекулу O<sub>2</sub> было отмечено резкое снижение АДФ-стимулированного дыхания. При этом количество свободных комплексов I и III было увеличено, что, вероятно и является причиной снижения эффективности ЭТЦ (Mariana *et al*, 2008).

#### 1.4.2 Клеточная регуляция активности дыхательной цепи

Реакция между Цит С и комплексом IV (Цит-С-оксидазой) является предполагаемой лимитирующей стадией переноса электронов по ЭТЦ у млекопитающих в интактных митохондриях, но не в изолированных. Цит С и комплекс IV демонстрируют уникальные регуляторные характеристики, включая аллостерическую регуляцию, экспрессию тканевых изоформ и регуляцию через клеточные сигнальные пути (Hüttemann *et al.*, 2012). Было показано, что в ответ на потребность клеток в энергии осуществляется активная регуляция митохондриальной АТФ-синтазы в различных типах клеток, таких как зрелые кардиомиоциты и нейроны (показано для клеток крыс и собаки) фибробласты (показано на клетках человека), а также на скелетных и сердечных мышцах у детей (Anibh, 2003).

### **Цитохром-С-оксидаза, как мишень регуляции работы ЭТЦ.**

После выделения митохондрий специфическая активность комплекса IV значительно повышается, в отличие от других комплексов ЭТЦ, что можно объяснить потерей комплексом IV обратной связи со скоростью переноса электронов через ЭТЦ в изолированных митохондриях. Было идентифицировано несколько сигнальных путей, которые влияют на комплекс IV, включая протеинкиназы А и С, рецепторную тирозинкиназу и сигнализацию в ответ на воспаление.

Одним из механизмов регуляции является экспрессия тканеспецифичных изоформ. У млекопитающих идентифицировано минимум шесть различных изоформ комплекса IV, которые кодируются отдельными генами. Экспрессия тканеспецифичных изоформ может не только непосредственно влиять на активность Цит С и комплекса IV, но и служить платформой для тканеспецифичной клеточной сигнализации, например, через предоставление сайта для фосфорилирования (Hüttemann *et al.*, 2010). Например, был обнаружен сайт фосфорилирования на специфичной для сердечной и скелетной мышечной ткани субъединице VIa цитохром-С оксидазы. Соответствующий сайт на изоформе печеночного типа отсутствует, что говорит об адаптации клеточной сигнализации к специфическим потребностям ткани (Tsukihara *et al.*, 1996).

Другой механизм - аллостерическая регуляция через связывание АТФ и АДФ встроенным в комплекс IV сенсором, который меняет активность комплекса IV в зависимости от потребности клетки в энергии. Посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование, позволяют быстро модифицировать белковую функцию, адаптируя ее к клеточным изменениям. На комплексе IV были обнаружены 14 сайтов фосфорилирования и несколько сигнальных путей были изучены достаточно глубоко. Но в подавляющем большинстве случаев сигнальные пути, киназы и фосфатазы, опосредующие эти фосфорилирования, остаются неизвестными или неопределенными. Известно ингибирование комплекса IV посредством фосфорилирования тирозинкиназой, активируемой цАМФ-зависимой протеинкиназой А. В условиях клеточного голодания это ингибирование является адаптивным и служит снижению синтеза АТФ. Однако реакция комплекса IV на цАМФ-сигнализацию является тканеспецифичной: в нейрональной ткани обработка теофилином (специфический индуктор цАМФ) приводило к активации комплекса IV, тогда как в сердце теофиллин не оказывал существенного влияния на активность комплекса IV (Hüttemann *et al.*, 2012).

Наконец, перспективным направлением исследований является изучение прямого или косвенного действия кальция на фосфорилирование комплекса IV и Цит С. Комплекс IV млекопитающих содержит сайт кальциево-натриевого обмена в субъединице I. Предполагается, что кальций может косвенно влиять на комплексы через изменение состояния фосфорилирования за счёт активации фосфатаз. Во время ишемии внутриклеточная концентрация кальция увеличивается, когда АТФ-зависимые насосы выходят из строя, а митохондрии активно накапливают кальций. Повышенный уровень митохондриального кальция является мощным сигналом для активации фосфатаз, таким образом кальций индуцирует дефосфорилирование большинства митохондриальных белков. При этом наблюдается усиление дыхания митохондрий и гиперактивация комплекса IV, потеря аллостерического ингибирования комплекса IV молекулами АТФ. Этот эффект, возникающий в условиях ишемического/реперфузионного повреждения, приводит к состоянию, когда комплекс IV может генерировать высокий  $\Delta\Psi$ , приводящий к

всплеску АФК из-за переноса электронов на кислород в промежуточных участках ЭТЦ, в частности, в комплексах I и III (Hüttemann *et al.*, 2012).

### **Цит С, как мишень регуляции работы ЭТЦ.**

Цит С является ключевым белком в клеточной жизни (дыхании) и клеточной смерти (апоптозе), и обе его функции тонко регулируются. Сайт связывания Цит С положительно заряжен, и существует фракция Цит С, связанная с отрицательно заряженными фосфолипидами внутренней мембраны, в частности кардиолипином. Как и комплекс IV, Цит С подвергается регуляции несколькими путями разной природы, включая синтез тканеспецифичных изоформ и сигнальные пути.

Аллостерическая регуляция осуществляется за счёт АТФ, который связывается с Цит С, способствуя ингибированию реакции между ним и комплексом IV (Hüttemann *et al.*, 2010).

Фосфорилирование является одним из наиболее важных регуляторных механизмов. На Цит С обнаружены пять участков фосфорилирования, потенциально связанные с регуляцией его работы, в том числе апоптотической активностью (García-Heredia *et al.*, 2011; Kalpage *et al.*, 2020). Из тканей сердца и печени коровы был выделен Цит С, фосфорилированный по Tyr97 и Tyr48 (Рисунок 4). Фосфорилирование в обоих случаях (Tyr97 в сердце, Tyr48 в печени) вызывало частичное, но не полное ингибирование реакции между Цит С и комплексом IV (Hüttemann *et al.*, 2012). Фосфорилирование *in vitro* по каждому из потенциальных сайтов снижало активность электрон-транспортной функции Цит С (Kalpage *et al.*, 2020). Тканеспецифичное фосфорилирование регулируется  $\Delta\Psi$  на ВММ, и при активации снижает поток электронов по ЭТЦ (Kalpage *et al.*, 2019). Специфические киназы, влияющие на апоптотическую способность Цит С, недавно были предложены (He *et al.*, 2022).

Фосфорилирование привносит отрицательный заряд, изменяет электростатические свойства белка, тем самым влияя на его взаимодействие с другими протеинами. Кроме того, фосфорилирование может изменять конформацию белка. Чтобы изучить структурно-функциональные изменения, индуцируемые фосфори-

лированием тирозинов в Цит С, в работе (García-Heredia *et al.*, 2011) исследовали работу двух форм мутантов: Y48E (замена тирозина на глутамат в положении 48) и Y97E (замена тирозина на глутамат в положении 97). Глутамат, в отличие от тирозина, обладает дополнительным отрицательным зарядом на карбоксильном остатке, а также у него в структуре отсутствует фенольное кольцо. Таким образом, замена тирозина на глутамат в геме Цит С имитирует фосфорилирование за счёт появления отрицательного заряда, но вносит структурные изменения.

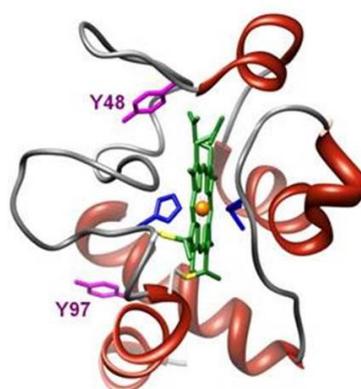


Рисунок 4. Модель человеческого Цит С, остатки тирозина (Tyr48 и Tyr97), доступные для фосфорилирования изображены фиолетовым цветом (García-Heredia *et al.*, 2011).

Изменения конформации гема, вызванные мутациями, могут влиять на величину окислительно-восстановительного потенциала Цит С, изменяя тем самым его транспортную активность. Мутация Y48E вызывала падение ОВ-потенциала на 80 мВ, в результате он становился ниже, чем у Цит С<sub>1</sub> в дыхательной цепи, и вызывал ингибирование потока электронов. Также Tyr97 с заменой на глутамат обладает значительно более низким сродством с комплексом IV (García-Heredia *et al.*, 2011). Функциональное объяснение ингибирования митохондриального дыхания фосфорилированием Цит С может заключаться в том, что в нормальных условиях оно обеспечивает достаточный мембранный потенциал для производства

АТФ без образования избыточных свободных радикалов, которые сопутствуют высоким уровням  $\Delta\Psi$  на мембране, то есть предохраняет митохондрию от всплеска активных форм кислорода (АФК) (Hüttemann *et al.*, 2012; Kalpage *et al.*, 2019; Kalpage *et al.*, 2020).

Авторы (Hüttemann *et al.*, 2012) предполагают, что клетки изменяют активность ЭТЦ путем посттрансляционных модификаций комплекса IV и/или Цит С в нормальных физиологических условиях. В условиях же истощения энергии клетки пытаются увеличить выработку АТФ, дефосфорилируя эти комплексы. Однако в патологических условиях, таких как ишемическое состояние, энергетическое истощение сопровождается кислородной недостаточностью. В этом состоянии терминальный субстрат ЭТЦ (кислород) отсутствует, и электроны не могут покинуть цепь обычным путём в условиях высокого мембранного потенциала, что вызывает причиной вспышку АФК при реперфузии.

## 1.5 Заключение

Последние годы появляется все больше данных о роли конформации макроцикла в регуляции физико-химических свойств гемопротеинов, и о важности мобильности белкового окружения для возбуждения внеплоскостных гемовых деформаций. Методом рентген-структурного анализа и вибрационной микроскопии были изучены конформации макроциклов сотен белков. С другой стороны, весьма немногочисленные сведения о клеточных механизмах регуляции функциональной активности гемопротеинов посредством конформационных подстроек. Одно из основных ограничивающих требований – необходимость работать со сложными живыми системами уровня органелл и клеток с динамично меняющимися условиями в жидкой среде. Для этих целей не подходит рентген-структурный анализ и ограничена применимость компьютерных методов, необходимы исследования *in vivo* и *in vitro*.

Перспективным методом являются спектроскопии КР и ГКР, регистрирующие не только редокс-состояние гем-содержащих белков, но и некоторые конформационные параметры гемов. Используя за основу эти подходы в оптимально

разработанных экспериментальных схемах, мы исследовали разные пути регуляции активности Цит С посредством изменения конформации его гема: (1) молекулярные – за счет внесения мутаций в белковое окружение гемов Цит С и редокс-партнера нейроглобина с последующей регистрацией конформационных изменений при переносе электрона от Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) к Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ); (2) посредством локальных физико-химических условий – за счет модуляции работы ЭТЦ, регулирующей рН и мембранный потенциал; (3) при патологических условиях гипертензии и при гипоксии/реоксигенации выделенных кардиомиоцитов и изолированного сердца крысы.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Синтез диких и мутантных форм Цит С и Нгб

#### 2.1.1. Реактивы и оборудование для синтеза рекомбинантных Цит С и Нгб

1) Реагенты и растворы для выделения диких и мутантных форм Цит С и нейроглобина:

- Последовательности генов Нгб и ЦитС человека с/без мутаций синтезировали из олигонуклеотидных праймеров в ЗАО “Евроген” (Россия)
- Плазмидный вектор pET17-Ngb для встраивания генов Нгб (Novagen, США)
- Плазмидный вектор pVP(CYC1/CYC3) для встраивания генов Цит С
- штаммы бактерий *E. coli*: SHuffle T7 (NEB, США) и JM-109 (Promega, США)
- Питательная среда SB для клеток *E.coli* JM-109 с экспрессией генов Цит С
- Питательная среда Terrific Broth (TB) для клеток *E. coli* SHuffle T7 с экспрессией генов Нгб, pH 7.4:
  - 12 г/л бактотриптона,
  - 24 г/л дрожжевого экстракта,
  - 0.04% глицерина
  - 1/10 объема раствора: 0.17 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.72 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- ампициллин (AppliChem, Дармштадт, Германия)
- *Pfu*-ДНК-полимераза (Fermentas, Пабраде, Литва)
- рестриктаза *Mal* I (СибЭнзим, Новосибирск, Россия)
- буфер для лизиса (25 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 1 мМ  $\text{NaN}_3$ )
- буфер для диализа (10 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7.9)

2) Оборудование для выделения диких и мутантных форм Цит С и Нгб

- френч-пресс (Spectronic Instruments, Inc., Ирвайн, Калифорния, США)
- жидкостная хроматографическая система “АКТА FPLC” (GE HealthCare, Чикаго, Иллинойс, США)
- лиофилизирование на ALPHA I-5
- гель-фильтрационную колонку GL 10/500 (Pharmacia, Швеция) с сорбентом Sephadex G-75 (Pharmacia, Швеция).
- спектрофотометр Cary-50 (Varian, США)
- Дистиллированную воду дополнительно очищали на системе Milli-Q (Millipore, Берлингтон, Массачусетс, США)

### 2.1.2. Протокол внесения мутаций в генные последовательности Цит С и Нгб

Внесение аминокислотных замен в предполагаемые контактные поверхности Нгб (E60K, E87K) и Цит С (K25E, K72E), а также в последовательность Ω-петли (аминокислоты 70-85) Цит С с соответствующими вариантами T78S/K79P осуществлялись в соответствии с протоколом, описанным в (Chertkova *et al.*, 2017). Получение мутантов Цит С по Tyr97 и Tyr48, – замены тирозина на глутаминовую кислоту, имитирующие фосфорилирование осуществлялись по протоколу (Chertkova *et al.*, 2022).

Мутации были введены в плазмидную последовательность pET17-Ngb и pVP(CYC1/CYC3) путем сайт-направленного мутагенеза в соответствии с методом QuikChange™ Mutagenesis Kit (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния, США). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 50 нг матричной ДНК (pET17-Ngb или pVP (CYC1)), олигонуклеотидные праймеры (125 нг) с мутациями, четыре дезокси-нуклеозидтрифосфата (по 10 нмоль каждого) и полимеразу Pfu (2,5 единицы активности). Девятнадцать циклов реакции амплификации проводили по следующей схеме: денатурация матричной ДНК при 95°C в течение 30 с, отжиг при 55°C в течение 60 с и элонгация при 72°C в течение 10 мин. Когда реакция была завершена, добавили рестриктазу Mali (10 единиц активности) и реакционную смесь инкубировали в течение 60 минут при 37°C. Далее, аликвоты приготовленной

смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* JM-109 в соответствии со стандартной процедурой. Образование мутантной ДНК в процессе мутагенеза анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

### 2.1.3. Экспрессия и выделение диких и мутантных форм ЦитС и Нгб

Экспрессию генов дикого типа и мутантных генов Цит С проводили в *E. coli* JM-109 в жидкой питательной среде SB с ампициллином (конечная концентрация составляла 150 мкг/мл) без добавления индуктора при 37°C при интенсивном перемешивании в течение 24 ч. Для синтеза Нгб гены экспрессировали в *E. coli* SHuffle T7 в жидкой питательной среде TB с ампициллином (конечная концентрация составляла 150 мкг/мл) без добавления индуктора при 28°C при интенсивном перемешивании в течение 24 ч.

Затем выросшие клетки гомогенизировали путем продавливания через френч-пресс (Spectronic Instruments, Inc., Ирвайн, Калифорния, США) при высоком давлении с последующим центрифугированием при 95 000 g в течение 30 минут. Выделение и очистку целевых белков проводили на жидкостной хроматографической системе “АКТА FPLC” (GE HealthCare, Чикаго, Иллинойс, США) в соответствии с ранее разработанными схемами (Chertkova *et al.*, 2022). Проводили анионообменную хроматографию на колонке с сорбентом MP HQ (Bio-Rad, США). Степень очистки белков в полученных фракциях определяли с помощью электрофореза в 12 % растворе триптицина SDS-PAGE. Фракции Нгб с чистотой приблизительно  $\geq 90-95\%$  подвергали трехкратному диализу в 10 мм аммонийно-карбонатном буфере (pH 7,9).

Фракции, обогащенные целевым белком Нгб, концентрировали путем повторного высаливания, после чего осадок ресуспендировали в 50 mM натрий-фосфатном буфере, содержащем 150 mM NaCl, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7.0, и наносили на гель-фильтрационную колонку GL 10/500 (Pharmacia, Швеция) с сорбентом Sephadex G-75 (Pharmacia, Швеция). Очищенный белок диализовали против буфера 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.9, затем лиофилизировали на устройстве ALPHA I-5. и хранили при -20°C.

Полученные фракции Цит С окисляли путем обработки феррицианидом калия, добавляя его в эквимольной концентрации перед трехкратным диализом в 10 мм аммонийно-карбонатном буфере (рН 7,9), а затем лиофилизировали на устройстве ALPHA I-5. Для фракций Нгб дополнительное окисление не требовалось. Концентрации Нгб и Цит С определяли путем измерения оптической плотности в области полосы Core на спектрофотометре Cary-50 (Varian, США).

Все образцы цитохрома С и нейроглобина, использованные в работе, предоставлены м.н.с., асп. Семеновой М.А. и с.н.с., к.б.н. Чертковой Р.В. (ГНЦ ИБХ РАН, лаборатория инженерии белка).

## **2.2. Регистрация и обработка РКР и ГКР спектров диких и мутантных форм ЦитС и Нгб**

### **2.2.1. Реактивы и оборудование для синтеза наноструктур и проведения РКР измерений**

#### **1) Реагенты для синтеза серебряных наноструктур**

- $\text{AgNO}_3$  — 2,93 г.
- $\text{NaOH}$  — 7 г.
- $\text{NH}_4\text{OH}$  — 5 мл.
- MilliQ

#### **2) Растворы для измерения КР и ГРК спектров изолированных Цит С и Нгб:**

- 30 мМ натрий-фосфатный буфер PBS, рН 6.5, 22°C
- 30 мМ натрий-фосфатный буфер PBS с 7мМ ЭДТА, рН 6.5, 22°C
- Восстановитель НАДФН (на кончике иглы)

#### **3) Оборудование для синтеза наноструктур и рамоновской спектроскопии:**

- КР-микроспектрометр NTEGRA Spectra (NT-MDT, Зеленоград, Россия), соединенный с инвертированным микроскопом IX-71(Olympus, Япония)
- Магнитная мешалка
- Ультразвуковой распылитель (Альбеда ПМП, ТУ 9444-001-49917419-2010, Россия )
- Покровные стекла
- Нагревательная поверхность

### 2.2.2. Приготовление наноструктур для ГКР спектроскопии

Наноструктуры разработаны группой профессора Е.А. Гудилина на факультете наук о материалах МГУ.

Предварительно готовили покровные стёкла – будущую поверхность для напыления: отмывали в детергенте, высушивали на воздухе и помещали в термически устойчивый стеклянный стакан на 1 л. Этот стакан устанавливали на поверхность, нагреваемую до 340°C.

Готовили аммиачный комплекс для напыления. В 40 мл воды MilliQ растворяли 2.93 г нитрата серебра, перемешивая магнитной мешалкой (300 об. в мин). В раствор затем вливали тонкой струей 30 мл раствора NaOH (примерно 5 шариков ~ 7 г). Выпавший осадок трижды промывали в 100 мл воды MilliQ, оставляя его на мешалке по 10 мин. После 3-его перемешивания к осадку добавляли 25 мл MilliQ и 5 мл концентрированного раствора аммиака до растворения осадка. 30 мл итогового раствора аммиачного комплекса серебра наливали в капсулу ультразвукового распылителя Альбеда. Раствор напыляли медленными круговыми движениями по всей поверхности покровных стекол при температуре 380°C, делая 5-минутные перерывы каждые 3-4 минуты. При этом расстояние от сопла до стекол – 1.5 – 2 см. После распыления покровные стекла выдерживали 15 минут при температуре 400°C, затем охлаждали и помещали в закрытую от света емкость. В результате на стеклах формировались сложные

иерархические структуры из металлического серебра. Полученные таким способом наноструктуры сохраняли стабильность в течение нескольких месяцев.

Оптические свойства синтезированных наноструктур исследовали с помощью спектроскопии отражения и на спектрах определяли положение плазмонного резонанса. Пик плазмонного резонанса широкий, занимает область спектра от 400 до 600 нм, что удобно для работы с лазерами, возбуждающими в видимом диапазоне спектра.

### 2.2.3. Регистрация и анализ РКР спектров восстановленных форм Цит С и Нгб и ГКР спектров окисленных форм соответственно

Эксперименты выполняли совместно с м.н.с., асп. Семеновой М.А. и с.н.с., к.б.н. Чертковой Р.В. (ГНЦ ИБХ РАН, лаборатория инженерии белка). Подготовка образцов включала растворение навески белка до 0.25 мМ в натрий-фосфатном буфере (рН 6.5) для ГКР измерений и до 1 мМ для КР измерений. Для регистрации резонансного КР от гема окисленного Цит С или Нгб использовали лазерное возбуждение 532 нм. Мощность лазера не превышала 1 мВт.

Для получения ГКР-спектра окисленных форм диких и мутантных Цит С и Нгб растворы белков концентрацией 0,25 мМ в объеме 30–50 мкл помещали в чашку Петри со стеклянным дном и сверху накрывали покровным стеклом с нанесенной серебряной наноструктурированной поверхностью. При таком расположении иерархическая поверхность обращается в сторону дна чашки, от которой ее отделяет слой жидкости. Луч лазера фокусировали на этом слое около наноструктурированной поверхности. Использовали объектив  $\times 20$  с числовой апертурой 0,45; время измерения составляло 30–120 с, диаметр лазерного пятна  $\sim 800$  нм.

Для регистрации КР спектров восстановленных форм Нгб и ЦитС на дно стеклянной чашки Петри помещали 30 мкл 1мМ раствора окисленного белка, а затем добавляли избыток восстановителя НАДФН. О полном восстановлении белков судили по исчезновению пика с положением максимума при  $1371-1375\text{ см}^{-1}$  и появлению пика  $1368\text{ см}^{-1}$ , также при восстановлении значительно снижается

интенсивность пика 1638-1640  $\text{cm}^{-1}$  и возрастает интенсивность пика 750  $\text{cm}^{-1}$ . Обычно на полное восстановление нейроглобина уходило 1–2 мин после добавления НАДФН. Спектры восстановленных форм Цит С и Нгб, как диких типов, так и мутантных форм, в несколько раз интенсивнее спектров окисленных форм. Спектры окисленных форм Нгб и его мутантов наименее интенсивные.

Для обработки спектров использовали открытое программное обеспечение Pyraman (версия v0.3.4-beta, <https://github.com/abrazhe/pyraman/releases/tag/v0.3.4-beta>, 13 апреля 2024). С его помощью базовые линии спектров выстраивались вручную и вычитались из интенсивности. Затем спектры нормировались на максимальную суммарную интенсивность, таким образом, нивелировался концентрационный вклад от молекул-репортеров.

Пики на спектрах КР и ГКР характеризуют колебания определенных групп атомов в геме. Нас интересовали в первую очередь параметры, характеризующие изменение конформации гема Цит С (плоская конформация соответствует увеличению функциональной активности Цит С), и изменение белкового микроокружения гема. При акте акцептирования-донирования электрона гем сдвигается в белковой полости примерно на 0.1 Å (Takano and Dickerson, 1980), и микровязкость белкового окружения может влиять на смещения гема, затрудняя его при увеличении плотности упаковки белка.

Для вычисления этих параметров на основе литературных данных и собственных наблюдений нами были выбраны следующие характерные пики ГКР спектра окисленных Цит С: 1126, 1170, 1371 и 1638  $\text{cm}^{-1}$ . Соответственно, 1128, 1168, 1375 и 1638  $\text{cm}^{-1}$  для ГКР спектров окисленных форм Нгб. Для КР спектра восстановленного Цит С выбраны пики: 570, 648, 750, 1127, 1170, 1365, 1586  $\text{cm}^{-1}$ . Для КР спектра восстановленных форм Нгб: 1130, 1168, 1365, 1586  $\text{cm}^{-1}$ .

При этом пики 1371-1375  $\text{cm}^{-1}$  на спектрах окисленных белков и 1365-1368  $\text{cm}^{-1}$  на спектрах восстановленных используются в качестве нормировочных. Эти полосы принадлежат одной моде  $\nu_4$ , но их положение чувствительно к степени окисления гема – их интенсивность, таким образом, отражает вероятность рассеивания фотонов на гемах ( $\text{Fe}^{3+}$ ) или ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Следовательно, нормируя

интенсивности любой исследуемой полосы на интенсивность пика 1365 или 1371  $\text{см}^{-1}$ , мы учитываем вклад степени окисления гема в интенсивность исследуемой полосы.

В Таблице 3 представлены конформационные параметры, используемые в сравнительном анализе гемов мутантных форм Цит С и Нгб разной степени окисления. Параметры, общие для обоих белков в обеих степенях окисления, можно отнести к трем группам: (1) определяющие вероятность колебаний метиновых мостиков, а, следовательно, степень реализации плоской конформации гема (нормированный пик моды  $\nu_{10} - 1638 \text{ см}^{-1}$  на спектрах окисленных гемов и пик моды  $\nu_{19} - 1586-1590 \text{ см}^{-1}$  на спектрах восстановленных гемов. Обе моды связаны с колебаниями групп атомов, включающих мезоуглероды, и интенсивность соответствующих пиков возрастает при более вероятном колебании их связей, то есть при снижении напряжения в макроцикле и более плоской конформации. (2) Параметры, определяющие подвижность пирролов в белковом окружении (нормированный пик 1168-1170  $\text{см}^{-1}$ ). Чем выше это отношение, тем более подвижна конформация гема. (3) Параметры, определяющие вероятность колебаний метильных радикалов (нормированный пик 1126-1128  $\text{см}^{-1}$ ). Чем выше это отношение, тем менее сковывающим гем считается его белковое окружение, тем меньше жесткость белкового окружения.

Для восстановленного Цит С, чей КР спектр богат пиками ввиду более тесных взаимодействий гема и белкового окружения, можно посчитать также дополнительные параметры. Отношение  $I_{570}/I_{748}$  тем выше, чем выше вероятность искаженной конформации гема. Сам пик 570  $\text{см}^{-1}$  принадлежит известной моде  $\nu_{21}$ , для которой было зафиксирована положительная корреляция со степенью искаженной конформации гема. Пик 748  $\text{см}^{-1}$  выбран в качестве нормировочного, поскольку его интенсивность также чувствительна к степени окисления, но в отличие от пика 1365  $\text{см}^{-1}$  он расположен ближе низкочастотной области, и его использование в качестве нормировочного позволяет снизить погрешности, связанные с проведением базовой линии. Другое отношение  $I_{640}/I_{1365}$  характеризует вероятность колебаний тиоэфирной связи между гемом и

цистеинами белкового кора. Падение вероятности этих колебаний говорит о затруднениях сдвига гема в белковой щели.

Сравнение перечисленных параметров конформации гемов между диким типом и мутантными формами Цит С и нейроглобина позволяет предположить, какие аминокислотные замены приводят к существенному снижению плоскостной и неплоскостной лабильности конформации гемов этих белков и, возможно, к затруднению электрон-транспортной функции.

Таблица 3. Отношения интенсивной выбранных пиков на спектрах КР восстановленных Цит С и Нгб и спектрах ГКР окисленных форм Цит С и Нгб, характеризующие конформационные свойства гемов и использованные в данной работе.

Отношения интенсивности пиков на ГКР спектре Цит С(Fe <sup>3+</sup> )	Отношения интенсивности пиков на ГКР спектре Нгб(Fe <sup>3+</sup> )	Описание отношений	Отношения интенсивности пиков на КР спектре Цит С(Fe <sup>2+</sup> )	Отношения интенсивности пиков на КР спектре Нгб(Fe <sup>2+</sup> )	Описание отношений
			$\frac{I(570)}{I(748)} \uparrow$		↑степень искаженной конформации гема
			$\frac{I(640)}{I(1365)} \uparrow$		↑вероятность колебаний С-S связей
			I(748)		Нормировочный пик – колебания связей в геме
$\frac{I(1126)}{I(1371)} \uparrow$	$\frac{I(1128)}{I(1375)} \uparrow$	вероятность колебаний С <sub>β</sub> -СН <sub>3</sub> групп	$\frac{I(1126)}{I(1365)} \uparrow$	$\frac{I(1128)}{I(1368)} \uparrow$	↑вероятность колебаний С <sub>β</sub> -СН <sub>3</sub> групп

$\frac{I(1170)}{I(1371)} \uparrow$	$\frac{I(1168)}{I(1375)} \uparrow$	↑вероятность асимметричных колебаний пиррольных полуколец	$\frac{I(1170)}{I(1365)} \uparrow$	$\frac{I(1168)}{I(1368)} \uparrow$	↑вероятность асимметричных колебания пиррольных полуколец
$I(1371)$	$I(1375)$	Нормировочный пик - симметричные колебания пиррольных полуколец	$I(1365)$	$I(1368)$	Нормировочный пик - симметричные колебания пиррольных полуколец
$\frac{I(1638)}{I(1371)} \uparrow$	$\frac{I(1638)}{I(1375)} \uparrow$	↑вероятность колебаний метиновых мостиков = ↑вероятность плоской конформации	$\frac{I(1590)}{I(1365)} \uparrow$	$\frac{I(1586)}{I(1368)} \uparrow$	↑вероятность колебаний метиновых мостиков = ↑вероятность плоской конформации

#### 2.2.4. Методология регистрации редокс-реакции между Нгб(Fe<sup>2+</sup>) и Цит С(Fe<sup>3+</sup>) и их мутантными формами с помощью РКР-спектроскопии

Как было показано выше, РКР спектроскопия позволяет зарегистрировать характерные пики гемов С и В на спектрах восстановленных Цит С и Нгб. Также хорошо изучены изменения этих спектров при переключении редокс-состояния гемопротеинов. Так, восстановление Цит С(Fe<sup>3+</sup>) сопровождается появлением низкочастотных пиков в области 300-700 см<sup>-1</sup>, увеличением интенсивности пиков 750, 1127, 1313, 1585 см<sup>-1</sup> и снижением интенсивности пика 1638 см<sup>-1</sup> (Brazhe *et al.*, 2012). Окисление Нгб(Fe<sup>2+</sup>), в свою очередь, сопровождается снижением интенсивности пика 1342 см<sup>-1</sup>, также важным отличием является отсутствие низкочастотных пиков на спектре Нгб(Fe<sup>2+</sup>), что позволяет отличить его от Цит С(Fe<sup>2+</sup>) (Kakita *et al.*, 2012). Регистрация этих спектральных изменений при смешивании эквимольных растворов восстановленного Нгб(Fe<sup>2+</sup>) и окисленного Цит С(Fe<sup>3+</sup>)

подтверждает процесс переноса электрона с гема В нейроглобина на гем цитохрома С.

Однако существенным препятствием в этой задаче становится вопрос получения восстановленного нейроглобина. Протокол выделения рекомбинантного нейроглобина сводится к получению его окисленной формы. При этом сам Нгб характеризуется высокими константами автоокисления ( $0,23 \pm 0,03 \text{ мин}^{-1}$ ) (Tiso *et al.*, 2011). Так, применение стандартного восстановителя дитионита натрия приводит к обратному окислению Нгб в течение 10 мин. В то же время, Цит С ( $\text{Fe}^{3+}$ ), вносимый в раствор с восстановленным таким образом Нгб, сам легко восстанавливается остатками дитионита натрия в растворе. Подобный простой протокол неизбежно приводит к ложноположительному результату восстановлению Цит С. Попытка очистить раствор восстановленного Нгб от избытка НАДФН буфером на колонке приводит к быстрому автоокислению Нгб.

Чтобы избежать это препятствие, мы сначала сосредоточились на выборе подходящего метода восстановления Нгб. Среди возможных неферментативных методов мы решили использовать НАДФН в качестве восстановителя. Из исследований восстановления метмиоглобина за счет НАДФН (Koizumi and Duanebrown, 1972) известно, что в аэробных условиях на первом этапе образуется небольшое количества  $\text{H}_2\text{O}_2$  в результате взаимодействия НАДФН с кислородом (предположительно, ЭДТА важен в качестве кофактора). Затем метмиоглобин за счет своей пероксидазной активности окисляет  $\text{H}_2\text{O}_2$ , переходя в восстановленное состояние. Важно, что в результате количество окисленного НАДФН намного превышает эквивалентное количество образующегося оксимиоглобина. Таким образом, в нашем протоколе мы можем использовать относительно более высокую концентрацию НАДФН, для более мягкого, но продолжительного восстановления Нгб по сравнению с эффектом эквивалентного количества дитионита натрия. Цит С также восстанавливается более мягко с помощью НАДФН.

Во-вторых, мы создали следующий протокол для регистрации окислительно-восстановительной реакции между Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) и Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) методом РКР (Ри-

сунок 5). Основная идея заключалась в приготовлении двух типов растворов: в контрольном растворе (КР) мы инициировали восстановление Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) исключительно одним способом – остатками НАДФН, в то время как в опытном растворе (ОР) мы инициировали восстановление Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) двумя способами – с помощью остатков НАДФН и в ходе окислительно-восстановительной реакции с Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ). Последующее сравнение РКР спектров Цит С, восстанавливаемого в контрольном и опытном растворах, позволило выявить спектральные характеристики конформационных изменений гема Цит С, вызванных редокс-реакцией с Нгб. Условия регистрации РКР спектров: длина волны возбуждающего луча 532 нм, объектив x20, время накопления сигнала 1 с.

#### **Приготовление контрольного раствора и регистрация спектров:**

- 1) Навески Нгб( $\text{Fe}^{3+}$ ) и Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) разводятся в натрий-фосфатном 30 мМ буфере с 7 мМ ЭДТА до конечных концентраций по 1мМ;
- 2) 15 мкл 1мМ Нгб помещаются на стеклянное дно чашки Петри, регистрируется РКР спектр Нгб( $\text{Fe}^{3+}$ );
- 3) К этой капле вносится кристаллический НАДФН на конце иглы, регистрируется РКР спектр Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ );
- 4) Вносятся 15 мкл натрий-фосфатного 30 мМ буфера с 7 мМ ЭДТА. В течение следующих 10 мин происходит автоокисление Нгб, регистрируется РКР спектр Нгб( $\text{Fe}^{3+}$ );
- 5) Вносятся 15 мкл ЦитС( $\text{Fe}^{3+}$ ), спустя 1 мин регистрируется РКР спектр ЦитС( $\text{Fe}^{2+}$ )

#### **Приготовление экспериментального раствора и регистрация спектров:**

- 1) Навески Нгб( $\text{Fe}^{3+}$ ) и Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) разводятся в натрий-фосфатном 30 мМ буфере с 7 мМ ЭДТА до конечных концентраций по 1мМ;
- 2) 15 мкл 1мМ Нгб помещаются на стеклянное дно чашки Петри, регистрируется РКР спектр Нгб( $\text{Fe}^{3+}$ );

- 3) К этой капле вносится кристаллический НАДФН на конце иглы. Выжидается время, требовавшееся для автоокисления Нгб в контрольном растворе после внесения буфера. Регистрируется РКР спектр Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ );
- 4) Вносятся 15 мкл Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ), спустя 1 мин регистрируется РКР спектр Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ). При этом мы не регистрируем спектральных признаков восстановленного Нгб.

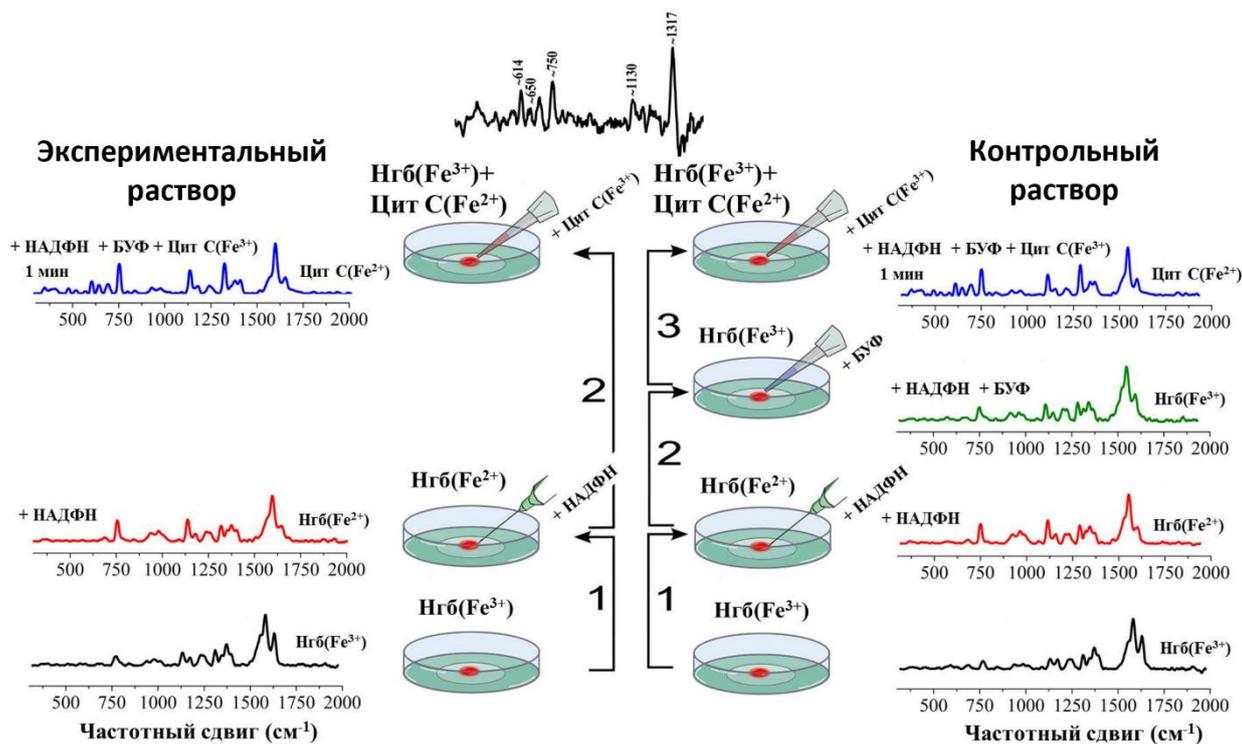


Рисунок 5. Схема протокола регистрации редокс-реакции между Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) и Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ). По бокам схемы изображены КР спектры, снятые на каждом этапе. Приготовление Контрольного раствора включает 3 этапа: (1) восстановление Нгб избытком НАДФН, красный цвет спектра, (2) реокисление Нгб буфером, зеленый цвет спектра, (3) внесение окисленного Цит С и последующее нго восстановление остатками НАДФН, синий цвет спектра. Экспериментальный раствор: (1) восстановление Нгб избытком НАДФН, красный цвет спектра, (2) внесение окисленного Цит С и последующее его восстановление остатками НАДФН и Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ), синий цвет спектра. Разностный спектр с характерными пиками (жирный, черный спектр сверху схемы) получается вычитанием КР спектра восстановленного Цит С Кон-

трольного раствора из соответствующего КР спектра экспериментального раствора.

РКР спектры записывали на каждом этапе приготовления контрольного и экспериментального растворов для проверки выполнения протокола, а РКР спектры, снятые через 1 мин после внесения в растворы Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ), использовали в дальнейшем анализе. Вычитая из нормированного РКР спектра ЦитС( $\text{Fe}^{2+}$ ) экспериментального раствора соответствующий нормированный спектр контрольного раствора, мы получали разностные спектры с набором характерных пиков.

Мы исходим из предположения, что если в обоих растворах – контрольном и экспериментальном — происходит одинаковый процесс восстановления Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) только за счет остатков НАДФН, то разностные спектры не отличались бы от нулевой линии, поскольку при восстановлении низкомолекулярным восстановителем гем Цит С не претерпевает конформационные изменения, происходящие в процессе восстановления за счет переноса электрона на гем от редокс-партнера. Таким образом, отсутствие пиков на разностном спектре можно интерпретировать, как нарушение образования редокс-активных комплексов Нгб/Цит С с переносом электрона.

Характерные пики на разностном спектре говорят об отличиях спектров Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ) экспериментального и контрольного растворов вследствие конформационных изменений, происходящих с гемом цитохрома С при восстановлении за счет образования комплекса с нейроглобином и переноса электрона от нейроглобина на атом железа гема Цит С. В контрольном растворе восстановление цитохрома С является неспецифическим, за счет действия НАДФН, не требующим каких-либо конформационных изменений в геме цит С для акцептирования электрона. Отличия спектров КР цитохрома С, восстановленного за счет Нгб (в экспериментальном растворе) или НАДФН (в контрольном растворе) выражаются в разной интенсивности одних и тех же пиков на спектрах обоих растворов, разной полуширины пиков и смещения положения их максимумов.

Для оценки редокс-активности комплексов, образованных диким типом Нгб(Fe<sup>2+</sup>) и мутантными формами Цит С(Fe<sup>3+</sup>), диким типом Цит С(Fe<sup>3+</sup>) и мутантными формами Нгб(Fe<sup>2+</sup>) или мутантными формами обоих белков, мы готовили экспериментальные и контрольные растворы по описанному выше протоколу и получали разностные спектры для конкретных редокс-пар: Нгб<sub>WT</sub> + Цит С (K25E, K72E, T78S/K79); Нгб (E60K, E87K) + Цит С<sub>WT</sub>; Нгб(E60K) + Цит С(K25E); Нгб(E87K) + Цит С(K72E). Получали по три разностных спектра для каждой пары. Сравнивая разностные спектры этих редокс-пар с разностным спектром для пары диких типов Нгб и Цит С, можно обнаружить отличия в параметре  $d$  для одних и тех же разностных пиков для некоторых пар. Мы предполагаем, что чем лучше разностный спектр «мутантной» редокс-пары воспроизводит разностный спектр «дикой» редокс-пары, тем более вероятно для этой «мутантной» пары нормальное протекание редокс-реакции. И, напротив, чем сильнее разностный спектр мутантной пары отличается от спектра «дикой» пары, и чем больше он похож на нулевую линию, тем более вероятно нарушение переноса электрона в этой «мутантной» редокс-паре. Поэтому необходимо было выработать метод количественного сравнения разностных спектров.

Разностные пики, в отличие от пиков на исходных спектрах, характеризуются «выходом» за нулевую линию в отрицательную область, и их амплитуду не всегда можно посчитать простым вычитанием интенсивностей исходных пиков (Laane and Kiefer, 1981). Каждый разностный пик можно отнести к одному из трех вариантов происхождения:

- 1) При одинаковой полуширине исходных пиков ( $S^A = S^B$ ) и одинаковом положении их максимумов (сдвиг  $\Delta = 0$ ) пики обладают разной интенсивностью ( $I_0^A \neq I_0^B$ ). Тогда параметр ( $d$ ) разностного пика определяется простым вычитанием:  $d = I_0^B - I_0^A$
- 2) При разной полуширине исходных пиков ( $S^A \neq S^B$ ) и одинаковом положении их максимумов (сдвиг  $\Delta = 0$ ) пики обладают разной интенсивностью ( $I_0^A \neq I_0^B$ ). Тогда параметр ( $d$ ) разностного пика

определяется выражением  $d = I_0^B - I_0^A \vee + S^B - S^A \vee \times \left| \frac{I_0^B}{S^B} - \frac{I_0^A}{S^A} \right|$ , которое сводится к выражению (1) если  $(S^A S^B)$ . Выражение выведено методом проб и ошибок на основе аппроксимаций из работы (Laane and Kiefer, 1980) с учетом вклада разницы полуширин исходных пиков в амплитуду разностного пика.

- 3) При разной полуширине исходных пиков ( $S^A \neq S^B$ ) и сдвиге положения их максимумов ( $\Delta \neq 0$ ) пики обладают разной интенсивностью ( $I_0^A \neq I_0^B$ ). Тогда параметр ( $d$ ) разностного пика определяется выражением на основе гауссовой аппроксимации: (Laane and Kiefer, 1980)

$$d = 2,865 \times \frac{(I_0^A + I_0^B)/2 \times \Delta}{(S^A + S^B)/2}$$

Таким образом, вычисляя амплитуду  $d$  каждого разностного пика на каждом разностном спектре по одной из трех перечисленных выше формул, мы получали средние значения амплитуды разностных пиков для «мутантных» редокс-пар и сравнивали со значениями для контрольной (Нгб<sub>WT</sub> + Цит С<sub>WT</sub>) редокс-пары.

Описанные выше эксперименты проводили совместно с м.н.с., асп. Семеновой М.А. и с.н.с., к.б.н. Чертковой Р.В. (ГНЦ ИБХ РАН, лаборатория инженерии белка

## **2.3. ГКР методология для регистрации конформационных изменений гема Цит С интактных митохондрий**

### **2.3.1. Животные: крысы линий WKY и SHR**

Исследования проводились на 15-18 недельных самцах крыс контрольной линии Wistar Kyoto (WKY) с нормальным артериальным давлением и линии Spontaneous Hypertensive rats (SHR) с повышенным артериальным давлением, полученных из Питомника ФИБХ, г. Пущино (Таблица 4). Крысы линии WKY в среднем имели больший вес по сравнению с SHR (на  $24.7 \pm 0.9\%$ ). Гипертензивные крысы SHR характеризовались большим артериальным давлением (на  $33.7 \pm 1\%$ ).

Таблица 4. Физиологические показатели крыс линий WKY и SHR.

Крысы	Вес крысы (г)	Давление (мм.рт.ст.)
SHR	282 ± 3.65	205±3
WKY	367 ± 8.25	136±3

### 2.3.2. Реактивы и оборудование для выделения митохондрий, и проведения ГКР исследований

#### 1) Реактивы для выделения митохондрий:

- Сахарозная среда с ингибиторами протеаз для выделения митохондрий (pH 7.1):
  - Сахароза (342.3 г/моль) — 300 мМ
  - ЭГТА (Sigma) (380.35 г/моль) — 2 мМ
  - ТРИС (Sigma) (121.1 г/моль) — 10 мМ
  - ФМСФ (174.19 г/моль) — 2мМ
  - Апротинин — 10 мкг/мл (pH 7.1)
  
- Буфер для хранения и замораживания митохондрий на основе сахарозы и маннитола, МСТФ (pH 7.1):
  - Маннитол (182.17 г/моль) — 225 мМ
  - Сахароза (342.3 г/моль) — 75 мМ
  - ТРИС (Sigma) (121.1 г/моль) — 20 мМ
  - ЭДТА (Sigma) (372.24 г/моль) — 0.5 мМ
  - Калий фосфорнокислый ( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ) (ЛАБТЕХ) (228.22 г/моль,) — 2 мМ
  - Хлористый кальций (раствор 10%) — 1,5 мМ
  
- Субстраты для питания митохондрий:
  - Сукцинат (270.14 г/моль) — 500 мМ
  - Пируват (110 г/моль) — 200 мМ
  - АДФ (507.2 г/моль, аденозиндифосфат) — 10 мМ
  - Малат (134.09 г/моль) — 200 мМ

- Протонофор СССР в ДМСО —  $10^{-4}$  М
  - Калиевый ионофор валиномицин — конеч. 0,1 мкМ
  - Олигомицин — конеч. 10 мкМ
- 2) Буфер для КР спектроскопии митохондрий:
- Хлористый калий (74.56 г/моль) — 150 мМ
  - ТРИС (Sigma) (121.1 г/моль) — 5 мМ
  - ЭГТА (Sigma) (380.35 г/моль) — 1 мМ
  - Натрий фосфорнокислый ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Serva) (178 г/моль,) — 2 Мм
- 3) Фиксирующий раствор для электронной микроскопии митохондрий:
- 2.5% глутаровый альдегид в фосфатном буфере (рН 7.4)
- 4) Оборудование:
- Спектрофотометр Hitachi, Япония, для определения концентрации белка в митохондриях;
  - Центрифуга Thermo scientific, Heraeus <sup>TM</sup> Labofuge <sup>TM</sup> 400R, Германия;
  - рН-метр рН-410 ЗАО «Аквилон», Россия;
  - КР-микроспектрометр inVia Raman (Renishaw, Великобритания) с лазерным возбуждением 514 нм;
  - Просвечивающий электронный микроскоп JEM-1011 - для анализа препаратов сердечной мышцы.
  - Манометр, для регистрации кровяного давления у крыс.

### 2.3.3. Измерение систолического давления крыс

Для каждой крысы получали около 10 значений систолического артериального давления (САД), которые усредняли и высчитывали стандартную ошибку. Перед началом измерений крыс подвергали тепловому воздействию до появления пульса в хвостовой артерии. САД регистрировали с помощью манометра, фиксируя манжету на основании хвоста, где проходит хвостовая артерия. В манжету

нагнетали воздух до полного прекращения кровотока в хвостовой артерии. Затем давление воздуха в манжете медленно снижали и отмечали значение давления, при котором появлялась пульсовая волна – САД.

#### 2.3.4. Выделение митохондрий и определение общей концентрации белка в суспензии митохондрий

##### 1) Выделение митохондрий

Выделение митохондрий проводилось из сердец крыс. Животное декапитировали, и изолированное сердце помещали в холодный раствор 1,15% KCl (около 50 мл), отмывая от крови. Затем орган измельчали ножницами в сахарозной среде на поверхности охлаждаемой хладагентом чашке Петри до почти гомогенного состояния. Измельчённую ткань переносили в охлаждённый гомогенизатор Поттера и добавляли 6 мл сахарозной среды. Ткань в течение одной минуты гомогенизировали тefлоновым пестиком до получения однородной массы; под конец разбавляли в 6 мл сахарозной среды, и жидкий гомогент переливали в охлаждённую пробирку.

Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g и 4°C. Супернатант аккуратно отбирали и центрифугировали 10 мин при 7000g и 4°C. Плотный осадок митохондрий ресуспендировали в 12 мл сахарозной среды до гомогенного состояния и вновь осаждали 10 мин при 7000g и 4°C. Полученный осадок митохондрий ресуспендировали в 2 мл буфера МСТФ (pH 7.1, 4°C); хранили на льду.

Содержание белка в выделенной фракции митохондрий определяли по методу *Schacterle, G.R. and Pollack, R.L.* (Schacterle and Pollack, 1973).

##### 2) Построение калибровочной прямой для определения концентрации белка

Готовили 6 пробирок по 250 мкл с концентрациями альбумина соответственно 50, 100, 150, 200, 250, 300 мкг/мл. В седьмую пробирки помещали 250 мкл H<sub>2</sub>O.

В каждую пробирку последовательно с интервалом в 30 с. добавляли 250 мкл раствора А (0,05%  $\text{CuSO}_4$ ; 0,1%  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}$ ; 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,5н  $\text{NaOH}$ ). Растворы инкубировали 10 минут при комнатной температуре.

В каждую пробирку последовательно с интервалом в 30 с. добавляли 1 мл раствора Б (раствор Фолина-Чиокальти). Инкубировали 5 минут при 55 °С. После охлаждения на льду до комнатной температуры измеряли оптическую плотность при 650 нм каждой из 6 проб против кюветы сравнения (250 мкл воды + 250 мкл раствора А + 1 мл раствора Б).

Строили калибровочную кривую: зависимость оптической плотности D от концентрации альбумина (мкг/мл).

### 3) Определение содержания белка в митохондриях

Готовили 2 пробы митохондрий, разбавленных дистиллятом в 100 раз для митохондрий почки и в 50 раз для митохондрий сердца. Измерения проводили аналогично протоколу в п.2.

С помощью калибровочной кривой определяли концентрацию белка в суспензии митохондрий. Содержание белка определяли для каждой пробы митохондрий. Среднее значение концентрации белка в митохондриях кардиомиоцитов крыс WKY равно 6.4 мг/мл, для кардиомиоцитов крыс SHR – 6.3 мг/мл. Значения для митохондрий нефронов крыс WKY составляют 13.3 мг/мл, для SHR – 11.8 мг/мл.

## 2.3.5. Измерение активности митохондриального дыхания

### 1) Построение вольт-амперной характеристики

Измерение скорости потребления кислорода в суспензии изолированных митохондрий проводится с помощью кислородного электрода Кларка. Перед проведением измерений электрод откалибровывают, строят вольт-амперную характеристику и определяют примерное значение напряжения на электродах, применяемое при дальнейших измерениях.

Вольт-амперная характеристика электрода – зависимость диффузионного тока от потенциала на электроде. Напряжение на электроде, помещённом в чистую воду, меняли от 25 до 750 мВ, на уровне 600 мВ зависимость тока от напряжения выходит на плато. В районе плато скорость ОВ реакции на платине с кислородом максимальна и ограничивается только скоростью диффузии кислорода к поверхности катода. При установлении фиксированного напряжения в области плато, регистрируемый ток может быть линейно откалиброван на концентрацию растворенного кислорода, которая пропорциональна парциальному давлению кислорода (принимая для чистой воды коэффициент активности равным 1).

## 2) Калибровка электрода

- Чтобы откалибровать электрод, необходимо измерить ток:

1) В отсутствие растворённого кислорода в ячейке с чистой воде, что достигалось длительной продувкой ячейки азотом.

2) при максимальном насыщении раствора кислородом, когда парциальное давление кислорода в растворе равно парциальному давлению кислорода в атмосфере. Чтобы узнать концентрацию кислорода в воде, насыщенной кислородом, используют таблицу растворимости.

Повышение температуры на 1 градус приводит к повышению проницаемости мембраны для кислорода на 5%, поэтому для регистрации корректных значений тока приводят жидкость в ячейке в тепловое равновесие с воздухом

- Калибровочный график строился по двум точкам:

$$0.1 \text{ мкА} - 0 \text{ мкМ O}_2$$

$$15.9 \text{ мкА} - 262.5 \text{ мкМ O}_2$$

Двухточечная калибровочная кривая позволяет переводить регистрируемые значения тока в концентрации растворённого кислорода по формуле:

$$Y = 16.72 \times X - 1.672, \text{ где } Y - \text{концентрация O}_2, \text{ мкМ; } X - \text{ток, мкА.}$$

3) Измерение скорости потребления кислорода митохондриями в различных функциональных состояниях по протоколам (Salabei *et al.*, 2014; Jüllig *et al.*, 2008).

- Измерения проводили при комнатной температуре 23,5°C. В ячейку для измерений помещали буферный раствор MSTP, затем опускали электрод и включали магнитную мешалку. Фиксировали выбранное напряжение 700 мВ. Через 3-4 минуты устанавливалось постоянное значение тока. Митохондрии быстро вносили в ячейку пипеткой. Объем митохондрий подбирали таким образом, чтобы конечная концентрация белка в ячейке составляла 0.1 мг/мл.
- Измеряли дыхательные активности митохондрий при различных функциональных состояниях митохондрий. Состояния моделировали последовательным внесением субстратов, активирующих работу комплексов ЭТЦ. Сначала в кювету добавляли субстраты дыхания для запуска совместной работы комплексов I и II: 17.4 мкл 200 мМ раствора пирувата, 17.4 мкл 200 мМ раствора малата до конечных концентраций 2 мМ, 17.4 мкл 500 мМ сукцината до конечной концентрации 5 мМ. Вслед за тем вносили объем митохондрий (54 мкл – для митохондрий почки, 87 – для митохондрий сердца) и 17.4 мкл 10 мМ АДФ. Регистрировали дыхание митохондрий в состоянии, аналогичном состоянию 3 по Чансу.
- Для разобщения электронного транспорта и синтеза АТФ добавляли 17.4 мкл  $10^{-4}$ М раствора СССР (до конечной концентрации  $10^{-6}$  М).

4) Расчёт скорости потребления кислорода:

- Скорость потребления кислорода рассчитывалась в мкМ кислорода/мг белка/мин. Токовые значения (мкА), полученные с помощью полярографа переводились в концентрационные (мкМ) по калибровочному уравнению  $Y = 16.72 * X - 1.672$ , строились графики зависимости концентрации кислорода от времени.
- С помощью этих графиков рассчитывались скорости дыхания в мкМ/с,

как наклоны разных участков кривых, соответствующих отдельным функциональным состояниям митохондрий. Далее скорости нормировались по массе белка – мкМ/мг/с и переводились в мкМ/мг/мин.

### 2.3.6. Исследование конформационных изменений гема Цит С в интактных митохондриях

Разбавленную в буфере КР суспензию изолированных митохондрий помещали на поверхность серебряных наноструктур и регистрировали спектры ГКР при возбуждении лазером 514 нм на КР-микроспектрометре *inVia Raman*. Разведение суспензии митохондрий делали таким образом, чтобы конечная концентрация общего белка в пробе была 2-3 мг/мл. Для модуляции функциональных состояний митохондрий в их разбавленную суспензию добавляли субстраты дыхания и АДФ.

Сначала стимулировали активную работу ЭТЦ за счёт активации комплексов I и II. Для этого в суспензию митохондрий вносили растворы пирувата (200 мМ) и малата (200 мМ) до конечных концентраций в 2 мМ, раствор сукцината (500 мМ) до конечной концентрации в 5 мМ, и АДФ (10 мМ) до конечной концентрации 100 мкМ. Пируват, малат и сукцинат являются субстратами цикла Кребса и запускают его работу. Один из его продуктов, НАДН, поставляет электроны на комплекс I ЭТЦ, а сукцинат, участник цикла Кребса, окисляется комплексом II. АДФ активирует работу АТФ-синтазы, которая в процессе синтеза АТФ переносит протоны из межмембранного пространства в матрикс, снижая протонный градиент на ВММ, тем самым ускоряя электронный транспорт по ЭТЦ. Таким образом, внесение смеси малата, пирувата, сукцината и АДФ приводила к моделированию активного фосфорилирующего состояния, при котором скорость дыхания ограничивается скоростью проникновения субстратов в митохондрии и мощностью комплексов ЭТЦ. Спектры ГКР снимали после внесения малата, сукцината, пирувата и АДФ. Затем к суспензии митохондрий с субстратами дыхания и АДФ вносили протонофор СССР до конечной концентрации  $10^{-6}$  М. СССР встраивается во ВММ и нивелирует протонный градиент на мембране, что приводит к разоб-

щению работы ЭТЦ и синтеза АТФ, и в норме вызывает резкое ускорению транспорта электронов в ЭТЦ и увеличение поглощения  $O_2$ . Спектры ГКР снимали через 2-3 мин после добавления СССР.

Для каждого функционального состояния митохондрий снимали несколько спектров: через 2-3 мин после внесения пальмитоилкарнитина, малата и АДФ, затем — после внесения СССР.

При используемом разведении митохондрий мы не регистрировали спектры от митохондрий, не находящихся в контакте с серебряными наноструктурами вследствие крайне низкой интенсивности их КР-спектра, рассеяние света на самих наноструктурах также не вносило пики в ГКР-спектры митохондрий. Полученные спектры суспензии митохондрий соответствовали спектрам окисленного Цит С. Спектры обрабатывали, вычитая из них базовую линию с использованием программного обеспечения Rугаmap и нормируя на суммарную интенсивность. Эксперименты проводили совместно с Никельшпарг Э.И.

## **2.4. КР спектроскопия интактных сердец крыс**

### **2.4.1. Животные: крысы линии Sprague Dawley**

В исследовании использовали самцов крыс линии Sprague Dawley весом 300-350 г. После анестезирования животного выполнялась торакотомия, и извлеченное сердце присоединялось к перфузионной системе через аорту. Для проведения работы было получено разрешение Инспекции по экспериментам на животных Министерства юстиции Дании.

### **2.4.2. Реагенты и оборудование для извлечения и перфузирования сердец**

- 1) Реагтивы для анестезии крыс (отношение 1:1:2):
  - Смесь Фентанил/Флуанизон (1 часть)
  - Мидазолам (1 часть)
  - Дисциллированная вода (2 части)
- 2) Реагтивы для извлечения и перфузии сердец:
  - Гепарин (1000 МЕ/кг)

- Раствор Рингера-Тироде, pH 7.4:
  - NaCl — 140 mM,
  - KCl — 5,4 mM,
  - HEPES (PanEco) — 5 mM,
  - MgCl<sub>2</sub> — 1 mM,
  - CaCl<sub>2</sub> — 1 mM
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 1 mM,
  - D-глюкоза — 10 mM,

### 3) Оборудование:

- Перфузионная система:
  - Перистальтический насос (Biolab Ismatec) с буферным резервуаром и аортальной канюлей
- Конфокальный рамановский микроспектрометр InVia с дополнением для макро-исследований (Renishaw, Великобритания)

#### 2.4.3. Выделение и перфузия сердец крыс

Крысе подкожно вводили раствор для анестезии 0.2 мл на 100 г. массы тела, затем вводили гепарин (1000 МЕ/кг) через бедренную вену для предотвращения сворачивания крови при вскрытии. Вскрывали грудную клетку крысы, сердце извлекали и помещали в ледяной раствор Рингера-Тироде на чашке Петри. Затем сердце присоединяли к перфузионной установке через аортальную канюлю так, что сердце оказывалось подвешенным, а в аорту из буферного резервуара осуществлялся ток теплого (37°C) кальций-содержащего буфера Рингера-Тироде, который оксигенировали с использованием газовой смеси 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Ретроградная перфузия сердца начиналась спустя 3 минуты после извлечения сердца со скоростью 10-12 мл/мин. В этих условиях наблюдалась регулярная сократительная активность сердца. Для того, чтобы было возможно зарегистрировать КР спектры с поверхности сердца, его перфузировали аналогичным буфером, содержащим ингибитор скорачиваний BDM (Sigma) (в конечной концентрации 1 mM) и дожидались прекращения сократительной активности.

#### 2.4.4. Индуцирование ишемии изолированных сердец

Длительную ишемию (гипоксию) вызывали остановкой перфузии сердца кислородным буфером на 60 мин, короткую ишемию — остановкой перфузии сердца на 20 мин. Гипоксическое preconditionирование (ГПК) сердец обеспечивали за счет трех коротких пятиминутных гипоксических интервалов, перемежающихся пятиминутными периодами перфузии сердца оксигенированным раствором, перед длительной 60-ти минутной гипоксией. В экспериментах использовали 4 группы сердец: группы сердец, подверженных одному из этих трех типов гипоксии: короткой, длительной и длительной после ГПК и контрольная группа сердец, перфузированных в течение 2 часов — примерной длительности экспериментов на сердцах с длительной гипоксией и длительной гипоксией с ГПК.

#### 2.4.5. Регистрация КР-спектров от сердец

КР-спектры регистрировали с эпикардальной поверхности левого желудочка с помощью рамановского микроспектрометра InVia (Renishaw, Великобритания) и с использованием длины волны возбуждения 532 нм. Фокусное расстояние составляло 60 мм, мощность лазера — 3 мВт на область регистрации сигнала диаметром 40 мм. КР спектры регистрировали перед гипоксическим воздействием, на 20-ой, 40-ой и 60-ой минутах ишемии, а также на 1-ой, 6-ой, 9-ой, 15-ой и 30-ой минутах после реперфузии. Время накопления сигнала для каждого КР спектра составляло 5 мин во всех случаях, кроме 1, 6 и 9-ой минут реперфузии, когда время накопления спектра составляло 90 с.

#### 2.4.6. Анализ КР спектров сердца

КР спектры были проанализированы с помощью программного обеспечения Rугаman. Из каждого КР спектра была вычтена базовая линия. Мы определили интенсивности пиков со следующими положениями максимумов: 570 (на некоторых спектрах), 750, 1127, 1358 и 1377, 1587, 1640  $\text{см}^{-1}$ . Интенсивность пика 570  $\text{см}^{-1}$  тем выше, чем более искаженную конформацию принимает гем Цит С. Большое искажение гема связано со сниженной способностью принимать и отда-

вать электроны (Sun *et al.*, 2014). Пики 750 и 1126  $\text{см}^{-1}$  преимущественно соответствуют колебаниям связей гемов цитохромов С и В-типа соответственно, хотя присутствуют на КР спектрах обоих гемов. Пик 1000  $\text{см}^{-1}$  соответствует колебаниям аминокислотного остатка фенилаланина. Пики 1358 и 1377  $\text{см}^{-1}$  – относятся к колебаниям связей гемов дезоксимиоглобина и оксимиоглобина, соответственно, а пики 1587 и 1640  $\text{см}^{-1}$  соответствуют колебаниям метиновых мостиков порфиринового макрокольца.

Следует учитывать, что на КР спектрах клеток и тканей видны пики только от восстановленных цитохромов, так как интенсивность их КР сигнала в несколько раз больше, чем от окисленных цитохромов (Ogawa *et al.*, 2009). Для оценки редокс-состояния цитохромов сердца, оценки относительного содержания оксимиоглобина в нормальных и ишемических условиях, динамики редокс-состояния цитохромов, содержания оксимиоглобина и изменения степени искажения конформации гема Цит С при реперфузии, были использованы следующие соотношения интенсивностей КР пиков (Таблица 5).

Таблица 5. Спектральные параметры, характеризующие относительное содержание восстановленных цитохромов С и В типа в сердце, а также степень искаженной конформации гема Цит С и относительное содержание оксимиоглобина.

Параметры КР спектров кардиомиоцитов	Описание
$\frac{I(750)}{I(1000)}$	относительное количество восстановленных цитохромов С-типа, нормализованное на содержание фенилаланина
$\frac{I(1127)}{I(1000)}$	относительное количество восстановленных цитохромов В-типа, нормализованное на со-

	держание фенилаланина
$\frac{I(570)}{I(750)}$	Относительное содержание Цит С с гемом в искаженной конформации
$\frac{I(1377)}{I(1358) + I(1377)}$	Содержание оксимиоглобина относительно суммарного количества дезокси- и оксимиоглобина

## 2.5. Мониторинг уровня синтеза $H_2O_2$ в зрелых кардиомиоцитах крыс в условиях кислородно-глюкозной депривации и последующей реперфузии с preconditionированием и без него

### 2.5.1. Выделение и трансдукция зрелых кардиомиоцитов

Выделение кардиомиоцитов из сердец взрослых крыс проводили по модифицированному протоколу (Alam et al., 2020). Извлеченное сердце промывали в растворах, не содержащих кальция и перфузировали растворами ферментов (коллагеназа II типа и протеаза XIV типа) на установке Лангендорфа в течение 30-40 минут при температуре 37 °С. Далее желудочки сердца отделяли, механически измельчали и пропускали через сеточку с диаметром ячеек 100 мкм. Гомогенат отмывали от оставшихся форменных элементов крови и погибших клеток в кальций-содержащем растворе. В полученной суспензии клеток устанавливали процент жизнеспособных морфологически нормальных кардиомиоцитов при помощи окрашивания трипановым синим. Выделенные клетки высаживали на чашки со стеклянным дном, предварительно покрытые ламинином. На следующий день проводили трансдукцию клеток аденоассоциированными вирусными частицами 9 серотипа ( $10^4$  частиц на клетку). Частицы содержали ген флуоресцентного биосенсора *HyPer7* на  $H_2O_2$  с сигнальной последовательностью, направляющей в митохондрии (*HyPer7-mito*), под *cTnT* промотором, обеспечивающим экспрессию конструкции именно в кардиомиоцитах. Эксперименты проводили на 5-е сутки после трансдукции.

### 2.5.2. Моделирование условий кислородно-глюкозной депривации с гипоксическим прекондиционированием и без

Для моделирования условий была использована проточная система, позволяющая быстро переключать растворы, протекающие через чашку с осажденными клетками: оксигенированный контрольный раствор Тироде, содержащий глюкозу (5 мМ), и лишенный глюкозы гипоксический раствор Тироде, который продували азотом для вытеснения кислорода. Эксперименты с ГПК проводили по следующей схеме: 1) при пропускании через систему оксигенированного раствора Тироде в течение 10 минут записывали базовые значения сигнала флуоресцентного сенсора HyPer7-mito, 2) далее в течение 5 минут через систему прогоняли гипоксический раствор Тироде, 3) затем через клетки снова пропускали оксигенированный раствор с глюкозой в течение еще 5 минут. Протокол проводили 3 раза, после чего клетки подвергали кислородно-глюкозной депривации в гипоксическом растворе Тироде в течение 35 минут с последующей реоксигенацией в течение 15 минут. В экспериментах без ГПК записывали базовое значение сигнала сенсора в клетках, затем подвергали их длительной гипоксии (35 мин) и последующей реоксигенации (15 мин). В конце каждого эксперимента поток растворов через систему останавливали, и к клеткам добавляли пероксид водорода в конечной концентрации 200 мкМ для оценки чувствительности сенсора.

### 2.5.3. Измерение сигнала флуоресцентного биосенсора на содержание $H_2O_2$ в зрелых кардиомиоцитах в условиях гипоксии/реоксигенации

Регистрацию сигнала сенсора HyPer7-mito проводили *in vivo* при помощи флуоресцентного микроскопа Olympus Fluoview FV3000 (Olympus, Токио, Япония). Также использовали фильтры DAPI/FITC/Cy3/Cy5 Quad smb LED Set для двух областей возбуждения флуоресценции: ( $\lambda_{ex}$ =370-420 нм для окисленного и  $\lambda_{ex}$ =447-503 нм восстановленного HyPer7-mito) и области регистрации флуоресценции: ( $\lambda_{em}$ =495-527 нм для обеих форм сенсора). Время накопления сигнала 200 мс, а интенсивность диода - 11% для обеих длин волн возбуждения. Полученные изображения обрабатывали в программе ImageJ, дальнейшие расчеты

проводили в программе OriginPro 8.5. Содержание  $H_2O_2$  в матриксе митохондрий оценивали по отношению интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм HyPer7-mito (параметр  $F_{470}/F_{395}$ ).

Все эксперименты с первичной культурой кардиомиоцитов проводили совместно с к.б.н., с.н.с. кафедры биохимии биологического факультета МГУ Храмовой Ю.В.

Все эксперименты с животными (получение митохондрий, первичных культур кардиомиоцитов крыс и изолированных сердец крыс) были одобрены Комитетом по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол №82-О, от 08.06.2017 )

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ и ОБСУЖДЕНИЯ

#### 3.1. Исследование конформационных свойств гемов цитохрома С и нейроглобина при внесении аминокислотных замен в контактных поверхностях и $\Omega$ -петле гема

##### 3.1.1. Ключевые характеристики спектров комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния диких форм цитохрома С и нейроглобина

Цит С и Нгб – редокс-партнеры, образующие комплекс с последующим переносом электрона от Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) к Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ). Реакция происходит в цитозоле клетки при выходе восстановленного Цит С из митохондрий в ходе начальных стадий апоптоза при патологических состояниях клетки или в результате базовой «утечки» Цит С из митохондрий. Контактная поверхность, или сайт связывания, Нгб заряжена преимущественно отрицательно, а универсальный сайт связывания Цит С – положительно. Основные силы, приводящие к сближению и ориентации редокс-партнеров – электростатические, причем комплекс образуется независимо от степени окисления гемов (Semenova M., 2023).

КР спектры окисленных и восстановленных Цит С и Нгб представляют собой спектры гемов С и В соответственно. Пики на спектрах КР связаны с определенными колебательными модами групп атомов, причем большинство из этих мод колебаний представлены в спектрах КР обоих белков Цит С и Нгб, независимо от их окислительно-восстановительного состояния (Рисунок 6). Пик с положением максимума  $748 \text{ см}^{-1}$  обусловлен колебательной модой  $\nu_{15}$  всех связей пиррольных колец гема (Hu *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014; Pätzold *et al.*, 2008). Пики с положениями максимумов  $1126\text{-}1128 \text{ см}^{-1}$  соответствуют колебательной моде  $\nu_{14}$  радикалов  $\text{C}_\beta\text{-CH}_3$  (Hu *et al.*, 1993; Brazhe *et al.*, 2012). Пики  $1168\text{-}1170 \text{ см}^{-1}$  относятся к плоским асимметричным колебаниям пиррольных полуколец моды  $\nu_{30}$  (Hu *et al.*, 1993; Delfino *et al.*, 2005). Пики  $1365\text{-}1368 \text{ см}^{-1}$  на спектрах Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ) и Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) и  $1371\text{-}1375 \text{ см}^{-1}$  на спектрах Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) и Нгб( $\text{Fe}^{3+}$ ) обусловлены одной и той же модой  $\nu_4$ , которая чувствительна к окислительно-восстановительному состоянию гема и является хорошо изученной модой

плоскостного «дыхания пирролов». (Hu *et al.*, 1993; Jordan *et al.*, 1995; Berezna *et al.*, 2003; Jentzen *et al.*, 1995; Delfino *et al.*, 2005). Пики высокочастотной области – 1586-1590  $\text{cm}^{-1}$  (мода  $\nu_{19}$ ), 1638  $\text{cm}^{-1}$  (мода  $\nu_{10}$ ) связаны с колебаниями метиновых мостиков между пиррольными кольцами: асимметричными колебаниями  $\text{C}_a\text{C}_m$ ,  $\text{C}_a\text{C}_m\text{H}$  (Hu *et al.*, 1993; Jordan *et al.*, 1995; Berezna *et al.*, 2003; Delfino *et al.*, 2005). Пик 1638  $\text{cm}^{-1}$  чувствителен к редокс-состоянию гемов С и В. Его интенсивность падает при восстановлении гемов, а сам он смещается в низкочастотную область на КР спектрах Цит  $\text{C}(\text{Fe}^{2+})$  и сливается с более интенсивным пиком 1590  $\text{cm}^{-1}$  (Kakita *et al.*, 2012). При этом, колебания метиновых мостиков и интенсивности соответствующих пиков в 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) интенсивности пиков с положениями максимумов 1638 и 1586  $\text{cm}^{-1}$  (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 1371-1375  $\text{cm}^{-1}$  (для окисленных гемов), 1365-1368  $\text{cm}^{-1}$  (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). КР спектры гемов С и В обладают собственными характерными пиками, которые позволяют отличать их друг от друга. Так, пик 1313  $\text{cm}^{-1}$  появляется только на КР спектрах гема С как в окисленном, так и в восстановленном состояниях и связан с колебаниями мезоуглеродов  $\text{C}_m\text{H}$  (Hu *et al.*, 1993; Delfino *et al.*, 2005; Pätzold *et al.*, 2008; Adar and Erecinska, 1977). На спектрах Цит  $\text{C}(\text{Fe}^{2+})$  присутствуют несколько низкочастотных пиков: 610, 648, 690  $\text{cm}^{-1}$ , в то время как на спектрах Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) они отсутствуют. Пик 610  $\text{cm}^{-1}$  соответствует колебаниям связей пирролов при плоской деформации  $\nu_{48}$ , (Spiro, 1985; Hu *et al.*, 1993), в то время как пики 648 и 690  $\text{cm}^{-1}$  являются пиками смешанной природы, которые, как известно, связаны с колебаниями изгибания связи С-S между цистеинами белка и гемом С, а также чувствительны к симметричным

колебаниям пиррольных колец (Hu *et al.*, 1993; Jordan *et al.*, 1995; Berezna *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2014; Rygula *et al.*, 2013). Характерными пиками на КР и ГКР спектрах Нгб являются  $1306\text{ см}^{-1}$  и  $1342\text{ см}^{-1}$ , причем последний пик значительно возрастает при восстановлении гема В и почти не виден в окисленном состоянии гема. (Adar and Erecinska, 1977; Ogawa *et al.*, 2009; Kakita *et al.*, 2012).

Окислительно-восстановительное состояние гемопротеинов влияет не только на проявление определенных пиков в спектре комбинационного рассеяния, но и на общую интенсивность спектров (Adar and Erecinska, 1977; Kakita *et al.*, 2012; Brazhe *et al.*, 2012). Так, спектры восстановленных Цит С и Нгб как минимум на порядок интенсивнее спектров окисленных Цит С и Нгб. В результате спектры КР смесей, а которых есть как окисленные, так и восстановленные формы Цит С и Нгб, содержат пики только от полностью восстановленных белков.

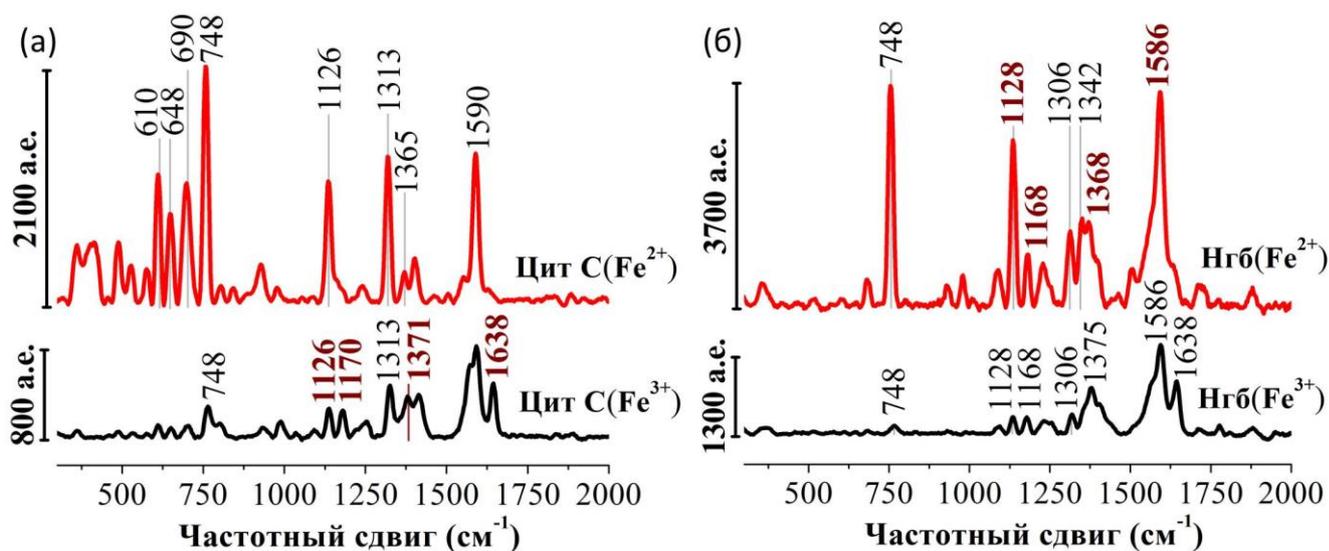


Рисунок 6. (а) КР спектр окисленного Цит С (1 мМ)(черная линия) и восстановленного Цит С(1 мМ)(красная линия) (б) КР спектр окисленного Нгб (1 мМ)(черная линия) и восстановленного Нгб(1 мМ)(красная линия) с подписанными максимумами ключевых пиков. Каждый спектр – результат усреднения по 5 измерениям. Вертикальные шкалы представлены в абсолютных единицах. Для лучшего представления спектры смещены по вертикали один над другим. Оси X соответствуют частотному сдвигу, который показан в  $\text{см}^{-1}$ . Темно-красным цветом выделены положения максимумов на спектре Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) и Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ), кото-

рые в дальнейшем используются для расчёта конформационных параметров гемов диких типов и мутантных форм белков.

### 3.1.2. Белковые и гемовые отличия мутантных форм нейроглобина с аминокислотными заменами в сайте связывания

Для оценки влияния белкового окружения на конформацию гемов Цит С и нейроглобина и доказательства принципиальной роли конформационной подвижности гемов в акте донирования-акцептирования электрона, нами были получены мутантные варианты Нгб (E60K, E87K) и Цит С (K25E, K72E) с заменами в контактных поверхностях. Согласно некоторым исследованиям (Tejero, 2020; Vønding *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2015), Glu60 и Glu87 (Нгб) участвуют в электростатических взаимодействиях с остатками Lys72 и Lys 25 (Цит С) соответственно. Эти аминокислотные замены вызывают локальное изменение поверхностного заряда белковой глобулы на противоположный по знаку (Рисунок 7(а)). Предположительно, такие аминокислотные замены вызывают разрушение электростатических связей между Нгб и Цит С, что может привести к нарушению образования функционального комплекса и невозможности переноса электрона на Цит С. Примечательно, что аминокислота Glu60 нейроглобина, в отличие от Glu87, связана с одним из пропионатов гема через молекулу H<sub>2</sub>O (Рисунок 7(б)) (Guimarães *et al.*, 2014). Следовательно, замена этой аминокислоты может повлиять и на конформацию гема Нгб. С другой стороны, мутант Цит С K25E содержит аминокислотную замену в белковой петле Ω1. Известно, что фрагмент этой петли из 21-25 остатков является динамичным и претерпевает быстрые конформационные изменения, перемещаясь к поверхности цитохрома С<sub>1</sub> в течение первых 0,5–5 нс взаимодействия Цит С с комплексом III (Kokhan *et al.*, 2010). Можно предположить, что аминокислотная замена в этом участке нарушит взаимодействия с сайтом связывания нейроглобина.

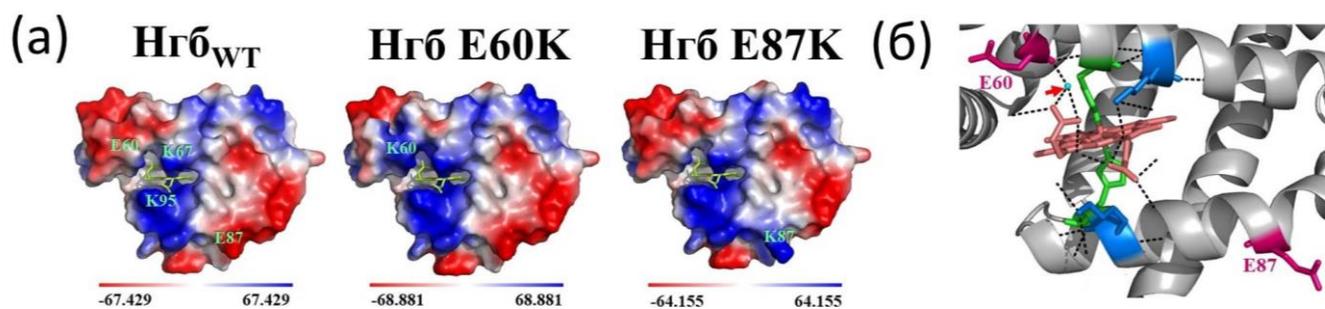


Рисунок 7. (а) Электростатические поверхности Hgb<sub>WT</sub> (ID PDB: 4 MPM) и его мутантных вариантов. Электростатический потенциал показан в соответствии с красно-синей шкалой (кТ/е), гем изображен зелеными линиями. (б) Показано положение сайтов, по которым производили аминокислотные замены в белковом микроокружении гема Hgb (плоская структура розового оттенка). Водородные связи, образованные этими аминокислотными остатками и гемом, показаны черными пунктирными линиями. Красная стрелка указывает на молекулу воды, которая соединяет Glu60 и гем Ngb. Аксиальные лиганды гема изображены зелеными линиями (His96 и His64). Изображения получены с помощью программы PyMOL.

Для регистрации низкоинтенсивных КР спектров окисленных мутантных форм Hgb (E60K, E87K) и Цит С (K72E, K25E, T78S/K79) была использована спектроскопия ГКР с серебряными плазмонными наноструктурами, усиливающими КР гемов окисленных белков при их близком расположении от поверхности наноструктур. На рисунке 8(а) представлены нормированные ГКР спектры окисленных мутантных форм нейроглобина, на рисунке 8(б) – КР спектры восстановленных форм. Видно, что наличие и положение всех основных пиков не меняется по сравнению со спектрами КР и ГКР дикого типа Hgb, значит, вследствие аминокислотных замен в сайте связывания не происходит нарушения порфириновой структуры гема, однако видны некоторые отличия в интенсивностях спектральных полос. Более информативным является сравнение относительных интенсивностей ключевых пиков (положения максимумов выделены жирным шрифтом).

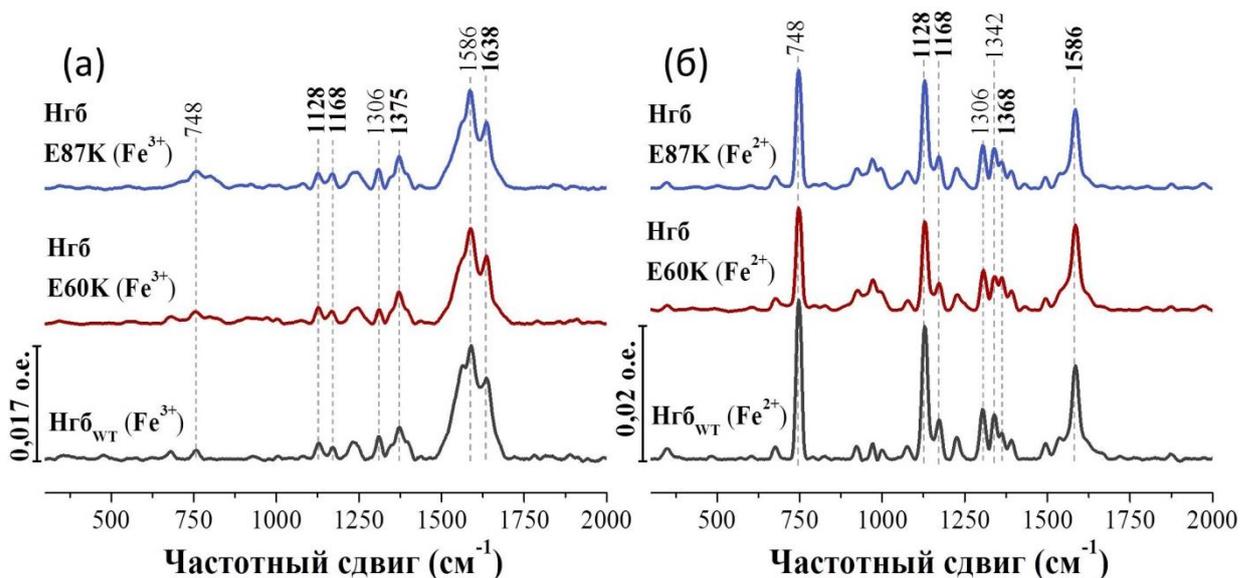


Рисунок 8. (а) ГКР спектры окисленных форм Нгб (0.25 мМ) и (б) КР спектры восстановленных вариантов Нгб (1мМ): дикий тип Нгб (черная линия), Нгб Е60К (красная линия) и Нгб Е87К (синяя линия). Каждый спектр – результат усреднения по пяти измерениям. Все спектры нормированы на сумму их интенсивностей во всем спектральном диапазоне. Вертикальные шкалы соответствуют 0,017 и 0,02 отн.ед. Для лучшего представления спектры смещены по вертикали один над другим. Пунктирными линиями показаны положения максимумов наиболее интенсивных пиков, жирным шрифтом выделены пики, используемые при анализе конформационных изменений.

Отношения интенсивностей ключевых пиков, характеризующие конформации гемов, представлен на рисунке 9. Для окисленных форм Нгб (Е60К и Е87К) параметр  $I_{1638}/I_{1375}$  достоверно ниже по сравнению со значением для дикого типа (Рисунок 9(а)). Поскольку интенсивность пика  $1638\text{ см}^{-1}$  (колебание метиновых мостиков) чувствительна к искажению гема, это отношение определяет вероятность плоской конформации гема – чем оно выше, тем выше вероятность плоской конформации гема. Таким образом, гемы обоих мутантов окисленного Нгб демонстрируют снижение вероятности плоской конформации. Для двух других параметров:  $I_{1168}/I_{1375}$ , который определяет вероятность колебаний связей пиррольных колец ( $C_{\alpha}C_{\beta}$ ,  $C_{\alpha}N$  группы) (Рисунок 9(б)) и, следовательно, степень подвиж-

ности пирролов и для  $I_{1128}/I_{1375}$ , который определяет вероятность колебаний метильных радикалов гема ( $C_{\beta}-CH_3$  группы) и, соответственно, жесткость белкового микроокружения (Рисунок 9(в)), достоверной разности между мутантами Нгб и диким типом обнаружено не было.

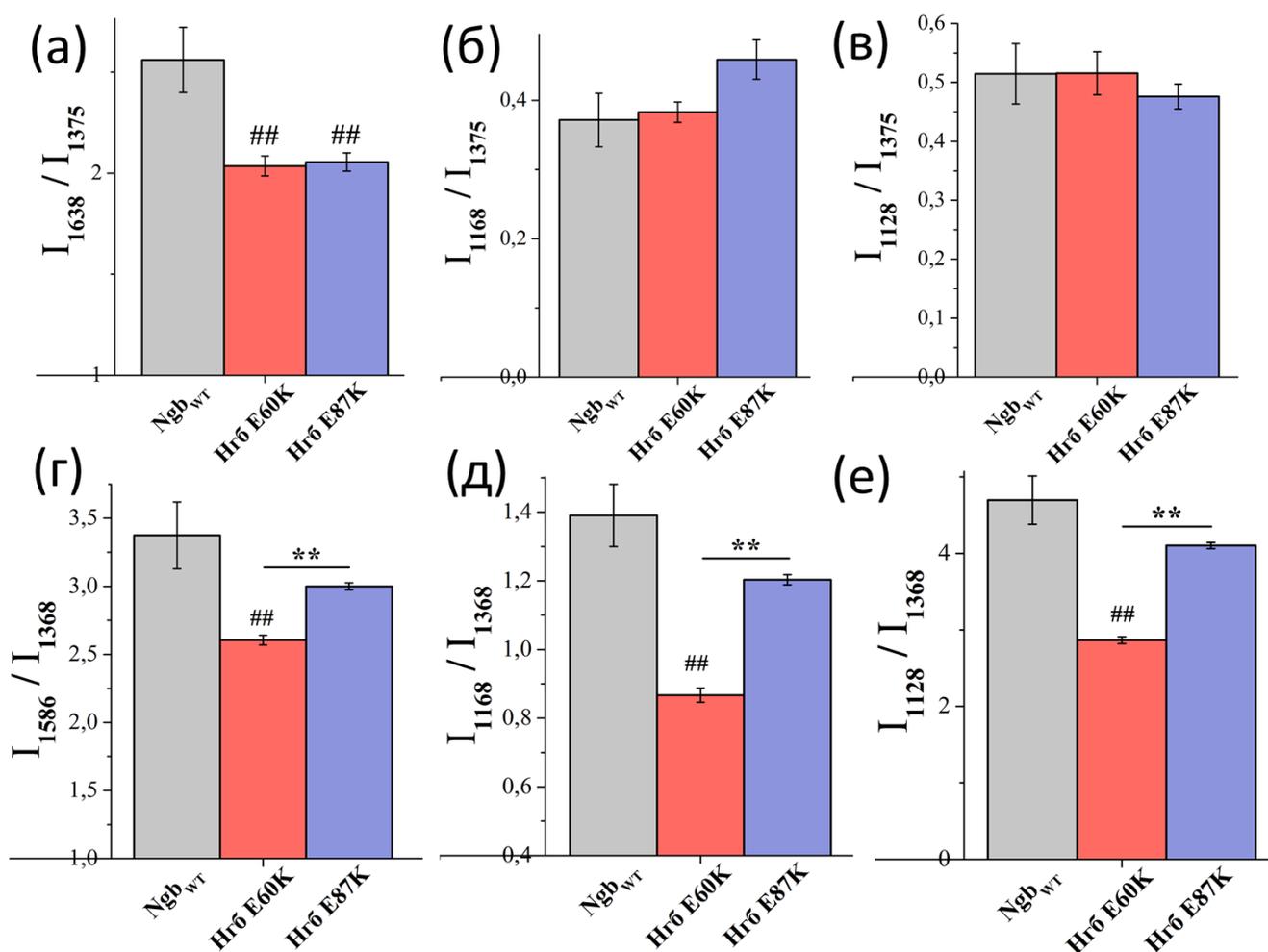


Рисунок 9. Конформационные параметры, посчитанные на основе ГКР спектров окисленных форм Нгб и его мутантов (а, б, в) и КР спектров восстановленных форм Нгб (г, д, е). Параметры  $I_{1638}/I_{1375}$  (а) и  $I_{1586}/I_{1368}$  (г) характеризуют вероятность плоской конформации гема в окисленной и восстановленной форме соответственно. Параметры  $I_{1168}/I_{1375}$  (б) и  $I_{1168}/I_{1368}$  (д) характеризуют вероятность ассиметричных колебаний пиррольных полуколец гема в окисленной и восстановленной формах. Параметры  $I_{1128}/I_{1375}$  и  $I_{1128}/I_{1368}$  характеризуют вероятность колебаний метильных радикалов гема в окисленной и восстановленной формах и, следовательно, описывают жесткость белкового микроокружения гема. Данные

представлены в виде средних значений и ошибки среднего, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  для мутантов Нгб по сравнению с Нгб<sub>WT</sub>, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  для различных мутантов Нгб, по сравнению друг с другом (непараметрический тест Манна–Уитни),  $n = 5$ .

Однако нас, в первую очередь, интересуют конформационные параметры гемов мутантных форм Нгб в восстановленном состоянии, так как именно Нгб(Fe<sup>2+</sup>) участвует в редокс-реакции с Цит С. Так как пик 1638 см<sup>-1</sup> на спектрах Нгб(Fe<sup>2+</sup>) отсутствует, то можно использовать соседний пик 1586 см<sup>-1</sup>, который также соответствует колебаниям метиновых мостиков и также является чувствительным к степени внеплоскостного искажения гема. Обнаружено, что для восстановленного мутанта Нгб Е60К вероятность плоской конформации гема, подвижность пирролов и вероятность колебания метильных радикалов достоверно снижены по сравнению с диким типом и Нгб Е87К (Рисунок 9(г-е)). Для мутанта Нгб Е60К можно предположить не только нарушение конформации и подвижности гема, но и изменение его ориентации, так как остаток Lys60 соединен водородной связью с гемом через молекулу воды, и замена этой аминокислоты на глутамат не только меняет локальное электростатическое поле, но и разрушает эту связь. На основании полученных данных мы предполагаем, что мутант Нгб Е60К может претерпевать нарушение донорно-акцепторного взаимодействия в комплексе с Цит С. Вероятность плоской конформации, подвижность пирролов, жесткость белкового окружения гема Нгб Е87К в восстановленном состоянии не отличаются от аналогичных параметров для гема дикого типа Нгб. Эти результаты могут быть объяснены тем фактом, что остаток Glu87 не контактирует с гемом в отличие от остатка Glu60 и, следовательно, аминокислотная замена в области Е87 практически не влияет на конформацию гема.

### 3.1.3. Белковые и гемовые отличия форм цитохрома С с аминокислотными заменами в сайте связывания и Ω-петле

По аналогии с заменами в контактной поверхности Нгб, в универсальном

сайте связывания Цит С были проведены замены аминокислот на противоположно заряженные. Положительно заряженные Lys25 и Lys72 заменили на отрицательно заряженные глутаматы. Изменение локального электростатического потенциала поверхности в сайте связывания этих мутантов изображено на рисунке 10. Оба Lys остатка известны в качестве потенциальных аминокислот, взаимодействующих с аминокислотами сайта связывания Нгб (Tejero, 2020; Vønding *et al.*, 2008; Guidolin *et al.*, 2014). Кроме того, в этой работе мы использовали мутант Цит С с двумя заменами в  $\Omega$ -петле, содержащей аксиальный лиганд гема Met80 – Цит С T78S/K79, для которого установлено значительное ухудшению активности переноса электронов с III комплекса ЭТЦ на Цит С T78S/K79 и с Цит С T78S/K79 на комплекс IV (Chertkova *et al.*, 2017; Chertkova *et al.*, 2021).

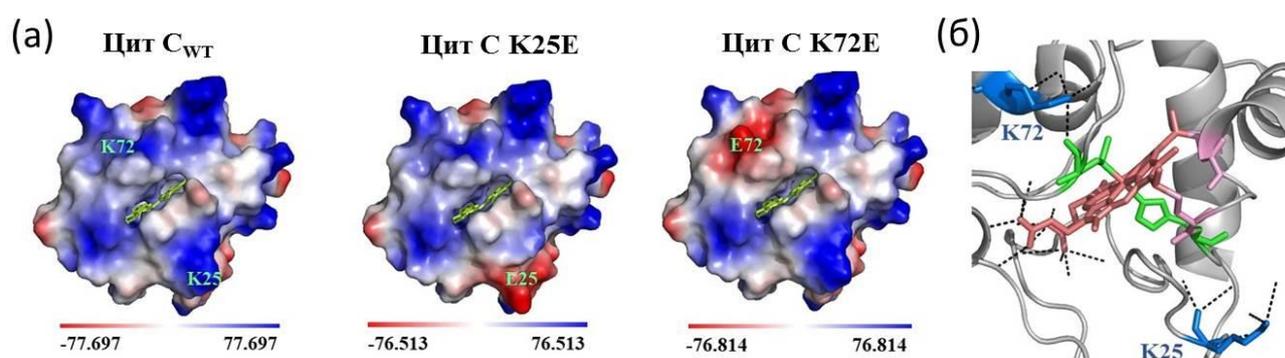


Рисунок 10. (а) Электростатические поверхности Цит С<sub>WT</sub> (ID PDB: 1HRC) и его мутантных вариантов: Цит С K25E и Цит С K72E. Электростатический потенциал показан в соответствии с красно-синей шкалой (кТ/е), гем изображен зелеными линиями. (б) Показано положение сайтов, по которым производили аминокислотные замены в белковом микроокружении гема Нгб (плоская структура розового оттенка). Водородные связи, образованные этими аминокислотными остатками и гемом, показаны черными пунктирными линиями. Аминокислоты - аксиальные лиганды гема изображены зелеными линиями (His18 и Met80). Изображение получены с помощью программы PyMOL.

ГКР и КР спектры диких и мутантных форм Цит С в окисленном и восстановленном состояниях были получены по аналогии со спектрами Нгб (Рисунок

11). Независимо от замены в универсальном сайте связывания Цит С (K72E, K25E) и неупорядоченной  $\Omega$ -петле Цит С T78S/K79 все ключевые пики сохраняют положения своих максимумов, что говорит об интактности структуры гема. Тем не менее, среди окисленных мутантных форм Цит С с заменами в сайте связывания выделяется Цит С K25E, так как на его ГКР спектре расширены пики в области 1500-1800  $\text{см}^{-1}$ . Это уширение не может быть обусловлено вкладом сигнала наноструктур, так как одни и те же серебряные подложки использовались для всех образцов. Вероятно, оно связано с нестабильностью конформации гема, принимающей разную степень искажения в молекулах одного вида. Также отличаются КР и ГКР спектры для Цит С T78S/K79 (Рисунок 11(в)): в окисленной форме более интенсивен пик 1170  $\text{см}^{-1}$  относительно 1126  $\text{см}^{-1}$  по сравнению с другими мутантами, пик 1313  $\text{см}^{-1}$ , напротив, низкоинтенсивен, как и пик 1638  $\text{см}^{-1}$ . В восстановленном состоянии более интенсивен пик 748  $\text{см}^{-1}$ .

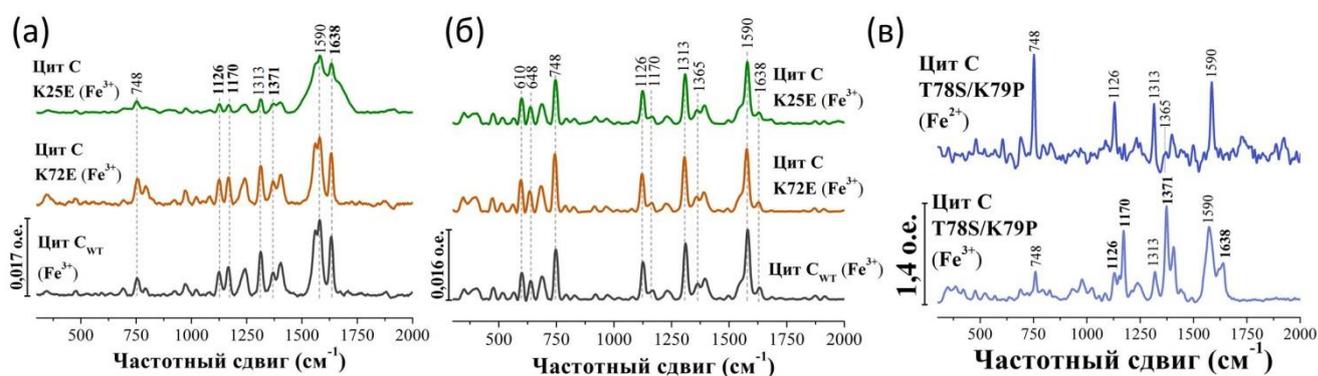


Рисунок 11. (а) ГКР спектры окисленных вариантов цитохрома С (0.25 мМ), (б) КР спектры восстановленных вариантов цитохрома С (1мМ): дикого типа (черная линия) и мутантных форм K72E (оранжевая линия) и K25E (зеленая линия). Каждый спектр – результат усреднения по пяти измерениям. Все спектры нормализованы к сумме их интенсивностей во всем спектральном диапазоне. Вертикальные шкалы соответствуют 0,017 отн.ед. (в) ГКР (голубая линия) КР (синяя линия) спектры окисленного ( $10^{-6}$ М) и восстановленного (1мМ) мутанта Цит С T78S/K79. Спектры нормированы на интенсивность пика с положением максимума 1590  $\text{см}^{-1}$ , каждый спектр представляет собой усреднение по трем спектрам.

Для лучшего представления спектры смещены по вертикали один над другим. Пунктирными линиями показаны положения максимумов наиболее интенсивных пиков, жирным шрифтом выделены положения максимумов пиков, используемых при анализе конформационных изменений. Спектры (а) и (б) были получены на КР-микроспектрометре NTEGRA Spectra (NT-MDT), а спектры (в) на КР-микроспектрометре inVia Raman (Renishaw).

Так как Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) принимает электрон от восстановленного нейроглобина, нас интересуют в первую очередь конформационные свойства гемов мутантных вариантов Цит С в окисленном состоянии. На Рисунке 12 представлен сравнительный анализ конформационных параметров, среди которых наибольшие отличия от дикого типа показывают мутантные формы Цит С K25E и Цит С T78S/K79. Параметр  $I_{1638}/I_{1371}$  для Цит С K25E более чем в два раза выше соответствующих значений для дикого типа и Цит С K72E и в несколько раз выше среднего значения для Цит С T78S/K79 (Рисунок 12(а)). Таким образом, гем Цит С K25E характеризуется наиболее плоской конформацией среди всех вариантов исследованных цитохромов. Вероятность плоской конформации для гема Цит С T78S/K79 достоверно ниже, чем у дикого типа и других мутантов. Параметр  $I_{1170}/I_{1371}$ , характеризующий вероятность колебаний связей пирролов и подвижность пирролов, также показывает отличия для мутантов Цит С K25E и Цит С T78S/K79 (Рисунок 12(б)). Для обоих мутантов этот параметр достоверно ниже соответствующего значения дикого типа, следовательно подвижность пирролов их гемов снижена, что может ухудшать способность гемов принимать наиболее оптимальную конформацию для акцептирования электрона. Параметр  $I_{1126}/I_{1371}$  определяющий вероятность колебаний метильных радикалов, не отличается для всех мутантов и дикого типа Цит С, что может говорить о небольшом влиянии мутаций на белковое микроокружение гема, влияющее на колебания боковых радикалов гема (рисунок 12(в)).

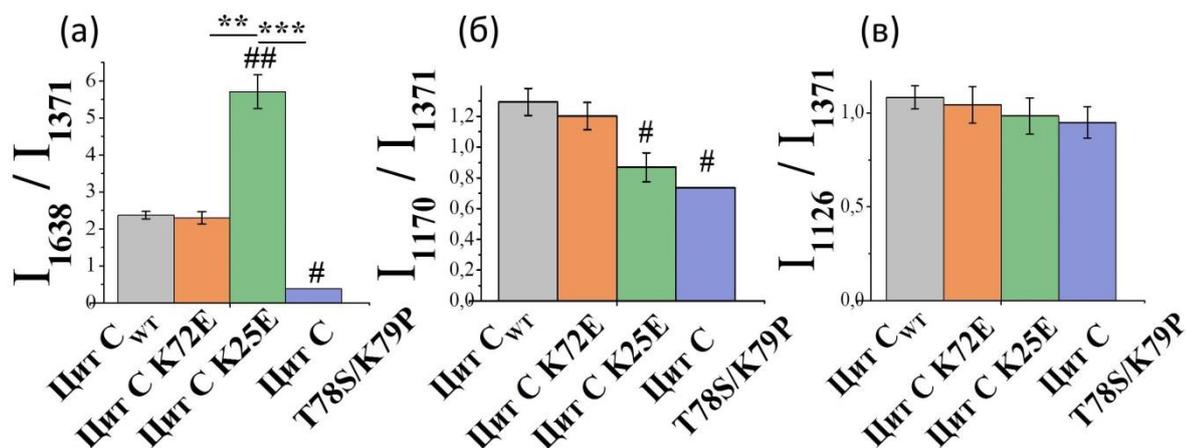


Рисунок 12. Конформационные параметры, посчитанные на основе ГКР спектров окисленных форм Цит С и его мутантов (а, б, в). Параметр  $I_{1638}/I_{1371}$  (а) характеризуют вероятность плоской конформации гема. Параметр  $I_{1170}/I_{1371}$  (б) характеризует вероятность ассиметричных колебаний пиррольных полуколец гема и, следовательно, описывает подвижность пирролов гема в белковом окружении. Параметр  $I_{1126}/I_{1371}$  (в) характеризует вероятность колебаний метильных радикалов гема и зависит от плотности белковой упаковки вокруг гема. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  для мутантов Цит С по сравнению с Цит С<sub>WT</sub>, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  для различных мутантов Цит С по сравнению друг с другом (непараметрический тест Манна-Уитни),  $n = 5$ .

Таким образом, были выявлены два мутанта Цит С - Цит С K25E и Цит С T78S/K79, обладающие конформационными изменениями гемов, снижающими возможность гема принять оптимальную конформацию для акцептирования электрона. Указанные мутации потенциально могут нарушать редокс-реакцию окисленного Цит С с восстановленным Нгб. Ранее уже было показано, что для Цит С T78S/K79 в ЭТЦ митохондрий снижена активность акцептирования электрона на 97% (Chertkova *et al.*, 2017).

## 3.2. Влияние аминокислотных замен в микроокружении гемов и $\Omega$ -петле на редокс-реакцию цитохрома С и нейроголобина

### 3.2.1. Конформационные изменения гема цитохрома С дикого типа в редокс-реакции с нейроголобином дикого типа

Процесс акцептирования-донирования электронов между Нгб и Цит С является многостадийным. Взаимная ориентация белков осуществляется за счет дальних электростатических связей, при сближении глобул начинают играть роль водородные и гидрофобные взаимодействия. Следующим этапом является необходимое ориентирование гемов донора и акцептора друг относительно друга, поскольку перенос электрона между гемами осуществляется по туннельному механизму, критически зависящему от расстояния. Известно, что восстановление гема Цит С сопровождается его сдвигом в пределах 1 Å в гемовой щели, однако остается не до конца ясным, какие именно конформационные изменения испытывает гем С при акцептировании электрона, и какие параметры микро-и макроокружения гема вызывают в нем эти изменения. При этом мы предполагаем, что переходы между плоской и искаженной конформациями гема, играют важную роль при конформационной подстройке гемов для донирования-акцептирования электрона.

При помощи разностной КР-спектроскопии мы установили, какие группы атомов гема Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) испытывают изменения колебаний в процессе редокс-реакции с Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ). Протокол регистрации спектров КР смесей Нгб и Цит С с протеканием редокс-реакции и без нее и анализ разностных спектров подробно описаны в разделе 2.2.4. Были получены разностные спектры, как результат вычитания нормированного спектра Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ), восстанавливаемого только за счет низкомолекулярного восстановителя НАДФН, из другого исходного спектра Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ), восстанавливаемого за счет редокс-реакции с восстановленным Нгб и с молекулами НАДФН, оставшимися в растворе после восстановления окисленного нейроголобина. Предполагается, что при восстановлении Цит С на нейроголобине гем цитохрома С будет изменять конформацию, принимая оптимальное расположение для туннельного переноса электрона от нейроголобина к цитохрому С. Ис-

ходя из этого предполагается, что в комплексе Нгб-Цит С при протекании редокс-реакции конформация гема С будет отличаться от той, которую имеет цитохром С при неспецифическом восстановлении за счет НАДФН. Таким образом, мы полагаем, что при протекании редокс-реакции, на получаемом разностном спектре в определенных спектральных областях будут наблюдаться пики — отклонения от нулевой линии, отражающие конформационные изменения соответствующих групп атомов гема Цит С в процессе редокс-активного взаимодействия с Нгб.

Разностный спектр, характерный для пары взаимодействующих редокс-партнеров диких типов Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) + Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ), представлен на рисунке 13. Каждый пик разностного спектра является результатом вычитания соответствующих пиков на двух исходных спектрах Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ), при этом положения максимумов этих разностных пиков отличается от положения исходных полос. Так, разностный пик с положением максимума  $614 \text{ см}^{-1}$  является «производным» пика  $610 \text{ см}^{-1}$  на исходных спектрах, который связан с конформационными изменениями в области пиррольных колец гема. Пик  $750 \text{ см}^{-1}$  является «производным» пика  $748 \text{ см}^{-1}$  на исходных спектрах восстановленного Цит С. Низкоинтенсивный разностный пик  $645 \text{ см}^{-1}$  является производным пика  $650 \text{ см}^{-1}$  на исходных спектрах, он связан с колебаниями связи С–S между двумя цистеинами белка и двумя пирролами гема цитохрома С. Его присутствие на разностном спектре может говорить о некотором сдвиге гема в гемовой щели. Разностный пик  $700 \text{ см}^{-1}$  соответствует исходному пику  $690 \text{ см}^{-1}$ , имеющему смешанную природу – мы предполагаем, что в его интенсивность вкладываются колебания тиоэфирной связи и пиррольных связей, поэтому он более «пологий» по сравнению с соседними пиками. Низкоинтенсивный пик  $1130 \text{ см}^{-1}$  является производным пика  $1126 \text{ см}^{-1}$  на исходных спектрах, связанного с колебаниями метильных радикалов гема восстановленного Цит С. Его появление на разностном спектре может быть вызвано смещением гема в гемовой щели, которому сопутствует изменение ориентации в белковом окружении и, как следствие изменения колебаний  $\text{C}_\beta\text{-CH}_3$  групп.

Высокоинтенсивный разностный пик  $1317 \text{ см}^{-1}$  является производным пика

1313  $\text{cm}^{-1}$  на спектрах Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ), который связан с колебаниями метиновых мостиков гема, что может говорить в пользу того, что гем принимает менее напряженную, то есть более плоскую конформацию по сравнению с той, что была до редокс-реакции. Мы не рассматриваем область дальше 1500  $\text{cm}^{-1}$ , так как расположенные там высокочастотный пики сливаются друг с другом, в итоге разностные пики тоже обладают нечеткой формой. Мы также не можем применить к ним протокол оценки амплитуды разностного пика, так как измерить точную полуширину исходных пиков не представляется возможным.

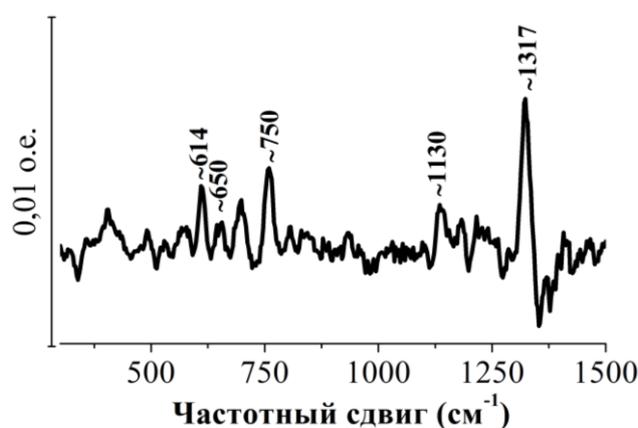


Рисунок 13. Разностный спектр для пары Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ )<sub>WT</sub> + Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ )<sub>WT</sub>. Каждый разностный пик является результатом разности соответствующих по положению пиков на нормированных по суммарной интенсивности исходных спектрах Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ) из контрольного и экспериментально растворов. Разностные пики характеризуют колебания тех же групп атомов, что и исходные для них пики на спектрах Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ). Знак ~ перед положением максимумов означает возможные небольшие отклонения положений максимумов этих пиков от обозначенных значений для разных серий экспериментов. Шкала размером 0,01 о.е. демонстрирует амплитудный диапазон разностных спектров.

Следует отметить, что разностный спектр, несмотря на то, что обладает рядом пиков, близких по положениям к пикам на спектре КР восстановленного Цит С( $\text{Fe}^{2+}$ ), не воспроизводит его. Мы считаем, что наблюдаемые разностные пики характеризуют изменения колебаний конкретных групп атомов гема в ходе кон-

формационных подстроек гема Цит С для осуществления переноса электрона. Альтернативная гипотеза – конформационные изменения гема Цит С связаны с взаимодействием контактных поверхностей Нгб и Цит С и не зависят от степени окисления Нгб и, соответственно, не зависят от процессов связанных с переносом электрона на гем С. Для проверки этой гипотезы были зарегистрированы КР спектры окисленных форм Цит С и Нгб (при концентрациях 1мМ) по отдельности, а также спектр их эквимольной смеси в первую минуту после смешивания (рисунок 14(б)). После нормировки получили суммарный спектр Нгб + Цит С (красная линия) и вычли его из спектра смеси окисленных редокс-партнеров (синяя линия). Спектры практически наложились друг на друга, а разностный спектр представляет собой прямую линию, лишённую пиков и не соответствующую разностному спектру, полученному при смешивании Нгб(Fe<sup>2+</sup>) и Цит С(Fe<sup>3+</sup>) (рисунок 14(а)). На разностном спектре (жирная черная линия) отсутствуют пики, что говорит о неизменности конформации гема С при образовании комплекса окисленного Цит С с окисленным Нгб без переноса электрона.

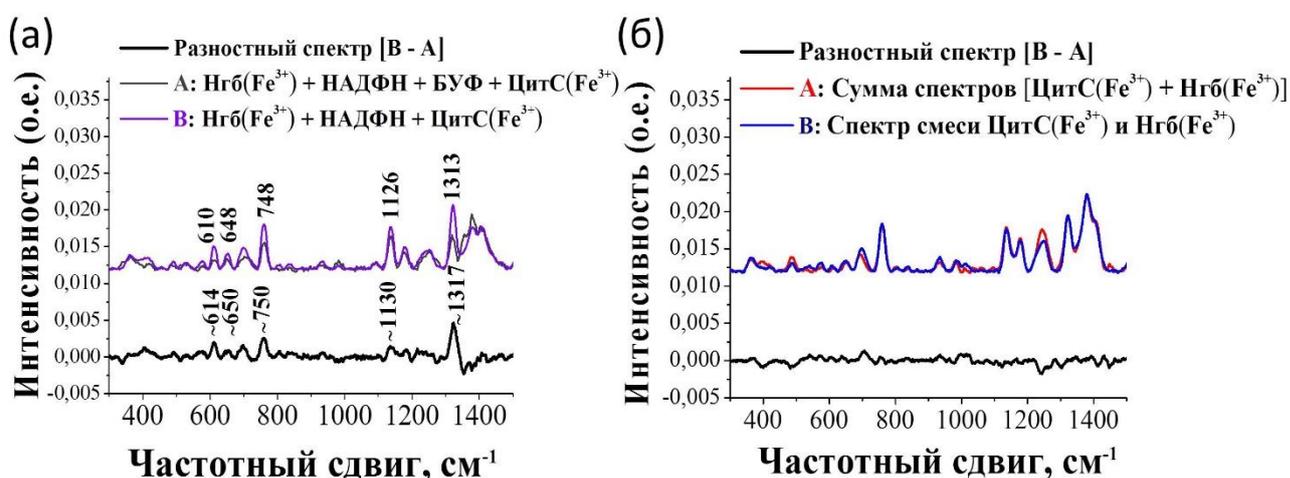


Рисунок 14. (а) Разностный спектр для контрольной пары диких типов Нгб(Fe<sup>2+</sup>) и Цит С(Fe<sup>3+</sup>) (черная линия), полученный вычитанием нормированного КР спектра контрольного раствора (А, серая линия) из нормированного КР спектра экспериментального раствора (В, фиолетовая линия). Спектры А и В совпадают со спектром восстановленного Цит С. (б) Проверка предположения о влиянии

белок-белковых взаимодействий Нгб( $\text{Fe}^{3+}$ ) и Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) на конформацию гема Цит С. Суммарный спектр (красная линия) получали нормировкой исходных спектров 1мМ Нгб( $\text{Fe}^{3+}$ ) и Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) по общей интенсивности, их сложением с последующим делением на коэффициент 2. Спектр смеси (синяя линия) получали от раствора с 0.5 мМ Нгб( $\text{Fe}^{3+}$ ) и Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) и нормировали на общую интенсивность. Разностный спектр получали вычитанием суммарного спектра из спектра смеси.

Совокупность полученных результатов говорит о значительной роли характера конформационных изменений гема цитохрома С и его способности принимать оптимальную ориентацию относительно гема нейроголобина для переноса электрона. Изначально более искаженная конформация гема может создать препятствие для переноса электрона за счет недостаточно близкого расстояния между атомами Fe. Также известно, что искаженной конформации гема свойственен более низкий редокс-потенциал, то есть, сниженная окислительная способность белка, и перенос электрона может не осуществиться по этой причине. Далее, представляется важной способность гема совершить сдвиг в гемовой щели и иметь достаточно свободное белковое окружение для конформационных изменений гема.

Наконец, нами показано отдельно, что несмотря на то, что комплексы между окисленными Цит С и Нгб образуются, их формирование не вызывает перечисленные выше спектральные и, соответственно, конформационные изменения гема Цит С. Следовательно, заряд атома железа восстановленного Нгб критически важен для инициации конформационных изменений гема Цит С, необходимых для переноса электрона.

### 3.2.2. Влияние аминокислотных замен в микроокружении гемов и $\Omega$ -петле на редокс-реакцию цитохрома С и нейроголобина

После того, как были выявлены спектральные параметры протекания редокс-реакции между Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) и Нгб( $\text{Fe}^{2+}$ ) диких типов и связанные с ними

конформационные изменения в геме Цит С, мы оценили вероятность протекания редокс-реакции между мутантными формами Цит С и диким типом Нгб. 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 выбранными аминокислотными заменами в сайте связывания и  $\Omega$ -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 15). Постановка эксперимента была такой же, как в случае исследования редокс-реакции между Цит С и Нгб дикого типа. В случае, 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 на перенос электрона выбранной аминокислотной замены. 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.

Были получены по три разностных спектра для каждой пары: Нгб<sub>WT</sub> + Цит С<sub>WT</sub>, Нгб<sub>WT</sub> + Цит С К25Е, Нгб<sub>WT</sub> + Цит С К72Е, Нгб<sub>WT</sub> + Цит С Т78S/К79. На Рисунке 15, где представлены показательные разностные спектры, видно, что положение максимумов разностных пиков и их относительная интенсивность хорошо воспроизводятся для пары Нгб<sub>WT</sub> + Цит С К72Е, в то время как для пары Нгб<sub>WT</sub> + Цит С Т78S/К79 интенсивность всех разностных пиков снижена по сравнению с пиками на спектре «дикий» редокс-пары, а на разностном спектре пары Нгб<sub>WT</sub> + Цит С К25Е пики отсутствуют вовсе, и спектр представляет собой практически прямую линию.

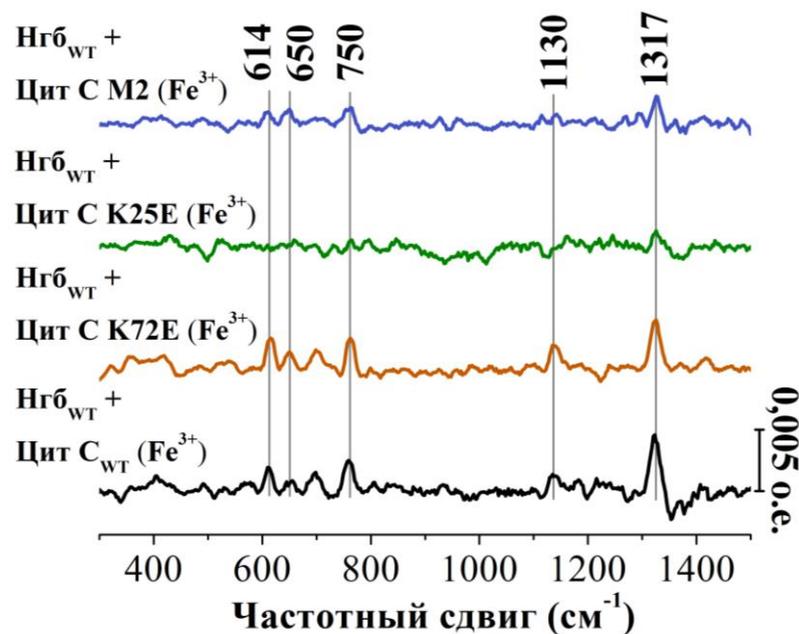


Рисунок 15. Показательные разностные спектры для редокс-пар Нгб<sub>WT</sub> + Цит С<sub>WT</sub> (черная линия), Нгб<sub>WT</sub> + Цит С К72Е (оранжевая линия), Нгб<sub>WT</sub> + Цит С К25Е (зеленая линия), Нгб<sub>WT</sub> + Цит С Т78S/К79 (синяя линия). Серыми вертикальными линиями отмечены положения 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 более детального анализа мы воспользовались описанным в разделе «Материалы и методы» способом расчета параметра  $d$  – комплексного параметра, характеризующего отличия интенсивностей, полуширин и положений максимумом пиков на сравниваемых спектрах КР цитохрома С, восстановленного за счет редокс-реакции с нейроглобином, и цитохрома С, неспецифически восстановленного за счет НАДФН. Снижение параметра  $d$  исследуемых смесей мутантных белков относительно его значения для Нгб и Цит С диких типов говорит о том, что в исследуемых смесях восстановление Цит С протекает не за счет редокс-реакции с Нгб, а вследствие действия НАДФН, то есть переноса электрона между Нгб и Цит С не происходит. Результаты представлены в виде диаграмм со средними значениями и ошибкой среднего на рисунке 16.

Для редокс-пары Нгб<sub>WT</sub> + Цит С К72Е несмотря на некоторую тенденцию к снижению величины параметра *d*, рассчитанного для всех разностных пиков, не обнаружена достоверная разница от редокс-пары Нгб<sub>WT</sub>+Цит С<sub>WT</sub>. Наибольшие отличия демонстрируют пара Нгб<sub>WT</sub>+Цит С К25Е. Значения параметров *d*, рассчитанных для разностных пиков с положениями максимумов 614 см<sup>-1</sup> (симметричные колебания пиррольных полуколец), 650 см<sup>-1</sup> (колебание тиоэфирных связей), 750 см<sup>-1</sup> (все колебания гемов) и 1317 см<sup>-1</sup> (колебания метиновых мостиков) для этой пары достоверно снижены по сравнению с контрольной парой редокс-партнеров и парой Нгб<sub>WT</sub>+ Цит С К72Е. Единственный разностный пик, для которого отличия не выявлены – 1130 см<sup>-1</sup>, однако он сам по себе низкоинтенсивен, и определить разницу может не позволить чувствительность метода оценки амплитуд разностных пиков. Третья мутантная редокс-пара Нгб<sub>WT</sub> + Цит С Т78S/К79 также характеризуется снижением амплитуд для следующих разностных пиков: 614, 650, 1130 и 1317 см<sup>-1</sup>. Для пика 750 см<sup>-1</sup> достоверной разности в параметре *d* не обнаружено.

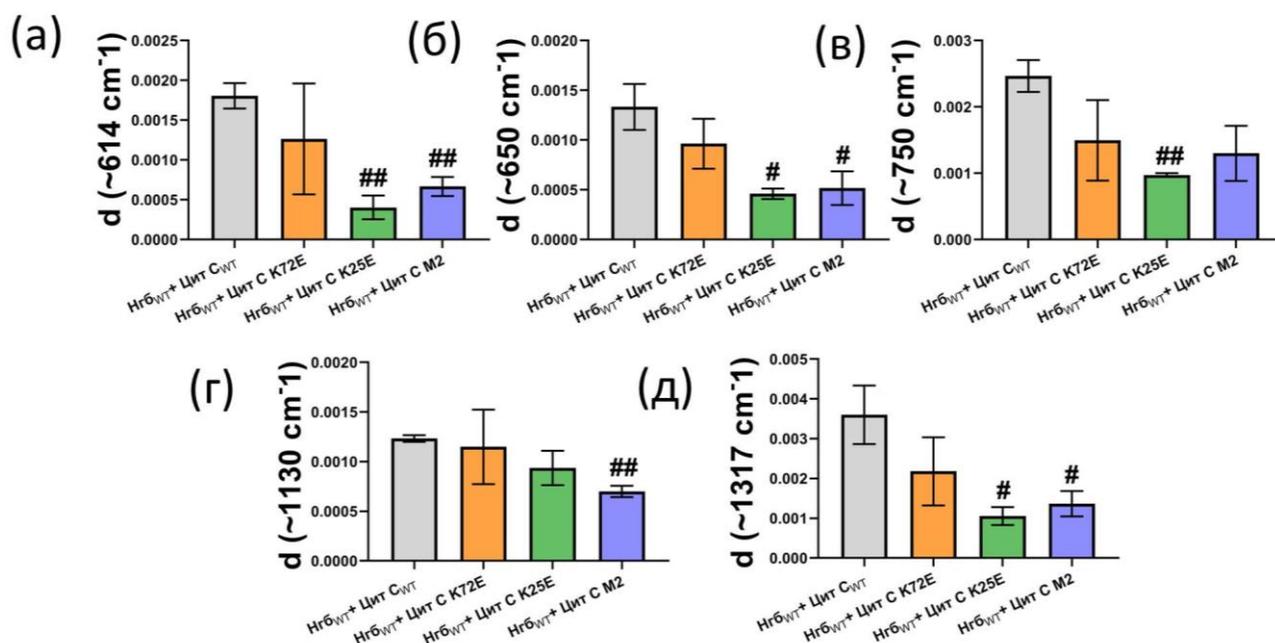


Рисунок 16. Диаграммы параметров *d*, характеризующих разностные пики с положениями максимумов (а) 614 см<sup>-1</sup>, (б) 650 см<sup>-1</sup>, (в) 750 см<sup>-1</sup>, (г) 1130 см<sup>-1</sup>, (д) 1317 см<sup>-1</sup>, и посчитанные для разностных спектров редокс-пар: Нгб<sub>WT</sub> + Цит С<sub>WT</sub> (серый столбик), Нгб<sub>WT</sub> + Цит С К72Е (оранжевый столбик), Нгб<sub>WT</sub> + Цит С К25Е

(зеленый столбик), Нгб<sub>WT</sub> + Цит С T78S/K79 (синий столбик). В каждом случае параметр  $d$  рассчитывали для 3 независимых экспериментов. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  для пар Нгб<sub>WT</sub> + мутант Цит С по сравнению с Нгб<sub>WT</sub> + Цит С<sub>WT</sub>, (неспаренный t-тест),  $n = 3$

Таким образом, мы выяснили, что спектральные признаки редокс-реакции между парой гемопротеинов Нгб<sub>WT</sub> и Цит С K72E не отличается от соответствующих для контрольной пары, то есть, замена положительно заряженного остатка Lys72, расположенного в удалении от гема, на отрицательно заряженный Glu не привела к нарушению переноса электрона. В то же время, для мутантов Цит С (K25E и T78S/K79) зафиксировали нарушение редокс-реакции с диким типом нейроглобина, так как интенсивность пиков на разностных спектрах существенно снижена. Для мутанта Цит С T78S/K79 с двумя заменами в координирующей гем  $\Omega$ -петле причина нарушения переноса электрона может быть связана только с измененной конформацией гема Цит С T78S/K79, которая значительно искажена и характеризуется меньшей подвижностью пирролов, а также повышенной жесткостью белкового окружения гема. Мы предполагаем, что отсутствие редокс-реакции между Нгб дикого типа и мутантом Цит С K25E также связано с меньшей подвижностью пиррольных колец гема С, который не может принять оптимальную для акцептирования электрона конформацию.

Исходя из этих результатов, мы полагаем, что конформационные изменения гема С в большей степени критичны для электрон-акцепторной функции Цит С в комплексе с нейроглобином, чем точечные мутации в сайте связывания, нарушающие отдельные электростатические связи между Цит С и .

### 3.2.3. Исследование протекания редокс-реакции между диким типом Цит С(Fe<sup>3+</sup>) и мутантными формами Нгб(Fe<sup>2+</sup>)

Аналогичный подход был использован для оценки влияния аминокислотных замен в сайте связывания нейроглобина на редокс-реакцию между восстановленным Нгб и окисленным Цит С дикого типа. Важно, что и в этом случае

«репортерами» протекания редокс-реакции служат параметры разностных спектров, полученных для КР-спектров гемов цитохрома С<sub>WT</sub>, восстановленного за счет редокс-реакции с мутантными формами Нгб и/или с НАДФН. На рисунке 17 представлены показательные разностные спектры для редокс-пар Нгб<sub>WT</sub>+Цит С<sub>WT</sub>, Нгб Е60К+Цит С<sub>WT</sub>, Нгб Е87К+Цит С<sub>WT</sub>. Наблюдается хорошая воспроизводимость разностного спектра для пары Нгб Е87К+Цит С<sub>WT</sub> по сравнению со спектром контрольной редокс-пары за исключением более низкой интенсивности пика 1317 см<sup>-1</sup>. Разностный спектр пары Нгб Е60К+Цит С<sub>WT</sub> характеризуется практически полным отсутствием пиков, имеющиеся отклонения сложно отличить от шума.

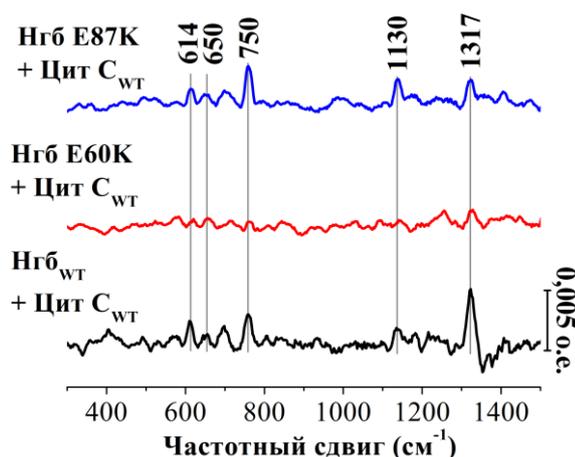


Рисунок 17. Показательные разностные спектры для редокс-пар Нгб<sub>WT</sub> + Цит С<sub>WT</sub> (черная линия), Нгб Е60К + Цит С<sub>WT</sub> (красная линия), Нгб Е87К + Цит С<sub>WT</sub> (синяя линия). Серыми вертикальными линиями отмечены положения максимумов разностных пиков, используемых в сравнительном анализе амплитуд. Шкала 0,005 отн.ед. демонстрирует амплитудный диапазон разностных спектров для редокс-пары диких типов белков.

Для более детального сравнения разностных спектров каждой пары построили диаграммы *d* параметров, рассчитанных для каждого разностного пика (рисунок 18). Для пары Нгб Е60К + Цит С<sub>WT</sub> наблюдается достоверное снижение па-

раметров  $d$ , рассчитанных для всех разностных пиков, по сравнению с параметрами  $d$  для контрольной пары Нгб и Цит С диких типов. Параметры  $d$  для пары Нгб E87K+Цит  $C_{WT}$  достоверно не отличаются от амплитуд пиков контрольной пары, хотя среднее значение ниже, при этом достоверное снижение значения параметра  $d$  получено только для пика  $650\text{ см}^{-1}$  (колебание тиоэфирных связей).

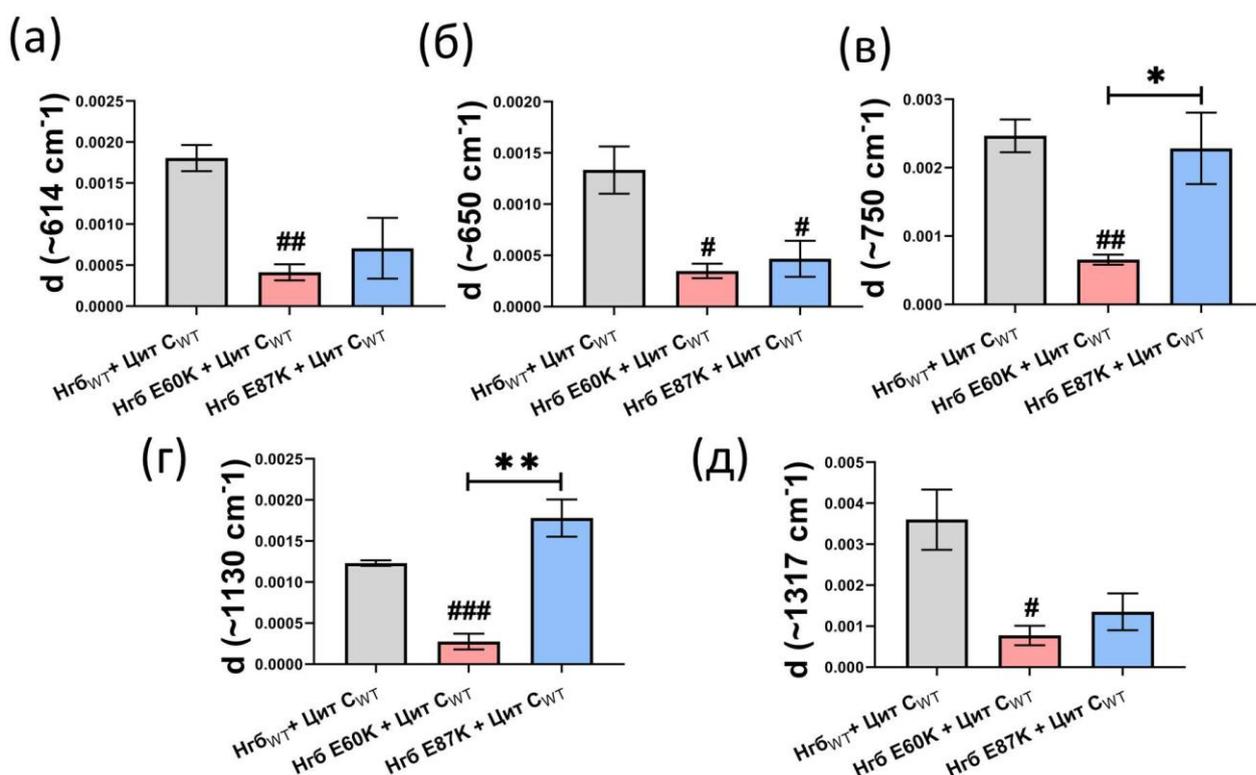


Рисунок 18. Диаграммы параметров  $d$  – амплитуд разностных пиков (а)  $614\text{ см}^{-1}$ , (б)  $650\text{ см}^{-1}$ , (в)  $750\text{ см}^{-1}$ , (г)  $1130\text{ см}^{-1}$ , (д)  $1317\text{ см}^{-1}$  посчитанные для разностных спектров редокс-пар: Нгб<sub>WT</sub> + Цит  $C_{WT}$  (серый столбик), Нгб E60K + Цит  $C_{WT}$  (красный столбик), Нгб E87K + Цит  $C_{WT}$  (синий столбик). Параметры  $d$  рассчитаны для трех независимых экспериментов для каждой редокс-пары. Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  для пар мутант Нгб + Цит  $C_{WT}$  по сравнению с Нгб<sub>WT</sub> + Цит  $C_{WT}$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , (неспаренный t-тест),  $n = 3$

Мы предполагаем, что мутант Нгб E87K с заменой отрицательно заряженного остатка Glu на положительно заряженный Lys в 87-ом положении, не связанном с гемом В, образует функциональный комплекс с Цит С и участвует в до-

нировании электрона цитохрому С. Мутант Нгб Е60К, который так же имеет аминокислотную замену в контактной поверхности, меняющую локальный заряд на противоположный, напротив, не вступает в редокс-реакцию с цитохромом С. Это следует из отсутствия характерных изменений конформации гема С, которые происходят при переносе электрона от Нгб к гему цитохрома С. Гем Цит С не реагирует на присутствие этого мутанта в растворе. Как было показано выше, гем Нгб Е60К обладает сниженной вероятностью плоской конформации гема, подвижностью пирролов и снижением вероятности колебаний метильных гемовых радикалов, что свидетельствует о более жестком белковом окружении. По всей видимости, совокупность этих конформационных изменений нарушает способность гема В принять оптимальную ориентацию относительно гема Цит С и стимулировать принятие правильной ориентации и конформации гема С относительно гема В.

Из этих результатов следует вывод, что для гемопротейна-донора электронов конформация его гема является важным регулятором редокс-реакции, в отличие от точечных замен в контактной поверхности. Также конформация гема Нгб — донора электрона, вероятно, участвует в иницировании конформационных изменений гема цитохрома С — акцептора электрона. Возможно, это происходит за счет сближения гема атома  $Fe^{2+}$  донора с гемом и атомом  $Fe^{3+}$  акцептора, и электростатическое поле гема гемоглобина вызывает каскад электронно-конформационных изменений в комплексе Нгб-Цит С, которые приводят к изменению конформации гема цитохрома С. Если же гему В не удастся принять необходимую конформацию и достаточно приблизиться к атому железа цитохрома С, то ответного конформационного изменения гема цитохрома С не происходит.

#### 3.2.4. Оценка вероятности прохождения редокс-реакции между мутантными формами Цит С( $Fe^{3+}$ ) и мутантными формами Нгб( $Fe^{2+}$ ) по спектральным параметрам гема С

Мы также проанализировали разностные спектры для редокс-пар с обоими участниками-мутантами: Нгб Е60К + Цит С К25Е и Нгб Е87К + Цит С К72Е. В

первой паре оба мутанта по отдельности проявляли спектральные признаки нарушения реакции, во второй паре оба мутанта по отдельности не нарушали акцептирование цитохромом С электрона. Согласно моделям взаимодействия Цит С и Нгб, остатки E60 и E87 (Нгб) образуют электростатические связи с K72 и K25 (Цит С) соответственно. Поэтому предположительно образование комплексов между выбранными редокс-пары мутантов осложнено локальными нарушениями электростатических взаимодействий.

На рисунке 19 представлены разностные спектры для обеих мутантных пар. Можно наблюдать отличия в относительной интенсивности пиков на разностном спектре пары Нгб E87K+Цит С K72E, а именно пики  $614$  и  $650\text{ см}^{-1}$  низкоинтенсивны, пик  $1130\text{ см}^{-1}$ , напротив, более интенсивен, чем соответствующий пик на спектре для контрольной пары, а пик  $1317\text{ см}^{-1}$  – менее интенсивен. На разностном спектре пары Нгб E60K+ Цит С K25E пики полностью отсутствуют, спектр представляет собой прямую линию, следовательно, редокс-реакция между ними не протекает.

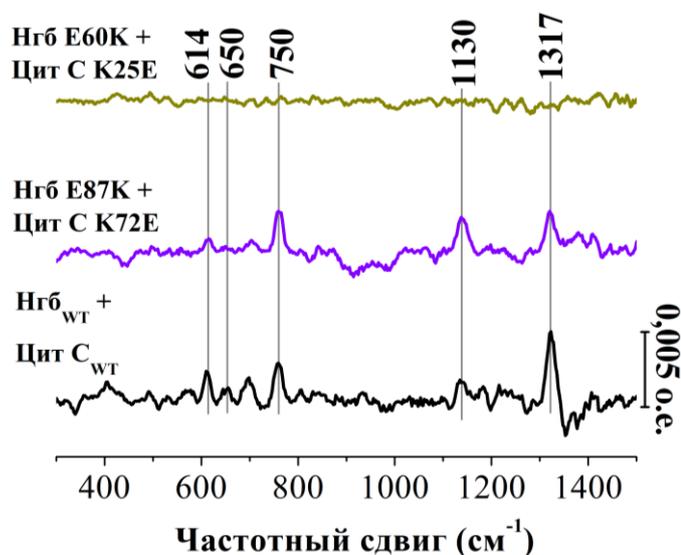


Рисунок 19. Показательные разностные спектры для редокс-пар Нгб<sub>wt</sub> + Цит С<sub>wt</sub> (черная линия), Нгб E87K + Цит С K72E (фиолетовая линия), Нгб E60K + Цит С K25E (желтая линия). Серыми вертикальными линиями отмечены положения максимумов разностных пиков, используемых в сравнительном анализе ам-

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

В результате анализа разностных спектров было показано достоверное уменьшение параметра  $d$ , рассчитанного для пиков  $614\text{ см}^{-1}$  (колебания связей пиррольных полуколец),  $650\text{ см}^{-1}$  (колебание тиосульфидных связей),  $1317\text{ см}^{-1}$  (колебание метиновых мостиков) для мутантной пары Нгб E60K + Цит С K25E (рисунок 20). Для пиков  $750\text{ см}^{-1}$  (колебания всех связей гемов) и  $1130\text{ см}^{-1}$  (колебание метильных радикалов) наблюдается тенденция уменьшения амплитуд по сравнению с контрольной редокс-парой. Для пары Нгб E87K + Цит С K72E нет достоверных отличий амплитуд разностных пиков от соответствующих значений контрольной пары, хотя можно отметить небольшую тенденцию к их уменьшению для пиков  $650$  и  $1317\text{ см}^{-1}$ .

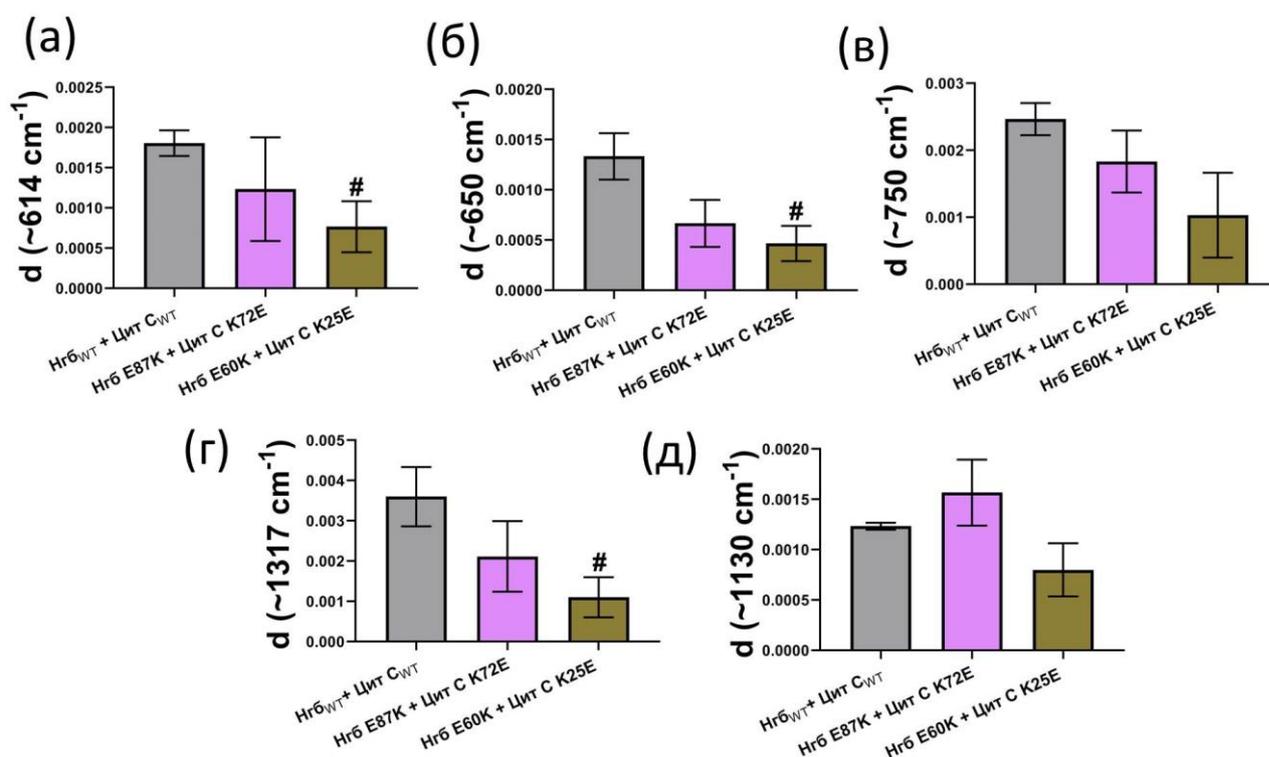


Рисунок 20. Диаграммы параметров  $d$  – амплитуд разностных пиков (а)  $614\text{ см}^{-1}$ , (б)  $650\text{ см}^{-1}$ , (в)  $750\text{ см}^{-1}$ , (г)  $1130\text{ см}^{-1}$ , (д)  $1317\text{ см}^{-1}$  посчитанные для разностных спектров редокс-пар: Нгб<sub>WT</sub> + Цит С<sub>WT</sub> (серый столбик), Нгб E87K + Цит

С K72E (фиолетовый столбик), Нгб E60K + Цит С K25E (желтый столбик). Данные представлены в виде средних значений и ошибки среднего, #  $p < 0,05$ , для пар мутант Нгб + мутант Цит С по сравнению с Нгб<sub>WT</sub> + Цит С<sub>WT</sub>, (неспаренный t-тест),  $n = 3$ .

Обе редокс-пары мутантов характеризуются электростатическими нарушениями комплексов, но только для пары Нгб E60K+Цит С K25E зафиксировано нарушение редокс-реакции. Оба мутанта Нгб E60K и Цит С K25E обладают измененными конформациями гемов и нарушают редокс-реакцию по-отдельности с «дикими» партнерами. С учетом этих обстоятельств, нарушение переноса электронов вызвано именно конформационными изменениями гемов редокс-партнеров. Разрушение пары электростатических связей в комплексе недостаточно для изменения его функциональности, и отсутствие редокс-реакции обусловлено причинами, не связанными с электростатическими силами в интерфейсе взаимодействия.

Совокупность полученных данных свидетельствуют о том, что для переноса электрона между восстановленным нейроглобином 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-C связей с белком. Мы предполагаем, что указанные конформационные изменения необходимы для оптимальной ориентации гемов нейроглобина 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  $\Omega$ -петли цитохрома С и наличия водородной связи между глутаматом 60 нейроглобина, 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.

### **3.3. Регуляция конформации гема цитохрома С в дыхательной цепи митохондрий при изменении макропараметров среды**

#### **3.3.1. Изменение конформации гема Цит С при модуляции работы дыхательной цепи митохондрии**

Выявление конформационных изменений гема цитохрома С, необходимых для акцептирования электрона от нейроглобина, 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 рН и потенциала на внутренней митохондриальной мембране ( $\Delta\Psi$ ). С использованием метода ГКР и серебряных плазмонных наноструктур (рисунок 21) мы зарегистрировали спектры ГКР от интактных митохондрий при разных режимах работы ЭТЦ: при добавлении субстратов цикла Кребса и АДФ, внесении протонофора СССР 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 (Brazhe et al 2015, Brazhe et al 2023).

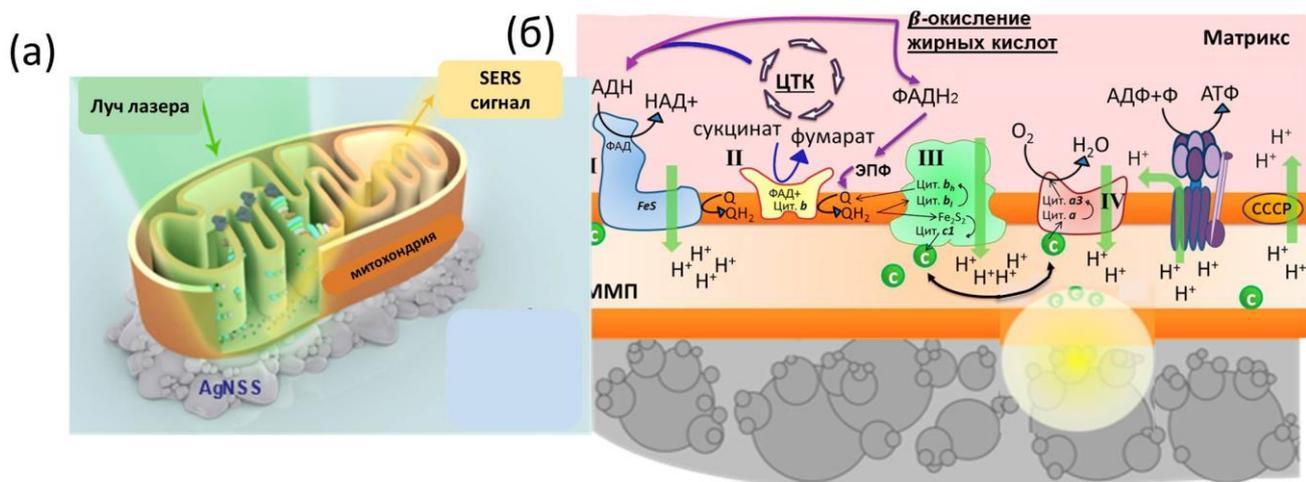


Рисунок 21. (а) Схема ГКР-исследований ЭТЦ митохондрий. AgNNS – наименование серебряных плазмонных наноструктур. (б) Схема ЭТЦ митохондрий в контакте с AgNNS. Желтый круг – область усиления сигнала КР, захватывающая липиды мембраны и премембранные Цит С. В ЭТЦ указаны два источника высокоэнергетических электронов: цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) и  $\beta$ -окисление жирных кислот. CCCP – название протонофора, добавляемого в раствор с интактными митохондриями для снижения протонного градиента на ВММ (Brazhe *et al.*, 2023).

Спектр ГКР (Рисунок 22) митохондрии содержит пики, характерные только для окисленного Цит С: интенсивный пик с положением максимума  $1638\text{ см}^{-1}$  (соответствует колебаниям метиновых мостиков), пик  $1371\text{ см}^{-1}$  (симметричные колебания пиррольных полуколец), относительно низкоинтенсивные пики  $1127\text{ см}^{-1}$  (колебания метильных радикалов гема) и  $1313\text{ см}^{-1}$  (отклонения мезоуглеродов  $\text{C}_m\text{H}$ ). Пик  $1338\text{ см}^{-1}$ , характерный для гема В, отсутствует.

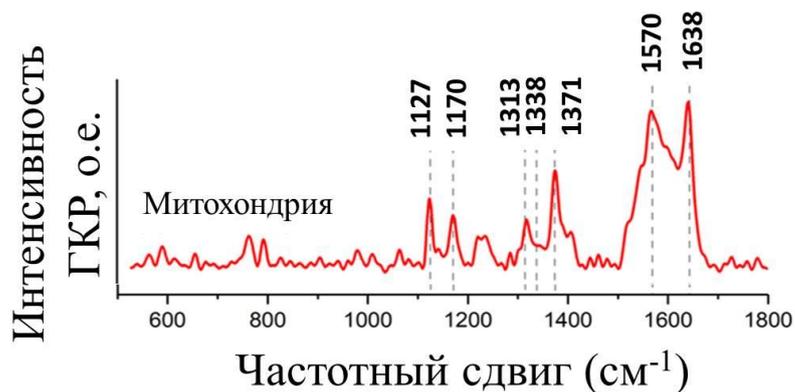


Рисунок 22. ГКР-спектр интактных митохондрий. Прерывистыми линиями выделены наиболее интенсивные пики, соответствующие пикам окисленного Цит С. На спектре отсутствует пик  $1338\text{ см}^{-1}$ , характерный для КР спектров гема В.

Для модуляции разных режимов работы ЭТЦ митохондрий (Salabei *et al.*, 2014; Jüllig *et al.*, 2008) сначала снимали ГКР спектр суспензии митохондрий в буфере (Рисунок 23, состояние 1), затем к этой суспензии примешивали субстраты цикла Кребса (малат, пируват, сукцинат) и АДФ, что приводило к активации транспорта электронов по цепи, восстановлению кислорода на комплексе IV, а также повышало протонный градиент на ВММ (Рисунок 23, состояние 2). При избытке субстратов цикла Кребса скорость переноса электронов ограничивается скоростью притока кислорода к IV комплексу.

Режим работы ЭТЦ с повышенной активностью изменяли, внося к буферу митохондрий протонофор СССР, встраивающийся во ВММ и образующий утечку протонов из ММП в матрикс по градиенту концентрации (Рисунок 23, состояние 3). Как следствие, происходила диссипация протонного градиента (увеличение рН в ММП), а также деполяризация ВММ, что, в свою очередь, инициировало ускорение электронного транспорта для восстановления протонного градиента, необходимого для нормальной работы АТФ-синтазы.

Все три режима работы ЭТЦ связаны с регуляцией активности всех участников переноса электронов, в том числе Цит С. Анализируя относительные интенсивности пиков на спектрах ГКР Цит С (Рисунок 23) в межмембранном про-

странстве, можно оценить, как разные функциональные режимы митохондрий влияют на конформационные изменения гема Цит С.

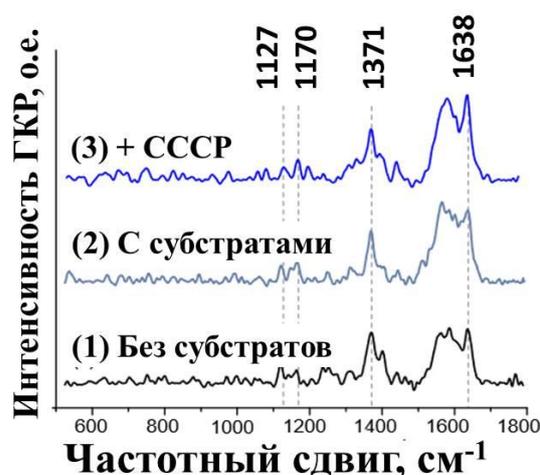


Рисунок 23. ГКР спектры Цит С( $\text{Fe}^{3+}$ ) интактных митохондрий при (1) нормальном режиме работы ЭТЦ, нет внешних источников электронов (2) активном режиме ЭТЦ при внесении субстратов цикла Кребса (малат, пируват, сукцинат и АДФ) (3) разобщении окислительного фосфорилирования и переноса электронов по ЭТЦ за счет внесения протонофора CCCP (0.5 мкМ) к суспензии митохондрий. Все спектры нормированы на пик  $1371 \text{ см}^{-1}$ . Прерывистыми линиями обозначены пики, используемые в дальнейшем анализе конформации гема Цит С.

Для анализа конформационных параметров гема Цит С (Рисунок 24) были посчитаны соотношения интенсивностей выбранных пиков на спектрах ГКР митохондрий в разных состояниях:  $I_{1638}/I_{1371}$  – увеличивается при повышении вероятности плоской конформации гема С (Рисунок 24(а)),  $I_{1170}/I_{1371}$  – увеличивается при возрастании плоскостной подвижности гема (Рисунок 24(б)), параметр  $I_{1170}/I_{1127}$  – тем выше, чем меньше вероятность колебаний метильных радикалов, и тем более плотное белковое окружение гема (Рисунок 24(в)).

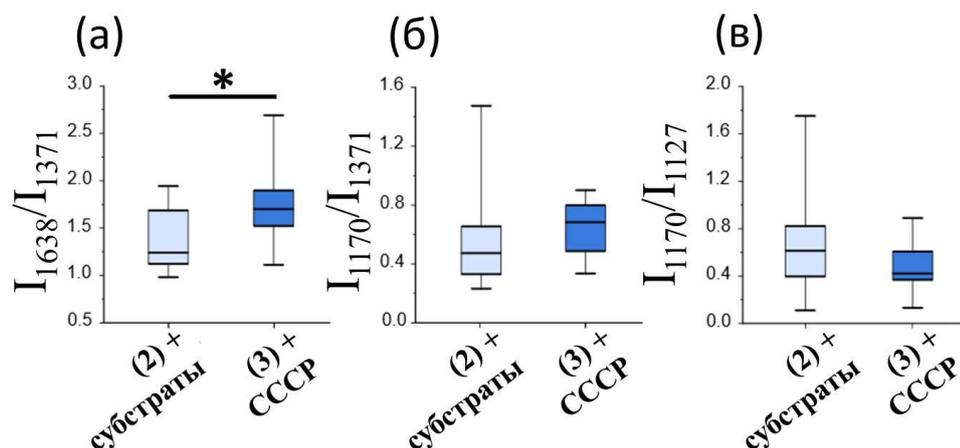


Рисунок 24. Конформационные параметры гема митохондриального Цит С при разных режимах работы ЭТЦ: состояние (2) – активация ЭТЦ при внесении субстратов цикла Кребса, состояние (3) – внесение протонофора СССР. Соотношения посчитаны на основе 9 спектров для каждого режима. На всех диаграммах-прямоугольниках указаны медиана (центральная линия), 25-й и 75-й процентиля (границы прямоугольника), а также минимум и максимум (усы). \* $p < 0,05$ , непараметрический Тест Крускала-Уоллиса с поправкой Данна на множественное сравнение после тестирования.

Было обнаружено достоверное отличие параметра  $I_{1638}/I_{1371}$  между состоянием ЭТЦ (2) при внесении субстратов к суспензии митохондрий и состоянием (3) при внесении протонофора СССР. Гем Цит С в условиях ускорения электронного транспорта за счет падения протонного градиента на ВММ, демонстрирует увеличение вероятности плоской конформации. В случае параметров  $I_{1170}/I_{1371}$  и  $I_{1170}/I_{1127}$  достоверной разницы обнаружено не было для всех трех режимов работы ЭТЦ, то есть, не зафиксированы изменения плоскостной подвижности гемовых пирролов либо изменения вероятности колебаний метильных гемовых радикалов, зависящих от гемалотности упаковки белкового окружения.

Таким образом, мы установили, что режим работы ЭТЦ в присутствии протонофора действительно сопровождался ускорением электронного транспорта по дыхательной цепи, что подтвердилось регистрацией увеличения скорости потреб-

ления кислорода митохондриями амперометрическим методом. Анализ ГКР спектров митохондрий при условии активации ЭТЦ протонофором показал, что вероятность плоской конформации гема Цит С ( $\text{Fe}^{3+}$ ), диффундирующего в ММП, достоверно выше по сравнению с гемами Цит С при нормальном режиме работы ЭТЦ. Логично предположить, что увеличение вероятности плоской конформации гема Цит С будет способствовать правильной взаимной ориентации гемов Цит С<sub>1</sub> и Цит С, уменьшению расстояния между атомами железа и более быстрому переносу электрона. Это также согласуется с результатами (Sun et al., 2014) о положительной корреляции между увеличением редокс-потенциала цитохрома С (то есть увеличении окислительной способности) и более плоской конформацией его гема.

### 3.3.2. Чувствительность конформации гема Цит С к рН и $\Delta\Psi$ на внутренней митохондриальной мембране

Для проверки того, какие именно митохондриальные механизмы регуляции могут влиять на внеплоскостные искажения конформацию гема Цит С при активном режиме работы ЭТЦ, были проведены дополнительные измерения. Суспензию митохондрий разводили в буфере с разным рН от более кислого 6.6 до более щелочного 7.5 – важно, что буфер сообщается с межмембранным пространством митохондрий, и рН буфера влияет на рН ММП изолированных митохондрий. В результате было показано, что параметр  $I_{1638}/I_{1371}$  последовательно возрастает при увеличении рН (Рисунок 25). То есть в более щелочной среде ММП вероятность плоской конформации гема Цит С выше. Примечательно, что конформация гема очищенного изолированного Цит С в буфере при тех же рН не изменяется (данные не приведены). Именно увеличение рН в межмембранном пространстве коррелирует с изменением конформации гема, и именно увеличение рН в ММП мы ожидаем в состоянии (3) ЭТЦ, как результат утечки протонов в матрикс.

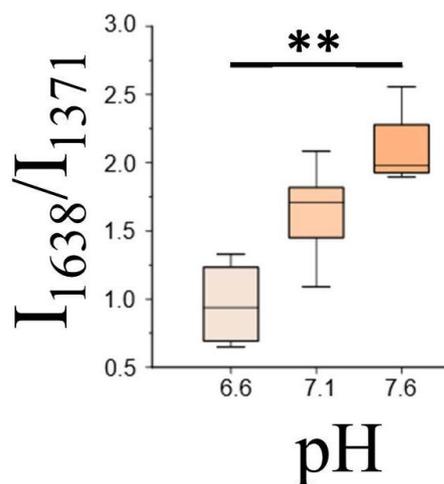


Рисунок 25. Зависимость параметра  $\frac{I_{(1638)}}{I_{(1371)}}$  от pH в митохондриальном буфере. Посчитано на основе 4 ГКР спектров митохондрий.  $**p < 0,01$ , непараметрический тест Крускала-Уоллиса с поправкой Данна на множественное сравнение после тестирования.

Протонный градиент на ВММ генерирует разность потенциалов  $\Delta\Psi$ , так как концентрация заряженных протонов по одну сторону мембраны поляризует ее. Для оценки взаимосвязи конформационных гема Цит С и  $\Delta\Psi$  мы использовали флуоресцирующий зонд MitoTracker CMXRos, интенсивность флуоресценции которого тушится при росте концентрации. Большой  $\Delta\Psi$ , то есть большой отрицательной заряд на внутренней стороне ММП приводит к большей концентрации метки в ММП, которая положительно заряжена, и тушению флуоресценции. Таким образом, мы используем нормированное обратное значение интенсивности флуоресценции, как показатель, коррелирующий с  $\Delta\Psi$  на ВММ.

Для каждого режима работы ЭТЦ митохондрий проводили измерение потенциала на ВММ и измеряли скорость поглощения  $O_2$  суспензией митохондрий амперометрическим методом с помощью электрода Кларка. Моделировали следующие состояния ЭТЦ: (1) внесение субстратов (малат, пируват, сукцинат, АДФ), (2) внесение СССР (3) внесение калиевого ионофора валиномицина, который приводит к нивелированию  $\Delta\Psi$  на ВММ за счет оттока ионов  $K^+$  из ММП, но сохраняет протонный градиент, (4) внесение олигомицина, который ингибирует

АТФ-синтазу, вызывая тем самым гиперполяризацию ВММ за счет остановки потока протонов из ММП через АТФ-синтазу.

На Рисунке 26 видно, что наибольший  $\Delta\Psi$  на ВММ зарегистрирован для состояния (4) с олигомицином, а наименьший – для состояния (3) с валиномицином и (2) с СССР. При этом увеличение  $\Delta\Psi$  на ВММ коррелирует с уменьшением параметра  $I_{1638}/I_{1371}$ , то есть, с большим искажением конформации гема, которое связано с меньшей эффективностью переноса электрона. Наименьшая дыхательная активность митохондрий соответствует состоянию (4) с олигомицином, когда ЭТЦ ингибирована, и электроны не поступают на комплекс IV, восстанавливающий кислород. Наибольшая дыхательная активность соответствует состояниям (2) с СССР и (3) с валиномицином, то есть, в условиях падения  $\Delta\Psi$  на ВММ. Увеличение скорости потребления кислорода коррелирует с увеличением параметра  $I_{1638}/I_{1371}$ , а, следовательно, – с увеличением вероятности плоской конформации гема.

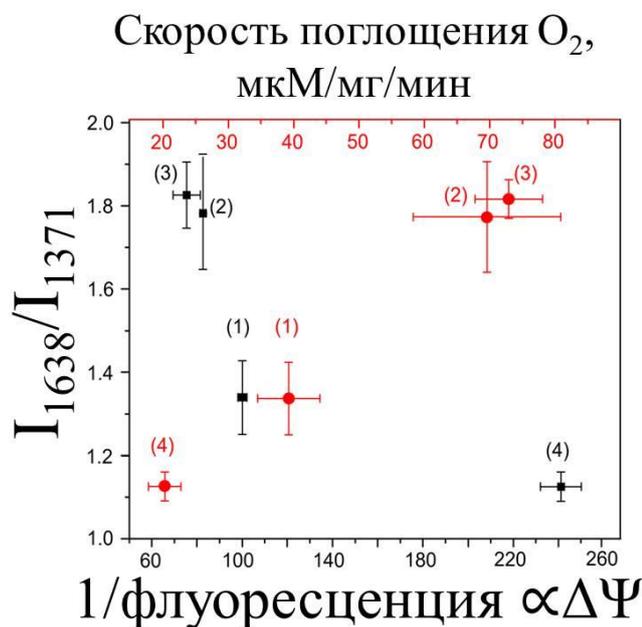


Рисунок 26. Корреляция соотношения  $I_{1638}/I_{1371}$  в зависимости от скорости потребления кислорода митохондриями (красные кружки, красная ось X) и в зависимости от потенциала внутренней митохондриальной мембраны  $\Delta\Psi$ , который оценивается по изменению обратной величины интенсивности флуоресценции

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 CCCP (состояние 2), либо валиномицина (состояние 3), либо олигомицина (состояние 4). Данные представлены в виде средних значений и ошибок среднего значения.

Таким образом, и увеличение межмембранного рН, и уменьшение  $\Delta\Psi$  на ВММ по отдельности и совокупно (при внесении протонофора) влияют на увеличение вероятности плоской конформации гема Цит С. Оба эти эффекта в функционирующей митохондрии ускоряют электронный транспорт по дыхательной цепи. Когда же ЭТЦ оказывается перегружена, и потенциал на мембране увеличивается, и скорость переноса электронов по дыхательной цепи падает, что видно по снижению потребления кислорода митохондриями. Параметр, соответствующий вероятности плоской конформации при этом значительно снижается.

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. Увеличение потребности клетки в энергии активизирует АТФ-синтазу, которая диссипирует протонный градиент, деполяризуя ВММ. Увеличение рН и падение  $\Delta\Psi$  увеличивают вероятность плоской конформации гема диффундирующего в ММП Цит С. В свою очередь, это приводит к ускорению переноса электронов по ЭТЦ, увеличению дыхательной активности митохондрии, восстановлению протонного градиента на ВММ. Уменьшение потребности клетки в АТФ приводит к аллостерическому ингибированию АТФ-синтазы, росту протонного градиента и гиперполяризации ВММ, что коррелирует с искажением конформации гема Цит С и, следовательно, снижением скорости переноса электронов по ЭТЦ. Таким образом предотвращается перегрузка ЭТЦ и всплеск АФК на I и III комплексах ЭТЦ.

### 3.3.3. Регуляция конформации гема Цит С посредством фосфорилирования его белковой части

В описанной выше схеме с обратной связью, приводящей в равновесие потребность клетки в энергии и активность дыхательной цепи митохондрий, остается невыяснимым, за счет каких именно механизмов изменяется конформация гема Цит С при изменении макропараметров среды.

Ранее были выделены фосфорилированные по нескольким сайтам молекулы Цит С из митохондрий клеток разных органов коровы. Известно, что синтезированные мутантные формы Цит С с имитацией фосфорилирования по двум из этих сайтов – Y48E и Y97E (глутамат вносит отрицательный заряд, как и остаток фосфорной кислоты) характеризуются падением редокс-потенциала и ингибированием реакций с переносом электронов (Kalpage et al., 2019; He et al., 2022; Takano and Dickerson, 1980). Также известно, что протеинкиназа, фосфорилирующая Цит С в митохондрии, активизируется при увеличении потенциала на ВММ. В связи с этим мы предполагаем, что фосфорилирование белковой части Цит С – это один из механизмов регуляции активности гемопротейна за счет снижения аффинности к комплексу IV, но также, возможно, за счет изменения конформации гема Цит С при гиперполяризации ВММ.

Чтобы проверить последнее предположение, нами были зарегистрированы ГКР спектры мутантных форм Цит С Y48E и Цит С Y97E (Рисунок 27) и исследованы конформационные параметры их гемов в виде следующих отношений интенсивностей пиков, посчитанным на основе их ГКР спектров:  $I_{1638}/I_{1371}$  – увеличивается при повышении вероятности плоской конформации гема С,  $I_{1170}/I_{1371}$  – увеличивается при возрастании подвижности гемовых пирролов, параметр  $I_{1127}/I_{1371}$  – тем выше, чем выше вероятность колебаний метильных радикалов, и тем менее плотное белковое окружение гема.

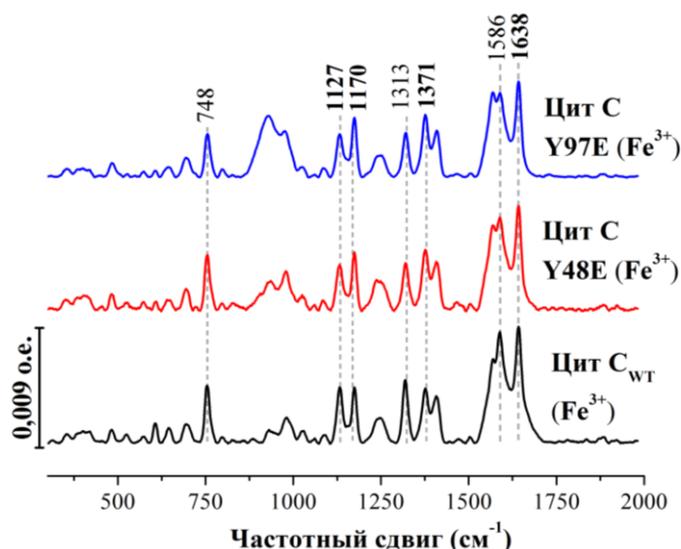


Рисунок 27. ГКР спектры окисленных форм дикого типа Цит С и его мутантных вариантов: Цит С Y48E (красная линия) и Цит С Y97E (синяя линия) с заменами, имитирующими фосфорилирование. Прерывистыми линиями обозначены положения максимумов характерных пиков Цит С, а жирным выделены пики, используемые в конформационном анализе гема С. Спектры нормированы на суммарные интенсивности и усреднены по 5-ти измерениям. Для удобства расположены друг на другом, шкала 0,009 отн.ед демонстрирует размах интенсивности спектра.

Согласно посчитанным соотношениям (Рисунок 28), оба мутанта Цит С по предполагаемым сайтам фосфорилирования протеинкиназой Цит С Y48E и Цит С Y97E демонстрируют достоверное уменьшение параметра  $I_{1638}/I_{1371}$  по сравнению с диким типом Цит С, причем мутант Цит С Y97E в наибольшей степени (Рисунок 28(а)). Следовательно, гемы обоих мутантов Цит С с имитацией фосфорилирования находятся обладают сниженной вероятностью плоской конформации, чем гем дефосфорилированного Цит С. Обнаружены выраженные отличия и по другому параметру  $I_{1127}/I_{1371}$ , значения которого достоверно ниже, чем у дикого типа Цит С, для мутантов Цит С Y48E и Цит С Y97E, причем для последнего снижение отношения происходит в наибольшей степени (Рисунок 28(в)). Так как этот параметр характеризует плотность белкового микроокружения гема, можно

сделать вывод, что имитация фосфорилирования приводит к уменьшению пространства вокруг гема в гемовой щели и увеличению контактов гема с белковым окружением, препятствующему колебаниям метильных радикалов, в особенности для мутанта Цит С Y97E. Параметр  $I_{1170}/I_{1371}$ , характеризующий колебания связей пирролов гема, напротив, не показывает никаких различий для мутантных Цит С по сравнению с диким типом и друг относительно друга (Рисунок 28(б)).

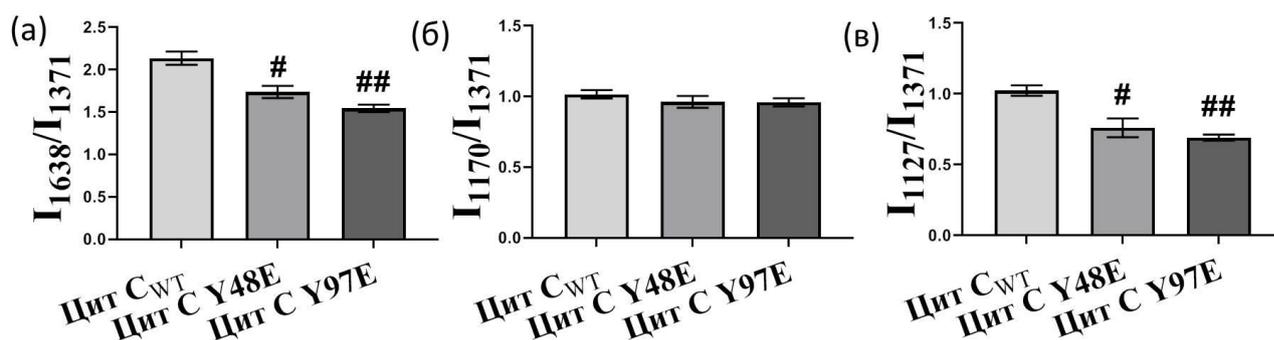


Рисунок 28. Конформационные параметры окисленных гемов дикого типа Цит С (светло серые столбики) и мутантных цитохромов: Цит С Y48E (серые столбики) и Цит С Y97E (темно-серые столбики) с заменами по предполагаемым сайтам фосфорилирования нативного Цит С в ЭТЦ митохондрий. Параметры посчитаны по 5-ти спектрам ГКР каждого варианта Цит С ( $10^{-5}$  М). # $p < 0,05$  ## $p < 0,01$  для мутантов Цит С по сравнению с Цит С<sub>WT</sub>, непараметрический тест Манни-Уитни.

Зафиксированные отличия в конформациях гемов мутантных вариантов усложняют оптимальную подстройку гема С для акцептирования электрона от донора и потенциально замедляют электронный транспорт в ЭТЦ. 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.

### **3.4. Нарушение регуляции конформации гема цитохрома С в митохондриях кардиомиоцитов крыс с повышенным артериальным давлением**

#### **3.4.1. Отличия в ультраструктуре сердечной ткани крыс с нормальным давлением и с артериальной гипертонией**

Сердечно-сосудистые заболевания, такие как сердечная недостаточность, и ее более ранняя стадия – гипертония, характеризующаяся повышенным артериальным давлением, связанным с повышенной нагрузкой на сердечную мышцу (Tian and Liang, 2021). Мы предполагаем, что энергетическая функция митохондрий кардиомиоцитов сердца видоизменена, и ЭТЦ митохондрий работает в более интенсивном режиме, а значит, Цит С может испытывать специфическую регуляцию для реализации повышенных энергетических потребностей клетки. Для оценки конформационных изменений гема Цит С в подобных паталогических условиях была использована линия крыс SHR с повышенным артериальным давлением (Рисунок 29(а)) на фоне развивающейся спонтанной гипертонии, переходящей с возрастом в сердечную недостаточность.

Методом просвечивающей электронной микроскопии было показано, что митохондрии кардиомиоцитов 4-месячных крыс мужского пола обладают аномальной морфологией (Рисунок 29(в)) по сравнению с митохондриями кардиомиоцитов крыс WKY с нормальным давлением.

Митохондрии кардиомиоцитов крыс с нормальным давлением (рисунок 29(б)) расположены упорядоченно (между ними и саркомерами практически нет саркоплазмы), имеют вытянутую форму и множество плоских параллельно уложенных крист. Митохондрии кардиомиоцитов крыс с артериальной гипертонией имеют более округлую форму с разбухшим матриксом, меньшее число крист с большим расстоянием между мембранами крист. При этом митохондрии лежат неупорядоченно в толще саркоплазмы (рисунок 29(в)).

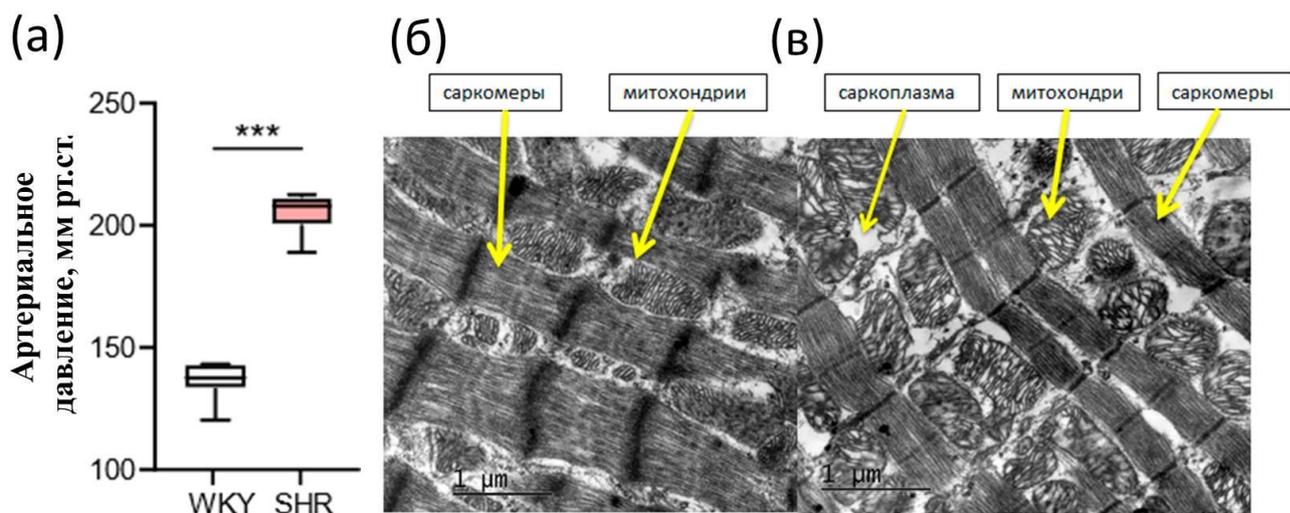


Рисунок 29. (а) Сравнение артериального давления крыс линий WKY и SHR. \*\*\* $p < 0.001$ , непараметрический тест Крускала-Уоллиса с поправкой Данна на множественное сравнение после тестирования. Электронные микрофотографии срезов сердечных мышц (б) крысы линии WKY (в) крысы линии SHR.

### 3.4.2. Нарушение регуляции конформации гема Цит С в условиях артериальной гипертонии

Предложенная выше модель регуляции активности ЭТЦ на уровне изменения конформации гема Цит С при разных энергетических потребностях клетки была проверена для сердечных митохондрий линии крыс SHR со спонтанной гипертонией. Провели ГКР-исследование конформации гема Цит С митохондрий крыс SHR в присутствии субстратов цикла Кребса (малат, пируват, сукцинат и АДФ) и при внесении протонофора CCCP. По спектрам ГКР были посчитаны следующие параметры:  $I_{1638}/I_{1371}$  – увеличивается при повышении вероятности плоской конформации гема С,  $I_{1170}/I_{1371}$  – увеличивается при возрастании плоскостной подвижности гема, параметр  $I_{1170}/I_{1127}$  – тем выше, чем меньше вероятность колебаний метильных радикалов, и тем более плотное белковое окружение гема (Рисунок 30).

Параметр  $I_{1638}/I_{1371}$  не изменяется при внесении CCCP к митохондриям кардиомиоцитов крыс со спонтанной гипертонией по сравнению с митохондриями

кардиомиоцитов крыс с нормальным давлением (рисунок 30(а)). Два других параметра:  $\frac{I_{(1170)}}{I_{(1371)}}$  и  $\frac{I_{(1170)}}{I_{(1127)}}$ , характеризующих подвижность пирролов гема и плотность белкового микроокружения соответственно, не изменяются при увеличении нагрузки на ЭТЦ, что также наблюдалось для митохондрий крыс WKY (рисунок 30(б,в)).

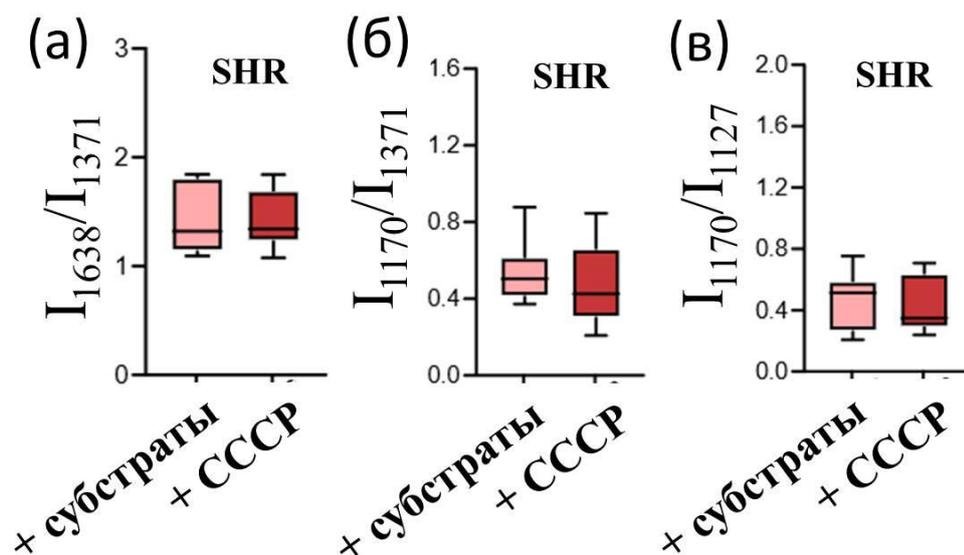


Рисунок 30. Параметры, характеризующие внеплоскостное искажение гема Цит С (а), подвижность пирролов гема (б) и плотность белкового микроокружения (в), посчитанные на основе ГКР спектров митохондрий крыс линии SHR с повышенным артериальным давлением для двух состояний: в присутствии субстратов цикла Кребса (розовые ящики) и при внесении 0,5 мкМ протонофора СССР (красные ящики), нивелирующего протонный градиент и потенциал на ВММ. Использовали по 6 животных в каждой группе.

Таким образом, мы обнаружили, что диссипация протонного градиента и деполяризация ВММ, вызванные протонофором, не приводят к увеличению вероятности плоской конформации гема Цит С митохондрий SHR в отличие от митохондрий крыс с нормальным давлением WKY. Из полученных данных можно сделать вывод, что при спонтанной гипертонии в митохондриях кардиомиоцитов отсутствует механизм регуляции активности электронного транспорта в ЭТЦ за

счет конформационных изменений гема Цит С. Это может приводить к отсутствию увеличения синтеза АТФ в условиях активной работы кардиомиоцитов.

### **3.5. 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**

#### **3.5.1. КР спектроскопия изолированного сердца крысы в разных моделях ишемии/реперфузии**

Ишемия – состояние кислородного голодания тканей может возникать не только вследствие патологических процессов (инсульт, черепно-мозговая травма, инфаркт миокарда), но и в ходе хирургических операций, трансплантации органов. Последующая реперфузия – возобновление доступа кислорода к тканям – является наиболее травмирующим этапом, связанным со всплеском АФК, образуемых преимущественно ксантиноксидазой, ЭТЦ митохондрий клеток и адгезируемыми нейтрофилами (Gillani *et al.*, 2012). Таким образом, поиск возможностей предотвратить негативные последствия реперфузии связан с регуляцией продукции АФК и, в том числе, активностью ЭТЦ митохондрий. Отдельный интерес представляет эффект методологии гипоксического preconditionирования, заключающегося в нескольких повторяемых кратковременных эпизодах ишемии/реперфузии ткани перед последующей длительной ишемией. Как было показано, preconditionирование гипертоническим раствором ингибирует апоптоз гепатоцитов (Ogeoroulos *et al.*, 2004) и снижает окислительный стресс в гепатоцитах на модели гипотермической ткани (Nunes *et al.*, 2021). Preconditionирование в моделях, имитирующих ишемию кардиомиоцитов кроликов, снижало долю набухающих клеток — состояние предшествующее апоптозу (Diaz, 2003). При этом не существует единого представления о защитных механизмах ГПК. С помощью КР-спектроскопии изолированных сердец крыс в нормальных условиях, в ишемических условиях и в пост-ишемических при реперфузии мы можем оценить динамику

ку редокс-состояния и конформации цитохромов ЭТЦ митохондрий, а также динамику содержания оксимиоглобина в ходе развития патологии ишемии/реперфузии. Сравнение тех же параметров для сердец, подвергнутых ГПК перед ишемией, позволяет оценить его эффект на функциональность ЭТЦ и прояснить участие цитохромов в защите от реперфузного шока.

Нами были получены КР спектры с поверхности левых желудочков сердец крыс 1) в условиях нормоксии, при перфузии сердец насыщенным кислородом буфером; 2) и 3) в ишемических условиях при остановке перфузии на 20 мин (краткая ишемия) и на 60 мин (долгая ишемия) с последующей реперфузией — возобновлением накачки буфера; 4) в условиях ишемии и реперфузии после предварительно проведенной ГПК (три повторяющихся эпизода гипоксии, вызванной пятиминутной остановкой перфузии сердца, чередуемых с пятиминутным восстановлением перфузии сердца). Спектр КР изолированного сердца содержит пики, связанные с колебаниями связей в молекулах: восстановленных цитохромах С и В-типов дыхательной цепи митохондрий, а также окси- и дезоксимиоглобин (оМб и дМб), присутствующие в кардиомиоцитах в концентрации 0.25 – 0.6 мМ. На всех КР спектрах сердец независимо от условий (Рисунок 31) присутствуют пики, характерные для восстановленных цитохромов:  $750\text{ см}^{-1}$  (колебания всех связей гемов),  $1127\text{ см}^{-1}$  (колебание  $\text{C}_\beta\text{CH}_3$  групп), а также пики, характерные для миоглобина:  $1377\text{ см}^{-1}$  и  $1640\text{ см}^{-1}$  (оксимиоглобин),  $1358\text{ см}^{-1}$  (дезоксимиоглобин). Последний пик появляется только в условиях гипоксии вследствие деоксигенации оМб. Следует отметить, что пик оМб  $1377\text{ см}^{-1}$  можно спутать с пиком  $1371\text{ см}^{-1}$  окисленного Цит С/В, однако, спектроскопия КР клеток и тканей позволяет зарегистрировать только интенсивные спектры восстановленных цитохромов, у которых этот пик сдвигается в положение  $1365\text{ см}^{-1}$ , следовательно, пик в районе  $1377\text{ см}^{-1}$  не может относиться к цитохромам и соответствует оМб, так же как и пик  $1640\text{ см}^{-1}$ . Интенсивный пик в районе  $1587\text{ см}^{-1}$  (колебание метиновых мостиков) присутствует на спектрах оМб и восстановленных цитохромов, но именно это положение более характерно для оМб (Brazhe *et al.*, 2013). Пик фенилаланина  $1000\text{ см}^{-1}$  есть на всех спектрах, и он не зависит от степени оксигенации Мб, что поз-

воляет использовать его интенсивность для нормировки. Рисунок 31(а) демонстрирует контрольную серию эксперимента: КР спектры сердца при нормоксии, снятые на 0, 20, 40, 60, 70 и 85 минутах. Эти спектры хорошо воспроизводятся и остаются стабильны во времени, содержат интенсивные пики 1377 и 1640  $\text{см}^{-1}$  оМб, менее интенсивные пики восстановленных Цит С и В: 750 и 1127  $\text{см}^{-1}$ . Примечательно, что на всех спектрах этой серии отсутствует пик дМб 1358  $\text{см}^{-1}$ . Следовательно, при перфузии кислородным буфером Мб находится полностью в оксигенированном состоянии. На Рисунке 31(б) представлена серия КР спектров сердца снятых при нормоксии (на 0 мин), на последней минуте короткой 20-минутной ишемии и при реперфузии (через 15 минут от момента подачи буфера и через 30 мин). Видны отличия на спектре КР сердца после 20-ти минутной ишемии по сравнению с соответствующим контролем на Рисунке 31(а): возрастает интенсивность цитохромных пиков 750 и 1127  $\text{см}^{-1}$ . Интенсивность пика оМб 1377  $\text{см}^{-1}$  снижается до базовой линии, появляется крайне малоинтенсивный пик дМб 1358  $\text{см}^{-1}$ . Также снижается интенсивность пика оМб 1640  $\text{см}^{-1}$ . Краткая ишемия приводит к восстановлению цитохромов и дезоксигенированию оМб. Последующая реперфузия, напротив, приводит к снижению интенсивности цитохромных пиков 750 и 1127  $\text{см}^{-1}$  и к резкому возрастанию интенсивности пиков 1377 и 1640  $\text{см}^{-1}$  оМб, причем их интенсивность даже выше, чем в контроле на 0 мин.

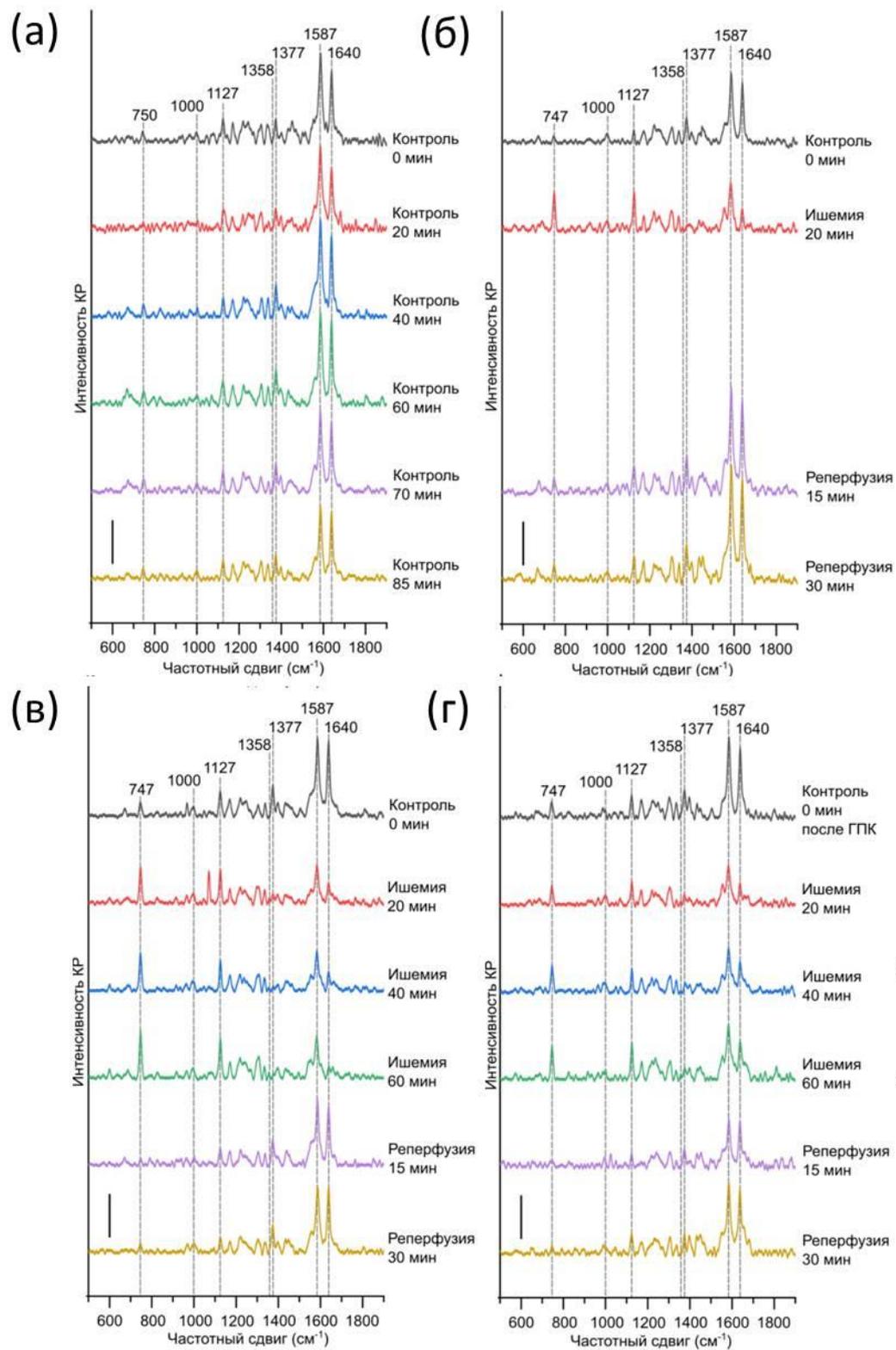


Рисунок 31. КР-спектры сердца крысы (а) контрольной серии при непрерывной перфузии кислородным буфером, (б) при проведении краткой 20-минутной ишемии сердца с последующей реперфузией (спектры сняты на 15 и 30 мин реперфузии), (в) при проведении длительной 60-минутной ишемии сердца (спектры на 20, 40 и 60 мин) с последующей реперфузией (спектры на 15 и 30

мин), (г) при проведении 60-минутной ишемии после гипоксического preconditionирования (спектры на 20, 40 и 60 мин ишемии) и последующей реперфузии (спектры на 15 и 30 мин). Пики восстановленных цитохромов С и В:  $750$  и  $1127$   $\text{см}^{-1}$  возрастают на каждом этапе ишемии и снижаются при реперфузиях, однако в серии (г) после ГПК восстановление цитохромов происходит медленнее. Также не происходит полного дезоксигенирования оМб, что видно по интенсивности пиков  $1377$ ,  $1587$  и  $1640$   $\text{см}^{-1}$ . Все спектры нормированы на их суммарную интенсивность и для удобства демонстрации расположены друг над другом.

Таким образом, реперфузия стремительно насыщает миоглобин кислородом, а часть Цит С и В переходят обратно в окисленное состояние. На Рисунке 31(в) представлена серия КР спектров при длительной ишемии сердца с последующей реперфузией. Спектры сняты на 0 минуте (контроль), 20, 40 и 60 минутах с начала ишемии и на 15 и 30 минутах с начала реперфузии. На 20 минуте ишемии происходят аналогичные изменения спектра, что и входе короткой ишемии на Рисунке 31(б). На 60 минуте ишемии пики восстановленных цитохромов С и В становятся еще интенсивнее по сравнению с 20 и 40 минутами, пики оМб и дМб  $1377$   $\text{см}^{-1}$  по-прежнему крайне низкоинтенсивны, а интенсивность пика  $1640$   $\text{см}^{-1}$ , значительно упавшая к 20 мин, снижается до базовой линии к 60 минуте ишемии — спектр соответствует восстановленным спектрам цитохромов. Реперфузия к 15 минуте характеризуется резким снижением интенсивности цитохромных пиков  $750$  и  $1127$   $\text{см}^{-1}$ , которые становятся почти неразличимы, и возрастанием пиков оМб  $1377$ ,  $1587$  и  $1640$   $\text{см}^{-1}$ . К 30 мин реперфузии интенсивность пика  $1640$   $\text{см}^{-1}$  продолжает возрастать. Таким образом, более длительная ишемия вызывает максимальное восстановление цитохромов ЭТЦ, однако пики Мб практически перестают меняться с 20 минуты – основная дезоксигенация оМб происходит в течение первых минут ишемии. Реперфузия в течение 15 минут приводит к почти полному окислению цитохромов ЭТЦ и окисгенированию Мб. На рисунке 31(г) представлена серия спектров КР сердец, подвергшихся ишемии и реперфузии по-

сле предварительного этапа ГПК. Спектры сняты на тех же временных интервалах, что и в серии с длительной ишемией. Видно, что на 20 минуте спектр КР претерпевает схожие изменения, что и на рисунке 31(в), однако цитохромные пики 750 и 1127  $\text{см}^{-1}$  менее выражены. Пики оМб 1587 и 1640  $\text{см}^{-1}$  не демонстрируют отличий по сравнению с 20 минутой длительной ишемии в отличие от пика 1377  $\text{см}^{-1}$ , который не исчезает полностью. К 60 минуте ишемии пики 750 и 1127  $\text{см}^{-1}$  возрастают, что говорит о постепенном восстановлении цитохромов, однако возрастают и пики оМб 1587 и 1640  $\text{см}^{-1}$ . В этом значительное отличие от спектра сердца КР на 60 минуте ишемии без ГПК. При последующей реперфузии на 15 минуте происходит окисление цитохромов и оксигенирование Мб. К 30 минуте реперфузии пики оМб 1377, 1587 и 1640  $\text{см}^{-1}$  становятся более выраженными. Можно наблюдать, что ГПК приводит к более медленному восстановлению цитохромов ЭТЦ в ходе ишемии. Более того, не происходит полного дезоксигенирования оМб даже к 60 минуте ишемии.

### 3.5.2. Влияние ГПК на динамику редокс-состояния цитохромов С и В и оксигенацию Мб в ходе ишемии и реперфузии изолированного сердца

Для оценки динамики изменения редокс-состояний цитохромов окси-дезокси-форм Мб, а также конформации гема Цит С мы рассчитали следующие спектральные соотношения: 1) параметр  $I_{1377}/(I_{1358} + I_{1377})$  характеризует относительное содержание оМб (Рисунок 32(а)), 2) параметр  $I_{1127}/I_{1000}$  характеризует относительное содержание восстановленных гемов В-типа по сравнению с белками (Рисунок 32(в)), так как пик 1127  $\text{см}^{-1}$  наиболее интенсивен на спектрах восстановленных Цит В, 3) параметр  $I_{750}/I_{1000}$  характеризует относительное содержание восстановленных гемов С-типа по сравнению с белками (Рисунок 32(б)), так как пик 750  $\text{см}^{-1}$  в наибольшей степени возрастет на спектрах восстановленного Цит С. Тем не менее, и пик 750  $\text{см}^{-1}$ , и пик 1127  $\text{см}^{-1}$  есть на спектрах гемов С и В, поэтому по этим соотношениям мы можем судить только о преимущественном содержании того или другого восстановленного гема. 4) Параметр  $I_{750}/I_{1127}$  характеризует отношение восстановленных цитохромов С к В (Рисунок 32(г)). 5) Пара-

метр  $I_{570}/I_{750}$  характеризует содержание гемов С в искаженной конформации к содержанию всех восстановленных гемов С, так как интенсивность пика  $570 \text{ см}^{-1}$  тем больше, тем более искаженная конформация гема С (Рисунок 32(д)).

Мы установили, что в контрольной серии относительное содержание оМб не меняется со временем, в то же время при длительной ишемии (красная линия) оно стабильно снижается и достоверно ниже соответствующих значений контрольной серии на 20, 40 и 60 минутах (Рисунок 32(а)). Краткая ишемия на протяжении 20 минут (зеленая линия) не приводит к достоверному уменьшению содержания оМб по сравнению с контрольной серией. Ишемия после ГПК приводит к снижению относительного содержания оМб к 20 мин, но к 60 мин это значение не изменяется. Для ГПК наблюдается не столь выраженное по сравнению с длительной ишемией, но достоверное снижение содержания оМб по сравнению с контрольной серией на 20, 40 и 60 минутах. При этом для каждой модели ишемии к 30 минуте реперфузии содержание оМб увеличивается. Для контроля и краткой ишемии это значение восстанавливается до исходного (0 мин), но для ишемии 60 мин и ишемии с ГПК зафиксировано достоверное снижение по сравнению с пред-ишемическими значениями содержания оМб. Таким образом, именно длительная гипоксия приводит к критическому дезоксигенированию оМб, и 30-минутной реперфузии недостаточно для того, чтобы восстановить пул оМб. Предварительное ГПК несколько снижает динамику дезоксигенирования, однако 30-минутная реперфузия также не достаточна для полного восстановления пула оМб.

На Рисунке 32(г) показано относительное содержание восстановленного Цит В. Сразу стоит отметить, что в серии с ГПК еще до ишемии на 0 минуте содержание восстановленного Цит В достоверно выше по сравнению с сердцами, не подвергнутыми ГПК. Параметр не меняется во времени для контрольной серии измерений, однако достоверно увеличивается к 20 минуте ишемии для каждой серии: краткой ишемии, длительной и с ГПК по сравнению с контрольной. На протяжении следующих 40 минут ишемии значения содержания восстановленного Цит В для длительной ишемии и для ишемии с ГПК не меняются. Реперфузия

приводит к окислению Цит В — причем при длительной ишемии зафиксировано достоверно более низкое содержание восстановленного Цит В после 30 минут реперфузии по сравнению с исходным состоянием (0 мин). В остальных сериях параметры КР, характеризующие относительное содержание восстановленных цитохромов, снижаются до исходных. Интересно, что длительная ишемия с последующей реперфузией вызывают «переокисление» Цит В, что может быть связано с нерегулируемым сбросом электронов на  $O_2$  на комплексе II и III ЭТЦ с образованием супероксид-анион радикала, что, в свою очередь является механизмом образования АФК, окислением компонентов митохондрий и дальнейшим развитием окислительного стресса. ГПК нивелирует этот эффект.

На Рисунке 32(в) показано относительное содержание восстановленного Цит С. Наблюдается схожая динамика, что и для Цит В: в серии с ГПК до ишемии содержание восстановленного Цит С выше, чем в других сериях. К 20 минутам ишемии происходит значительное восстановление Цит С во всех сериях, достоверно выше по сравнению с контролем. В случае длительной ишемии параметр продолжает возрастать к 60 минуте, а для серии с ГПК, наоборот, несколько снижается. Таким образом, для серии с ГПК наблюдается сходная динамика, что и для длительной ишемии, однако, более «мягкая» - на больших временах восстановление Цит С заканчивается. Реперфузия приводит к окислению Цит С во всех сериях вплоть до исходных значений, кроме краткой ишемии: в ее случае не происходит полного окисления, остается разница с пред-ишемическими значениями.

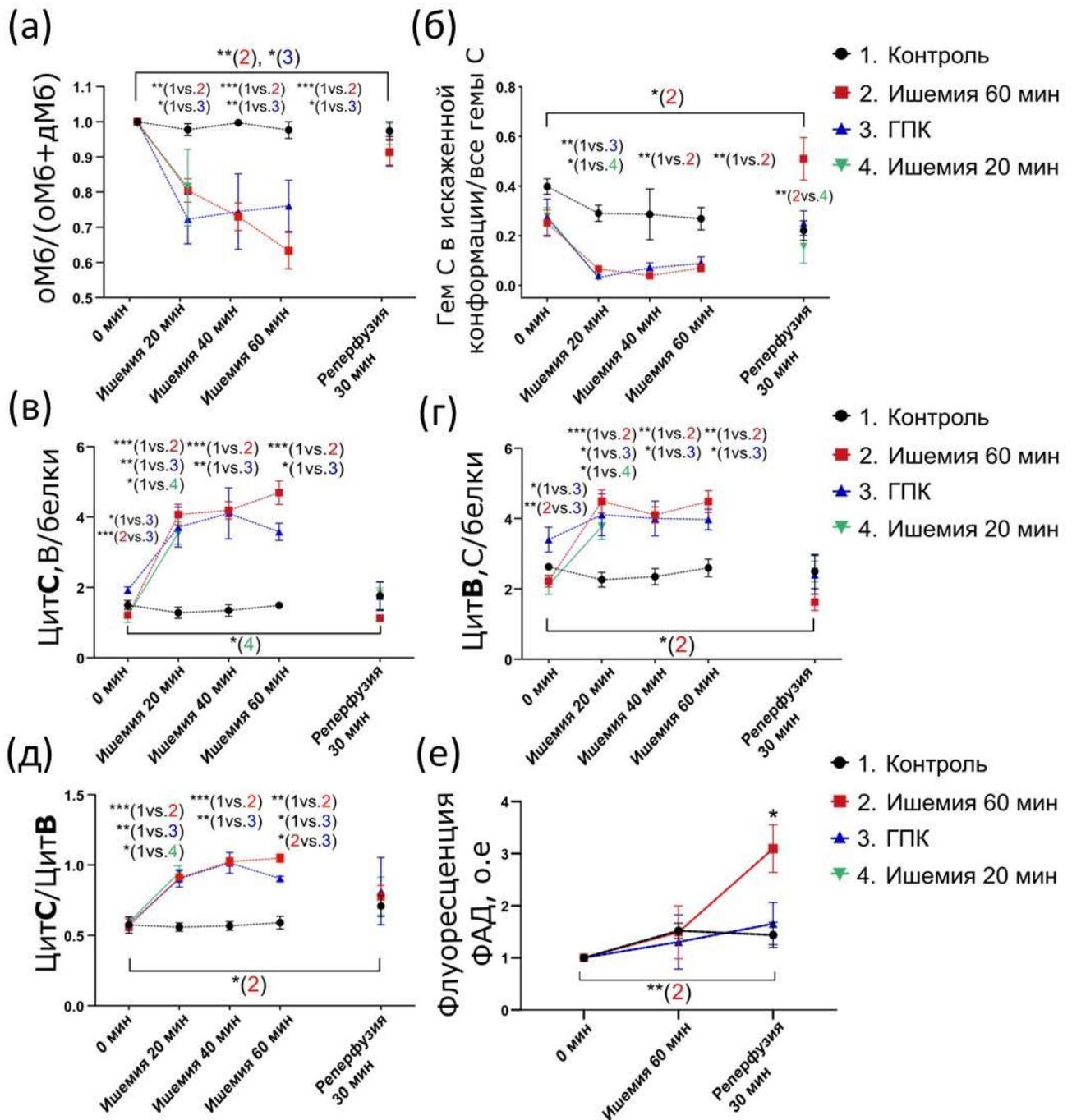


Рисунок 32. Изменение относительного содержания в кардиомиоцитах сердца: (а) оМб, (б) цитохрома С с гемом в искаженной конформации, (в) восстановленного Цит С, (г) восстановленного Цит В, (д) отношение содержания восстановленных ЦитС/Цит и (е) окисленного ФАД в комплексе II ЭТЦ. \*, \*\*, \*\*\* - значения  $p < 0.05, 0.01$  и  $0.001$  соответственно (критерий Манна-Уитни).

Изменение относительного содержания восстановленных Цит С к Цит В для серий спектров с разными моделями ишемии показана на Рисунке 32(д). В то время как, для контрольной серии этот параметр неизменен, для серии с краткой ишемией, длительной ишемией и с ГПК к 20 минуте происходит достоверное увеличение отношения по сравнению с контрольным значением. К 40 минуте происходит дальнейшее увеличение содержания восстановленного Цит С относительно Цит В для серии с длительной ишемией и с ГПК. Их динамика практически одинаковая. К 60 минуте ишемии отношение Цит С/Цит В снижается для серии с ГПК по сравнению с длительной ишемией, образуя достоверное отличие. В результате реперфузии анализируемый параметр снижается до исходных значений для всех серий, кроме длительной ишемии, у которой он достоверно более высокий по сравнению с 0 минутой. Следовательно, в ходе ишемии концентрация восстановленных Цит С увеличивается быстрее, чем восстановленных Цит В, однако для серии с ГПК эта динамика замедляется со временем. Это может объясняться тем, что относительное содержание небольшого подвижного переносчика Цит С в митохондриях больше по сравнению с внутримембранными комплексами ЭТЦ. Окисленный Цит С образует пул в межмембранном пространстве, и в условиях длительной ишемии постепенно восстанавливается, предотвращая перегрузку ЭТЦ электронами, что также может служить защитным механизмом против реперфузионного выброса АФК. Об этом косвенно свидетельствует остаточная концентрация восстановленного Цит С после 30-минутной реперфузии. В случае ГПК динамика отношения воспроизводится, однако на больших временах содержание восстановленного Цит С стабилизируется в отличие от длительной ишемии (что было показано и на Рисунке 32(с)). Возможно, это обусловлено тем, что вследствие ГПК дыхательная цепь работает менее активно, скорость переноса электронов снижена из-за более высокого  $\Delta\Psi$  на ВММ. Допустим, краткие периоды гипоксии приводят к накоплению внутриклеточного сигнала, который при пороговом значении активирует механизм поддержания оптимального  $\Delta\Psi$  на ВММ при следующем приступе гипоксии – выгодно, чтобы  $\Delta\Psi$  был более высоким, затрудняющим перенос электронов. Для этого еще в период нормоксии необходимо

увеличить  $\Delta\Psi$  за счет увеличения протонного градиента, что достигается либо ингибированием АТФ-синтазы, что также привело бы к некоторому восстановлению ЭТЦ, либо кратковременной активизацией электронного транспорта. Первое бы объяснило изначально более высокое содержание восстановленных Цит С и В в тканях сердца, подвергнутого ГПК.

Конформация гема Цит С также чувствительна к этапу ишемии/реперфузии (Рисунок 32(б)). Спустя 20 мин ишемии для всех моделей происходит снижение содержания искаженного гема С относительно общего пула Цит С. Этот результат может показаться неожиданным, так как на суспензии взаимодействующих гемопротеинов и на интактных митохондриях нами было показано, что искаженная конформация гема С затрудняет перенос электронов, а ингибирование ЭТЦ за счет блокировки АТФ-синтазы олигомицином приводит к увеличению вероятности искаженной конформации гема Цит С. Здесь же, в подвергшейся ишемии ткани сердца, мы наблюдаем обратную картину. Однако, в ходе ишемии, несмотря на то что работа ЭТЦ также ингибируется, переполняясь электронами, либо инициируется обратный ток электронов, АТФ-синтаза сохраняет функциональность и расходует протонный градиент на ВММ (Kang *et al.*, 2017). Как мы показали ранее, конформация гема Цит С в межмембранном пространстве становится плоской при снижении  $\Delta\Psi$ , что мы и наблюдаем на моделях ишемии. К 20-ой, 40-ой и 60-ой минутам ишемии относительное содержание гема С в искаженной конформации сохраняется на одном уровне для длительной ишемии и ишемии после ГПК и достоверно ниже соответствующих контрольных значений. Спустя 30 мин реперфузии этот параметр несколько возрастает для ишемии после ГПК, сравниваясь с контролем и значением для краткой ишемии. Однако для модели длительной ишемии происходит значительное увеличение относительного содержания Цит С с гемом в искаженной конформации в результате реперфузии, что превышает исходное значение на 0 минуте и достоверно выше соответствующего значения для краткой ишемии. Известно, что в ходе длительной ишемии АТФ-синтаза начинает работать, как АТФаза, гидролизуя АТФ и перенося протоны в ММП, что позволяет поддержать  $\Delta\Psi$ , но истощает пул АТФ и способствует обра-

зованию пор mPTP (mitochondrial permeability transition pore) во внутренней мембране митохондрий, что предшествует разрушению митохондрии (Mnatsakanyan and Jonas, 2020). На изолированных кардиомиоцитах при длительной ишемии такой компенсаторный метод поддерживает мембранный потенциал до 40-ой минуты (Vuorinen *et al.*, 1995). Есть данные об ингибировании АТФазы в ходе ишемии с целью сохранения АТФ, причем требовалась длительная реперфузия (до 120 мин), чтобы снять ингибирование, которое сохранялось даже при разрушении мембраны (Ylitalo *et al.*, 2001). Однако большее ингибирование АТФазы показано и при эпизодах ГПК, предшествующих глобальной ишемии (Vuorinen *et al.*, 1995). Поэтому мы предполагаем, что увеличенное содержание Цит С с гемом в искаженной конформации в модели длительной ишемии обусловлено не ингибированием АТФ-синтазы в ходе реперфузии, а фосфорилированием самого Цит С. В контрольных условиях при нормальном  $\Delta\Psi$  порядка 100-130 мВ молекулы Цит С находятся в фосфорилированном состоянии. При ишемии, когда истощается запас АТФ и потенциал на ВММ падает, снижается активность протеинкиназ, а активность фосфатаз, напротив, возрастает, в результате Цит С дефосфорилируется, что приводит к плоской конформации гема С. Последующая реперфузия вызывает резкое увеличение  $\Delta\Psi$  до 140 мВ, ВММ гиперполяризуется, и возрастает риск выброса АФК. С другой стороны, в этих условиях вновь активируются киназы. Мы предполагаем, что с течением времени реперфузия нормализует избыточную активность ЭТЦ за счет активного фосфорилирования Цит С, в результате которого гем С принимает искаженную конформацию и замедляет транспорт электронов.

Мы также оценили флуоресценцию окисленного флавин аденин динуклеотида (ФАД), являющегося коферментом комплекса II. ФАД окисляет сукцинат до fumarата, выступая таким образом участником цикла Кребса, и переходит в восстановленную форму ФАДН<sub>2</sub>. Затем его окисляют железо-серные кластеры Комплекса II, и электроны транспортируются дальше по ЭТЦ на комплекс III. На Рисунке 32(ф) видно, что реперфузия после длительной ишемии приводит к резкому усилению флуоресценции ФАД в отличие от контрольной серии и ишемии с ГПК, что говорит об активном переносе электронов на Комплексе II в ходе ре-

перфузии. Это объясняется ускорением работы ЭТЦ вследствие появления кислорода и резкой «разгрузки» дыхательной цепи. Однако реперфузия при ГПК вовсе не вызывает подобного эффекта, напротив, значения флуоресценции ФАД не отличаются от контрольных. Следовательно, при ГПК кислородное насыщение не приводит к ускорению электронного транспорта на уровне комплекса II за счет окисления сукцината. Это также согласуется с предположением, что ГПК накладывает некоторое ингибирование на скорость переноса электронов по ЭТЦ.

### 3.5.3. Влияние ГПК на динамику редокс-состояния цитохромов С и В и оксигенацию Мб в ходе реперфузии

Мы проанализировали динамику относительного содержания оМб в течение первых 10 минут реперфузии для разных моделей ишемии. Как было показано выше, 30-минутная реперфузия приводит к полному восстановлению содержания оМб в сердце после краткой ишемии 20 минут, но не после длительной ишемии 60 минут и ишемии с ГПК – для этих двух случаев содержание оМб после реперфузии несколько ниже, чем до ишемии.

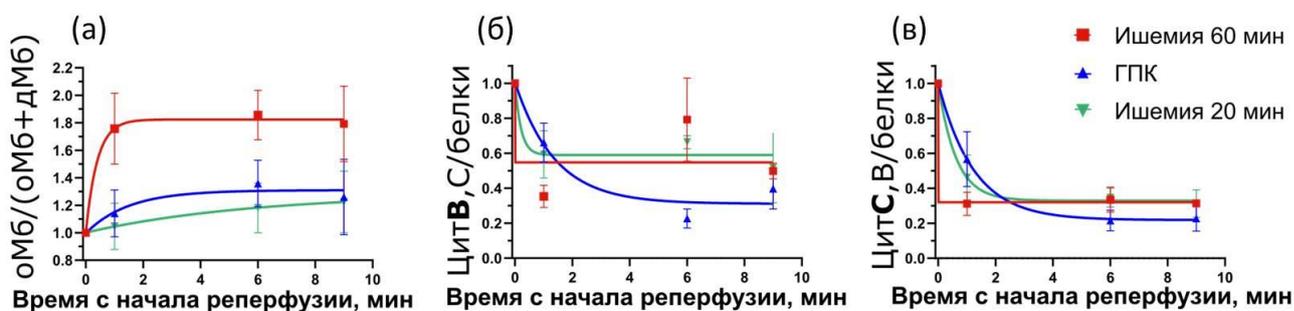


Рисунок 33. Динамика изменения относительного содержания оМб (а), динамика изменения содержания восстановленных Цит С (б) и Цит В (в) в тканях изолированного сердца крысы в течение реперфузии после длительной ишемии 60 мин (красная линия), после длительной ишемии с ГПК (синяя линия), после краткой ишемии 20 мин (зеленая линия). Данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего по измерениям на нескольких сердцах за 1, 6 и 9 минуты реперфузии. Кривые аппроксимации представляют экспоненты, соответствующие формулы приведены над кривыми.

Однако на рисунке 33(а) видно, что скорость оксигенирования дМб в ходе реперфузии наибольшая именно для длительной ишемии 60 минут. В течение первой минуты реперфузии содержание оМб резко возрастает и достигает плато, которое сохраняется вплоть до 10-ой минуты. В то же время динамика реоксигенации дМб в ходе реперфузии после краткой ишемии 20 минут наиболее медленная и сравнима с динамикой для ишемии после ГПК. Относительное содержание оМб в последних двух моделях ишемии к 10-ой минуте реперфузии примерно в полтора раза ниже, чем в модели ишемии 60 минут. Можно предположить, что длительная ишемия приводит к увеличению проницаемости микрососудов и более активному поступлению кислорода к тканям так, что пул дМб стремительно оксигенируется. Действительно, согласно исследованиям повреждения коронарных микрососудов собаки в ходе ишемии, даже 15-минутная остановка притока крови на 50% увеличивала индекс утечки белка через стенки сосудов, а к 60-ой минуте индекс увеличивался в три раза по сравнению с контролем. Индекс утечки белка оценивали по накоплению вне сосудов белка с радио-активной меткой. Примечательно, что признаки нарушения сосудов по электронной микрофотографии *in vitro* были обнаружены на образцах ткани, подвергшихся 60-минутной ишемии, но не 15-ти минутной. Однако способность к расслаблению гладкой мускулатуры сосудов (что обеспечивает регуляцию притока крови), зависящая от целостности эндотелия, была нарушена на образцах уже после 15-минутной ишемии (Dauber *et al.*, 1990). Авторы подытожили, что функциональные нарушения микрососудов начинаются при краткой ишемии и прогрессируют с ее продолжительностью. Наши наблюдения различий в динамике оксигенации дМб (Рисунок 33(а)) в зависимости от продолжительности ишемии подтверждают это предположение. Также известно, что ГПК на моделях ишемии тканей разных животных, в том числе миокарда крыс (Richard и др., 1994) и лучевой артерии человека (Kharbanda *et al.*, 2001), приводит к уменьшению эндотелиального повреждения сосудов, что объяснило бы снижение скорости оксигенации дМб в модели с ГПК по сравнению с просто длительной ишемией в нашем исследовании.

Наиболее быстрое снижение относительного содержания восстановленных цитохромов С и В на Рисунке 33(б, в) в ходе реперфузии также свойственно модели 60-минутной ишемии. ЭТЦ окисляется, освобождаясь от электронов за счет более активного поступления кислорода. Для краткой 20-минутной ишемии эта динамика только чуть более плавная, что контрастирует с медленной оксигенацией дМб на Рисунке 33(а). Возможно, поступающего кислорода в модели с краткой ишемией достаточно для быстрого восстановления элементов дыхательной цепи, и образующийся оМб отдает кислород на 4 комплекс ЭТЦ, поэтому мы видим быстрое окисление цитохромов при относительно медленной реоксигенации дМб. В то же время при длительной ишемии, сопровождающейся большим эндотелиальным повреждением, приток кислорода достаточен и для окисления ЭТЦ, и для формирования пула вновь оксигенированного Мб. К 10-ой минуте реперфузии относительное содержание восстановленных цитохромов в моделях краткой и длительной ишемии одинаково. Однако для ишемии после ГПК наблюдается более медленное окисление цитохромов и одновременно более полное. Так, к 10-ой минуте реперфузии содержание восстановленных цитохромов в модели ишемии с ГПК наиболее низкое. Более медленное окисление цитохромов ЭТЦ в ходе реперфузии можно рассматривать, как протекторный эффект, предотвращающий всплеск АФК.

Мы показали, что наиболее выраженное влияние на редокс-состояние цитохромов ЭТЦ сердца крысы и оксигенацию-дезоксигенацию Мб оказывает длительная 60-минутная ишемия с последующей реперфузией, в результате которой компоненты ЭТЦ оказываются окислены. Можно заключить, что длительная ишемия приводит к последовательной дезоксигенации внутриклеточного пула оМб, который отдает кислород, восстанавливаемый до воды на IV комплексе ЭТЦ. При этом Цит С выступает в качестве накопителя избыточных электронов ЭТЦ, которые из-за нехватки кислорода не успевают покинуть дыхательную цепь и перегружают ее. В связи с этим на протяжении ишемии мы наблюдаем увеличение содержания восстановленного Цит С относительно Цит В. Наконец, стремительная и полная оксигенация дМб на первых минутах реперфузии вкпе с быст-

рым окислением цитохромов С и В и ростом флуоресценции ФАД говорят о резкой активизации электронного транспорта вследствие окисления комплексов ЭТЦ кислородом, что является фактором избыточной продукции АФК. Это может быть следствием повышения проницаемости микрососудов в ходе длительной ишемии, что приводит к активному поступлению кислорода к клеткам. Гипертоническое прекондиционирование нивелирует этот эффект за счет предположительно предотвращения эпителиального повреждения сосудов, в результате ограничивая приток кислорода к клеткам в ходе реперфузии, что приводит к замедлению окисления цитохромов ЭТЦ и реоксигенации Мб. Возможно также ГПК обеспечивает некоторое ингибирование ЭТЦ, так как на 0 минуте наблюдается увеличение содержания восстановленных цитохромов, а в ходе ишемии происходит замедление динамики восстановления Цит С относительно Цит В и замедление дезоксигенирования оМб по сравнению с чистой ишемией, что свидетельствует о снижении скорости транспортировки электронов.

### **3.6. Динамика содержания $H_2O_2$ в изолированных зрелых кардиомиоцитах при длительной гипоксии/реоксигенации и при гипоксии/реоксигенации с гипоксическим прекондиционированием**

Чтобы детальнее изучить механизм гипоксического прекондиционирования, предотвращающего избыточное окисление компонентов ЭТЦ в ходе реперфузии изолированных сердец по сравнению с просто длительной ишемией, мы обратились к данным о генерации АФК в митохондриях. Возможный адаптационный механизм ГПК заключается в меньшем выбросе сильного окислителя — пероксида водорода, образуемого из супероксид анион радикала, основным источником которого являются I и III комплексы ЭТЦ митохондрий. Чтобы проверить это предположение, мы оценили влияние ГПК с последующей длительной 35-минутной гипоксией и 15-минутной реоксигенацией на образование  $H_2O_2$  в матриксе митохондрий зрелых кардиомиоцитов, выделенных из сердца взрослых крыс.

Для оценки относительного содержания  $H_2O_2$  в матриксе митохондрий был использован биосенсор HyPer7-mito, интенсивность флуоресценции которого

возрастает с увеличением концентрации  $H_2O_2$ . Соответствующий параметр рассчитывали как отношение интенсивностей флуоресценции при возбуждении флуоресценции сенсора, окисленного  $H_2O_2$ , и при возбуждении восстановленного сенсора. Мы обнаружили, что даже краткая 5-минутная гипоксия (в ходе ГПК таких этапов, сопровождаемых 5-минутными этапами реоксигенации, было 3) приводила к повышению уровня пероксида водорода на 12-15% по сравнению с базовым уровнем (Рисунок 34(a)). Начало последующей длительной гипоксии также сопровождалось возрастанием продукции  $H_2O_2$ , однако, к 35-ой минуте этот показатель последовательно медленно снижался. В то же время при сравнении полученных результатов с динамикой содержания  $H_2O_2$  в клетках, не подвергшихся ГПК, выяснилось, что те в ответ на длительную гипоксию начинают более интенсивно продуцировать пероксид водорода (на 25-30%) по сравнению с базовым уровнем (Рисунок 34). К 35-ой минуте гипоксии уровень  $H_2O_2$  значительно выше соответствующего для клеток, подвергшихся ГПК.

В конце каждой из серий экспериментов к суспензии клеток вносили 200 мкМ  $H_2O_2$ . Было установлено (Рисунок 35), что клетки, подвергшиеся ГПК, развивают менее выраженный ответ (увеличение параметра в 2,5 раза) по сравнению с клетками, испытавшими только гипоксию и реоксигенацию (в 3,25 раз)

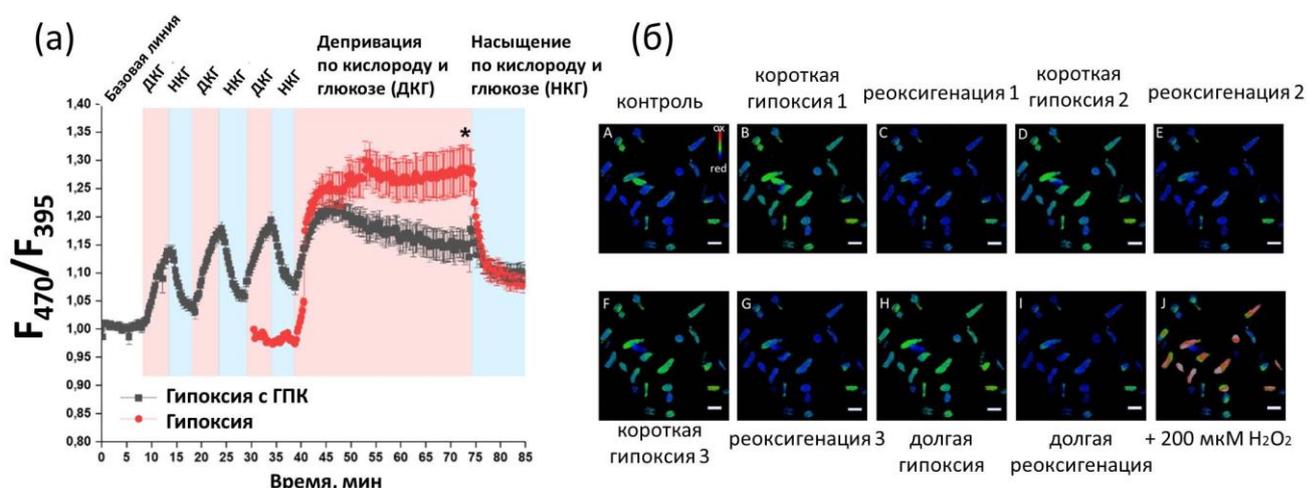


Рисунок 34. (а) Динамика изменения уровня  $H_2O_2$  в матриксе митохондрий кардиомиоцитов в условиях гипоксии/реоксигенации с прекондиционированием (серая кривая) и без него (красная кривая). Сигнал биосенсора HyPer7-mito (соотношение  $F_{470}/F_{395}$ ) нормализован и усреднен. Количество клеток  $n=43$  и  $40$ , количество экспериментальных повторностей  $N=3$ , планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего. (б) Серия микроскопических изображений кардиомиоцитов с HyPer7-mito из протокола гипоксии/реоксигенации с ГПК. Условная цветовая шкала обозначает окислительно-восстановительное состояние сенсора. Синий цвет соответствует восстановленному состоянию, более желтый и красный – окисленному.

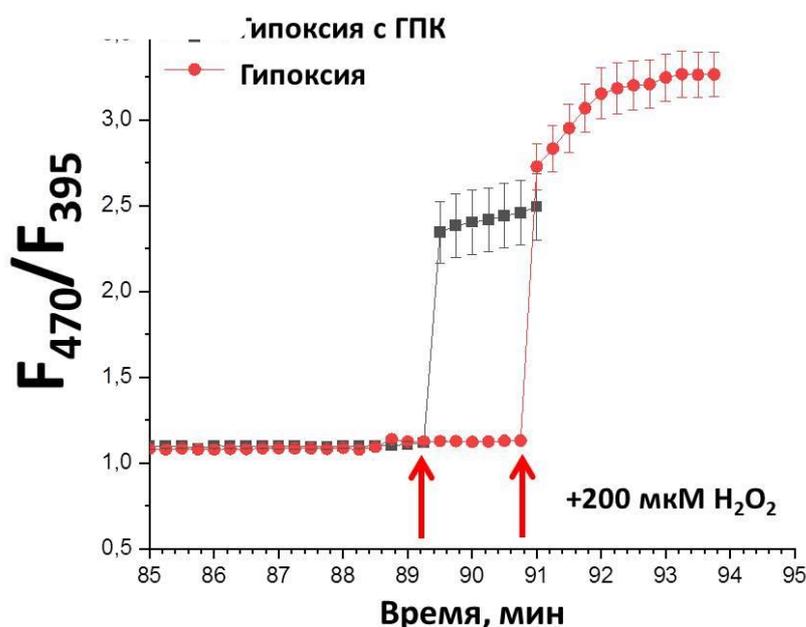


Рисунок 35. Динамика изменения уровня  $H_2O_2$  в матриксе митохондрий кардиомиоцитов, испытавших и не испытавших прекондиционирование, в ответ на экзогенную добавку  $200 \text{ мкМ } H_2O_2$ . Сигнал биосенсора HyPer7-mito (соотношение  $F_{470}/F_{395}$ ) нормализован и усреднен. Количество клеток  $n=43$  и  $40$ , количество экспериментальных повторностей  $N=3$ , планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

Таким образом, результаты флуоресцентного анализа уровня продукции  $H_2O_2$  в зрелых кардиомиоцитах, подвергшихся ишемии с ГПК и без него, согласуются с результатами КР-спектроскопии, полученными на изолированных серд-

цах. Меньшая продукция  $H_2O_2$  в кардиомицитах в ходе ишемии после ГПК коррелирует с меньшим окислением цитохромов в ходе реперфузии сердца в тех же условиях. Мы предполагаем, что защитный адаптационный механизм preconditionирования связан с активацией антиоксидантных систем клеток, что делает их более устойчивыми к длительным и интенсивным внешним воздействиям.

### 3.7. 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  $\Omega$ -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 дает возможность 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 протонофора СССР 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 прекондиционирование, 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.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adar F., Erecinska M. Spectral evidence for interactions between membrane-bound hemes: Resonance Raman spectra of mitochondrial cytochrome *b-c*<sub>1</sub> complex as a function of redox potential // *FEBS Letters*. – 1977. – Т. 80, № 1. – С. 195–200.
2. Alam P., Maliken B.D., Ivey M.J., Jones S.M., Kanisicak O. Isolation, Transfection, and Long-Term Culture of Adult Mouse and Rat Cardiomyocytes // *Journal of Visualized Experiments*. – 2020. – № 164. – С. 61073.
3. Alessi M., Hagarman A.M., Soffer J.B., Schweitzer-Stenner R. In-plane deformations of the heme group in native and nonnative oxidized cytochrome *c* probed by resonance Raman dispersion spectroscopy // *Journal of Raman Spectroscopy*. – 2011. – Т. 42, № 5. – С. 917–925.
4. Alvarez-Paggi D., Hannibal L., Castro M.A., Oviedo-Rouco S., Demicheli V., Tórtora V., Tomasina F., Radi R., Murgida D.H. Multifunctional Cytochrome *c*: Learning New Tricks from an Old Dog // *Chemical Reviews*. – 2017. – Т. 117, № 21. – С. 13382–13460.
5. Anibh M. Das. Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2003. – Т. 79. – С. 71–82.
6. Ascenzi P., Di Masi A., Leboffe L., Fiocchetti M., Nuzzo M.T., Brunori M., Marino M. Neuroglobin: From structure to function in health and disease // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2016. – Т. 52. – С. 1–48.
7. Barkigia K.M., Chantranupong L., Smith K.M., Fajer J. Structural and theoretical models of photosynthetic chromophores. Implications for redox, light-absorption properties and vectorial electron flow // *Journal of the American Chemical Society*. – 1988. – Т. 11, № 22. – С. 7566–7567.

8. Bazylewski P., Divigalpitiya R., Fanchini G. In situ Raman spectroscopy distinguishes between reversible and irreversible thiol modifications in L-cysteine // *RSC Advances*. – 2017. – T. 7, № 5. – C. 2964–2970.
9. Bellei M., Bortolotti C.A., Di Rocco G., Borsari M., Lancellotti L., Ranieri A., Sola M., Battistuzzi G. The influence of the Cys46/Cys55 disulfide bond on the redox and spectroscopic properties of human neuroglobin // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2018. – T. 178. – C. 70–86.
10. Bentmann A., Schmidt M., Reuss S., Wolfrum U., Hankeln T., Burmester T. Divergent Distribution in Vascular and Avascular Mammalian Retinae Links Neuroglobin to Cellular Respiration // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – T. 280, № 21. – C. 20660–20665.
11. Berezhna S., Wohlrab H., Champion P.M. Resonance Raman Investigations of Cytochrome *c* Conformational Change upon Interaction with the Membranes of Intact and Ca<sup>2+</sup>-Exposed Mitochondria // *Biochemistry*. – 2003. – T. 42, № 20. – C. 6149–6158.
12. Berghuis A.M., Brayer G.D. Oxidation state-dependent conformational changes in cytochrome *c* // *Journal of Molecular Biology*. – 1992. – T. 223, № 4. – C. 959–976.
13. Berndtsson J., Kohler A., Rathore S., Marin-Buera L., Dawitz H., Diessl J., Kohler V., Barrientos A., Büttner S., Fontanesi F., Ott M. Respiratory supercomplexes enhance electron transport by decreasing cytochrome *c* diffusion distance // *EMBO reports*. – 2020. – T. 21, № 12. – C. e51015.
14. Bertini I., Cavallaro G., Rosato A. A structural model for the adduct between cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase // *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. – 2005. – T. 10, № 6. – C. 613–624.
15. Bertini I., Cavallaro G., Rosato A. Cytochrome *c*: Occurrence and Functions // *Chemical Reviews*. – 2006. – T. 106, № 1. – C. 90–115.
16. Bikiel D.E., Forti F., Boechi L., Nardini M., Luque F.J., Martí M.A., Estrin, D.A. Role of Heme Distortion on Oxygen Affinity in Heme Proteins: The Protoglobin

- Case // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – Т. 114, № 25. – С. 8536–8543.
17. Bochkova Z.V., Liu W., Brazhe N.A., Zhgun A.A., Maksimov G.V. A raman spectroscopic investigation of conformation of flavin adenine dinucleotide, a coenzyme of d-amino acid oxidase // *Биофизика*. – 2023. – Т. 68, № 5. – С. 878–884.
  18. Boehning D., Patterson R.L., Sedaghat L., Glebova N.O., Kurosaki T., Snyder, S.H. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis // *Nature Cell Biology*. – 2003. – Т. 5, № 12. – С. 1051–1061.
  19. Bønding S.H., Henty K., Dingley A.J., Brittain T. The binding of cytochrome c to neuroglobin: A docking and surface plasmon resonance study // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2008. – Т. 43, № 3. – С. 295–299.
  20. Bowman S.E.J., Bren K.L. The chemistry and biochemistry of heme c: functional bases for covalent attachment // *Natural Product Reports*. – 2008. – Т. 25, № 6. – С. 1118.
  21. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. New Insight into Erythrocyte through *In Vivo* Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // *Biophysical Journal*. – 2009. – Т. 97, № 12. – С. 3206–3214.
  22. Brazhe N.A., Evlyukhin A.B., Goodilin E.A., Semenova A.A., Novikov S.M., Bozhevolnyi S.I., Chichkov B.N., Sarycheva A.S., Baizhumanov A.A., Nikelshparg E.I., Deev L.I., Maksimov E.G., Maksimov G.V., Sosnovtseva O. Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*. – 2015. – Т. 5, No 1. – С. 13793.
  23. 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., Rubin A.B. SERS uncovers the link between conformation of cytochrome c

- heme and mitochondrial membrane potential // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2023. – T. 196. – C. 133–144.
24. Brazhe N.A., Treiman M., Brazhe A.R., Find N.L., Maksimov G.V., Sosnovtseva O.V. Mapping of Redox State of Mitochondrial Cytochromes in Live Cardiomyocytes Using Raman Microspectroscopy // *PLOS ONE*. – 2012. – T. 7, № 9 – e41990.
  25. Brazhe N.A., Treiman M., Faricelli B., Vestergaard J.H., Sosnovtseva O. In Situ Raman Study of Redox State Changes of Mitochondrial Cytochromes in a Perfused Rat Heart // *PLOS ONE*. – 2013. – T. 8, № 8.
  26. Brittain T., Skommer J., Raychaudhuri S., Birch N. An Antiapoptotic Neuroprotective Role for Neuroglobin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2010. – T. 11, № 6. – C. 2306–2321.
  27. Chertkova R.V., Brazhe N.A., Bryantseva T.V., Nekrasov A.N., Dolgikh D.A., Yusipovich A.I., Sosnovtseva O., Maksimov G.V., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P. New insight into the mechanism of mitochondrial cytochrome c function // *PLOS ONE*. – 2017. – T. 12, № 5. – C. e0178280.
  28. Chertkova R.V., Bryantseva T.V., Brazhe N.A., Kudryashova K.S., Revin V.V., Nekrasov A.N., Yusipovich A.I., Brazhe A.R., Rubin A.B., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Maksimov G.V. Amino Acid Substitutions in the Non-Ordered  $\Omega$ -Loop 70–85 Affect Electron Transfer Function and Secondary Structure of Mitochondrial Cytochrome c // *Crystals*. – 2021. – T. 11, № 8. – C. 973.
  29. 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  $\Omega$ -Loop Enhance the Membrane-Permeabilizing and Peroxidase-like Activity of Cytochrome c // *Biomolecules*. – 2022. – T. 12, № 5. – C. 665.
  30. Ciaccio C., Tognaccini L., Battista T., Cervelli M., Howes B.D., Santucci R., Coletta M., Mariottini P., Smulevich G., Fiorucci L. The Met80Ala and

- Tyr67His/Met80Ala mutants of human cytochrome c shed light on the reciprocal role of Met80 and Tyr67 in regulating ligand access into the heme pocket // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2017. – T. 169. – C. 86–96.
31. Ciccone L., Nencetti S., Socci S., Orlandini E. Neuroglobin and neuroprotection: the role of natural and synthetic compounds in neuroglobin pharmacological induction // *Neural Regeneration Research*. – 2021. – T. 16, № 12. – C. 2353.
  32. Cuesta L., Sessler J.L.  $\pi$ -Metal complexes of tetrapyrrolic systems. A novel coordination mode in “porphyrin-like” chemistry // *Chemical Society Reviews*. – 2009. – T. 38, № 9. – C. 2716
  33. Dauber I.M., VanBenthuyzen K.M., McMurtry I.F., Wheeler G.S., Lesnefsky E.J., Horwitz L.D., Weil J.V. Functional coronary microvascular injury evident as increased permeability due to brief ischemia and reperfusion. // *Circulation Research*. – 1990. – T. 66, № 4. – C. 986–998.
  34. De Simone G., Sbardella D., Oddone F., Pesce A., Coletta M., Ascenzi P. Structural and (Pseudo-)Enzymatic Properties of Neuroglobin: Its Possible Role in Neuroprotection // *Cells*. – 2021. – T. 10, № 12. – C. 3366.
  35. Delfino I., Bizzarri A.R., Cannistraro S. Single-molecule detection of yeast cytochrome c by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // *Biophysical Chemistry*. – 2005. – T. 113, № 1. – C. 41–51.
  36. Dewilde S., Kiger L., Burmester T., Hankeln T., Baudin-Creuzza V., Aerts T., Marden M.C., Caubergs R., Moens L. Biochemical Characterization and Ligand Binding Properties of Neuroglobin, a Novel Member of the Globin Family // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – T. 276, № 42. – C. 38949–38955.
  37. Diaz R. Enhanced cell volume regulation: a key protective mechanism of ischemic preconditioning in rabbit ventricular myocytes // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2003. – T. 35, № 1. – C. 45–58.
  38. Dragomir I., Hagarman A., Wallace C., Schweitzer-Stenner R. Optical Band Splitting and Electronic Perturbations of the Heme Chromophore in Cytochrome c at Room Temperature Probed by Visible Electronic Circular Dichroism Spectroscopy // *Biophysical Journal*. – 2007. – T. 92, № 3. – C. 989–998.

39. Eremina O.E., Semenova A.A., Sergeeva E.A., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Shekhovtsova T.N., Goodilin E.A., Veselova Russ I.A. // *Chem. Rev.* – 2018, – T. 8, № 87. – C. 741–770.
40. Fago A., Hundahl C., Malte H., Weber R.E. Functional Properties of Neuroglobin and Cytoglobin. Insights into the Ancestral Physiological Roles of Globins // *IUBMB Life.* – 2004. – T. 56, № 11–12. – C. 689–696.
41. Fago A., Mathews A.J., Brittain T. A role for neuroglobin: Resetting the trigger level for apoptosis in neuronal and retinal cells // *IUBMB Life.* – 2008. – T. 60, № 6. – C. 398–401.
42. Fago A., Mathews A.J., Moens L., Dewilde S., Brittain T. The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome *b*<sub>5</sub> and cytochrome *c* // *FEBS Letters.* – 2006. – T. 580, № 20. – C. 4884–4888.
43. Feng Y., Liu X.-C., Li L., Gao S.-Q., Wen G.-B., Lin Y.-W. Naturally Occurring I81N Mutation in Human Cytochrome *c* Regulates Both Inherent Peroxidase Activity and Interactions with Neuroglobin // *ACS Omega.* – 2022. – T. 7, № 13. – C. 11510–11518.
44. Fiocchetti M., Cracco P., Montalesi E., Solar Fernandez V., Stuart J.A., Marino M. Neuroglobin and mitochondria: The impact on neurodegenerative diseases // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2021. – T. 701. – C. 108823.
45. Frenzel M., Rommelspacher H., Sugawa M., Dencher N. Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex // *Experimental Gerontology.* – 2010. – T. 45. – C. 563–572.
46. García-Heredia J.M., Díaz-Quintana A., Salzano M., Orzáez M., Pérez-Payá E., Teixeira M., De La Rosa M.A., Díaz-Moreno I. Tyrosine phosphorylation turns alkaline transition into a biologically relevant process and makes human cytochrome *c* behave as an anti-apoptotic switch // *J Biol Inorg Chem.* – 2011. – T. 16. – C. 1155–1168.
47. Gillani S., Cao J., Suzuki T., Hak D.J. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle // *Injury.* – 2012. – T. 43, № 6. – C. 670–675.

48. Gnaiger E., Mitochondrial Pathways to Complex I: Respiration with Pyruvate, Glutamate and Malate. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. 2nd ed: C. 7-15, 2008.
49. Guidolin D., Agnati L.F., Tortorella C., Marcoli M., Maura G., Albertin G., Fuxe K. Neuroglobin as a regulator of mitochondrial-dependent apoptosis: A bioinformatics analysis // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2014. – T. 33, № 1. – C. 111–116.
50. Guimarães B.G., Hamdane D., Lechauve C., Marden M.C., Golinelli-Pimpaneau B. The crystal structure of wild-type human brain neuroglobin reveals flexibility of the disulfide bond that regulates oxygen affinity // *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. – 2014. – T. 70, № 4. – C. 1005–1014.
51. Hamdane D., Kiger L., Dewilde S., Green B.N., Pesce A., Uzan J., Burmester T., Hankeln T., Bolognesi M., Moens L., Marden M.C. Coupling of the heme and an internal disulfide bond in human neuroglobin // *Micron*. – 2004. – T. 35, № 1–2. – C. 59–62.
52. Hardison R.C. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – T. 93, № 12. – C. 5675–5679.
53. He S., Li, Q., Huang Q., Cheng J. Targeting Protein Kinase C for Cancer Therapy // *Cancers*. – 2022. – T. 14, № 5. – C. 1104.
54. Hu S., Morris I.K., Singh J.P., Smith K.M., Spiro T.G. Complete assignment of cytochrome c resonance Raman spectra via enzymic reconstitution with isotopically labeled hemes // *Journal of the American Chemical Society*. – 1993. – T. 115, № 26. – C. 12446–12458.
55. Hu S., Smith K.M., Spiro T.G. Assignment of Protoheme Resonance Raman Spectrum by Heme Labeling in Myoglobin // *Journal of the American Chemical Society*. – 1996. – T. 118, № 50. – C. 12638–12646.
56. Hüttemann M, Nantwi KD, Lee I, Liu J, Mohiuddin S, Petrov T. Theophylline treatment improves mitochondrial function after upper cervical spinal cord hemisection. // *Exp Neurol*. – 2010 – T. 223. – C. 523–528.

57. Hüttemann M., Lee, I., Grossman L.I., Doan J.W., Sanderson T.H. Phosphorylation of Mammalian Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Oxidase in the Regulation of Cell Destiny: Respiration, Apoptosis, and Human Disease. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York, – T. 748. – C. 237–264, 2012.
58. Imada Y., Nakamura H., Takano Y. Density functional study of porphyrin distortion effects on redox potential of heme // Journal of Computational Chemistry. – 2018. – T. 39, № 3. – C. 143–150.
59. Jentzen W., Ma J.-G., Shelnett J.A. Conservation of the Conformation of the Porphyrin Macrocycle in Hemoproteins // Biophysical Journal. – 1998. – T. 74, № 2. – C. 753–763.
60. Jentzen W., Simpson M.C., Hobbs J.D., Song X., Ema T., Nelson N.Y., Medforth C.J., Smith K.M., Veyrat M., Mazzanti M., Ramasseu R. Ruffling in a Series of Nickel(II) meso-Tetrasubstituted Porphyrins as a Model for the Conserved Ruffling of the Heme of Cytochromes *c* // J. Am. Chem. Soc. – 1995. – № 117. – C. 11085–11097.
61. Jordan T., Eads J.C., Spiro T.G. Secondary and tertiary structure of the A-state of cytochrome *c* from resonance Raman spectroscopy // Protein Science. – 1995. – T. 4, № 4. – C. 716–728.
62. Josephs T.M., Hibbs M.E., Ong L., Morison I.M., Ledgerwood E.C. Interspecies Variation in the Functional Consequences of Mutation of Cytochrome *c* // PLOS ONE. – 2015. – T. 10, № 6. – C. e0130292.
63. Jüllig M., Hickey A.J.R., Chai C.C., Skea G.L., Middleditch M.J., Costa S., Choong S.Y., Philips A.R.J., Cooper G.J.S. Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats // PROTEOMICS. – 2008. – T. 8, № 12. – C. 2556–2572.
64. Kakita M., Kaliaperumal V., Hamaguchi H. Resonance Raman quantification of the redox state of cytochromes *b* and *c* *in-vivo* and *in-vitro* // Journal of Biophotonics. – 2012. – T. 5, № 1. – C. 20–24.

65. Kalpage H.A., Bazylianska V., Recanati M.A., Fite A., Liu J., Wan J., Mantena N., Malek M.H., Podgorski I., Heath E.I., Vaishnav A., Edwards B.F., Grossman L.I., Sanderson T.H., Lee I., Huttemann M. Tissue-specific regulation of cytochrome *c* by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis // *The FASEB Journal*. – 2019. – T. 33, № 2. – C. 1540–1553.
66. Kalpage H.A., Wan J., Morse P.T., Zurek M.P., Turner A.A., Khobeir A., Yazdi N., Hakim L., Liu J., Vaishnav A., Sanderson T.H., Recanati M.-A., Grossman L.I., Lee I., Edwards B.F.P., Hüttemann M. Cytochrome *c* phosphorylation: Control of mitochondrial electron transport chain flux and apoptosis // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2020. – T. 121. – C. 105704.
67. Kang P.T., Chen C.-L., Lin P., Chilian W.M., Chen Y.-R. Impairment of pH gradient and membrane potential mediates redox dysfunction in the mitochondria of the post-ischemic heart // *Basic Research in Cardiology*. – 2017. – T. 112, № 4. – C. 36.
68. Kharbanda R.K., Peters M., Walton B., Kattenhorn M., Mullen M., Klein N., Vallance P., Deanfield J., MacAllister R. Ischemic Preconditioning Prevents Endothelial Injury and Systemic Neutrophil Activation During Ischemia-Reperfusion in Humans In Vivo // *Circulation*. – 2001. – T. 103, № 12. – C. 1624–1630.
69. Kingsbury C.J., Senge M.O. The shape of porphyrins // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2021. – T. 431. – C. 213760.
70. Kneipp J., Kneipp H., Kneipp K. Two-photon vibrational spectroscopy for biosciences based on surface-enhanced hyper-Raman scattering // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – T. 103, № 46. – C. 17149–17153.
71. Kneipp J., Kneipp H., Wittig B., Kneipp K. Novel optical nanosensors for probing and imaging live cells // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2010. – T. 6. – C. 214–226.

72. Kneipp K., Kneipp H., Kneipp J. Surface-Enhanced Raman Scattering in Local Optical Fields of Silver and Gold Nanoaggregates From Single-Molecule Raman Spectroscopy to Ultrasensitive Probing in Live Cells // *Accounts of Chemical Research*. – 2006. – T. 39, № 7. – C. 443–450.
73. Koizumi C., Duanebrown W. A peroxidative mechanism for the nonenzymatic reduction of metmyoglobin // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 1972. – T. 264, № 1. – C. 17–24.
74. Kondo H.X., Fujii M., Tanioka T., Kanematsu Y., Yoshida T., Takano Y. Global Analysis of Heme Proteins Elucidates the Correlation between Heme Distortion and the Heme-Binding Pocket // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2022. – T. 62, № 4. – C. 775–784.
75. Kondo H.X., Takano Y. Analysis of Fluctuation in the Heme-Binding Pocket and Heme Distortion in Hemoglobin and Myoglobin // *Life*. – 2022. – T. 12, № 2. – C. 210.
76. Kriegl J.M., Bhattacharyya A.J., Nienhaus K., Deng P., Minkow O., Nienhaus G.U. Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – T. 99, № 12. – C. 7992–7997.
77. Kubo M., Gruia F., Benabbas A., Barabanschikov A., Montfort W.R., Maes E.M., Champion P.M. Low-Frequency Mode Activity of Heme: Femtosecond Coherence Spectroscopy of Iron Porphine Halides and Nitroporphyrin // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – T. 130, № 30. – C. 9800–9811.
78. Laane J., Kiefer W. Determination of frequency shifts by Raman difference spectroscopy // *The Journal of Chemical Physics*. – 1980. – T. 72, № 10. – C. 5305–5311.
79. Laane J., Kiefer W. Measurement of Solvent Shifts by Raman Difference Spectroscopy // *Applied Spectroscopy*. – 1981. – T. 35, № 3. – C. 267–271.
80. Lange C., Hunte C. Crystal structure of the yeast cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex with its bound substrate cytochrome *c* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – T. 99, № 5. – C. 2800–2805.

81. Levantino M., Huang Q., Cupane A., Laberge M., Hagarman A., Schweitzer-Stenner R. The importance of vibronic perturbations in ferrocytochrome *c* spectra: A reevaluation of spectral properties based on low-temperature optical absorption, resonance Raman, and molecular-dynamics simulations // *The Journal of Chemical Physics*. – 2005. – T. 123, № 5. – C. 054508.
82. Liptak M.D., Wen X., Bren K.L. NMR and DFT Investigation of Heme Ruffling: Functional Implications for Cytochrome *c* // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – T. 132, №28. – C. 9753–9763.
83. Ma J.-G., Zhang J., Franco R., Jia S.-L., Moura I., Moura J.J.G., Kroneck P.M.H., Shelnutt J.A. The Structural Origin of Nonplanar Heme Distortions in Tetraheme Ferricytochromes *c*<sub>3</sub> // *Biochemistry*. – 1998. – T. 37, № 36. – C. 12431–12442.
84. Maneg O., Malatesta F., Ludwig B., Drosou V. Interaction of cytochrome *c* with cytochrome oxidase: two different docking scenarios // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2004. – T. 1655. – C. 274–281.
85. Michel L.V., Ye T., Bowman S.E.J., Levin B.D., Hahn M.A., Russell B.S., Elliott S.J., Bren K.L. Heme Attachment Motif Mobility Tunes Cytochrome *c* Redox Potential // *Biochemistry*. – 2007. – T. 46, № 42. – C. 11753–11760.
86. Mie Y., Takahashi K., Itoga Y., Sueyoshi K., Tsujino H., Yamashita T., Uno T. Nanoporous gold based electrodes for electrochemical studies of human neuroglobin // *Electrochemistry Communications*. – 2020. – T. 110. – C. 106621.
87. Millett F., Durham B. Kinetics of Electron Transfer within Cytochrome *bc*<sub>1</sub> and Between Cytochrome *bc*<sub>1</sub> and Cytochrome *c* // *Photosynthesis Research*. – 2004. – T. 82, № 1. – C. 1–16.
88. Mnatsakanyan N., Jonas E.A. The new role of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase in mitochondria-mediated neurodegeneration and neuroprotection // *Experimental Neurology*. – 2020. – T. 332. – C. 113400.
89. Naiyer A., Khan B., Islam A., Hassan Md.I., Sundd M., Ahmad F. Heme-iron ligand (M80-Fe) in cytochrome *c* is destabilizing: combined *in vitro* and *in silico* approaches to monitor changes in structure, stability and dynamics of the protein

- on mutation // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2022. – T. 40, № 9. – C. 4122–4139.
90. 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., Brazhe N.A. Detection of Hypertension-Induced Changes in Erythrocytes by SERS Nanosensors // *Biosensors*. – 2022. – T. 12, № 1. – C. 32.
  91. Nunes G., Ramos Figueira E.R., Rocha-Filho J.A., Lanchotte C., Nacif L.S., Ferreira D.M., Romano V.C., Abdo E.E., D’Albuquerque L.A.C., Galvão F.H.F. Hypertonic saline solution decreases oxidative stress in liver hypothermic ischemia // *Surgery*. – 2021. – T. 169, № 6. – C. 1512–1518.
  92. Ogawa M., Harada Y., Yamaoka Y., Fujita K., Yaku H., Takamatsu T. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – T. 382, № 2. – C. 370–374.
  93. Okada M., Smith N.I., Palonpon A.F., Endo H., Kawata S., Sodeoka M., Fujita K. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – T. 109, № 1. – C. 28–32.
  94. Oreopoulos G.D., Wu H., Szaszi K., Fan J., Marshall J.C., Khadaroo R.G., He, R., Kapus A., Rotstein O.D. Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: A role for interleukin 10 // *Hepatology*. – 2004. – T. 40, № 1. – C. 211–220.
  95. Osipov A.N., Borisenko G.G., Vladimirov Yu.A. Biological activity of hemoprotein nitrosyl complexes // *Biochemistry (Moscow)*. – 2007. – T. 72, № 13. – C. 1491–1504.
  96. Otto A. Surface-enhanced Raman scattering: “Classical” and “Chemical” origins *Topics in Applied Physics* / под ред. M. Cardona, G. Güntherodt, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. – 1984. – C. 289–418.

97. Ow Y.-L.P., Green D.R., Hao Z., Mak T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2008. – T. 9, № 7. – С. 532–542.
98. Pätzold R., Keuntje M., Theophile K., Müller J., Mielcarek E., Ngezahayo A., Anders-von Ahlften A. In situ mapping of nitrifiers and anammox bacteria in microbial aggregates by means of confocal resonance Raman microscopy // *Journal of Microbiological Methods*. – 2008. – T. 72, № 3. – С. 241–248.
99. Persson B.N.J. On the theory of surface-enhanced Raman scattering // *Chemical Physics Letters*. – 1981. – T. 82, № 3. – С. 561–565.
100. Perutz M.F. Regulation of Oxygen Affinity of Hemoglobin: Influence of Structure of the Globin on the Heme Iron // *Annual Review of Biochemistry*. – 1979. – T. 48, – № 1. – С. 327–386.
101. Perutz M.F., Ladner J.E., Simon S.R., Ho, C. Influence of globin structure on the state of the heme. I. Human deoxyhemoglobin // *Biochemistry*. – 1974. – T. 13, № 10. – С. 2163–2173.
102. Pesce A., Dewilde S., Nardini M., Moens L., Ascenzi P., Hankeln T., Burmester T., Bolognesi M. Human Brain Neuroglobin Structure Reveals a Distinct Mode of Controlling Oxygen Affinity // *Structure*. – 2003. – T. 11, № 9. – С. 1087–1095.
103. Ravikanth M., Chandrashekar T.K. Nonplanar porphyrins and their biological relevance: Ground and excited state dynamics *Structure and Bonding* / Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. – 1995. – С. 105–188 c.
104. Rich P.R., Maréchal A. The mitochondrial respiratory chain // *Essays in Biochemistry*. – 2010. – T. 47. – С. 1–23.
105. Rosca M.G., Vazquez E.J., Kerner J., Parland W., Chandler M.P., Stanley W., Sabbah H.N., Hoppel C.L. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation // *Cardiovascular Research*. – 2008. – T. 80. – С. 30–39.
106. Rygula A., Majzner K., Marzec K. M., Kaczor A., Pilarczyk M., Baranska M. Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, – 2013. – T. 8, № 44. – С. 1061–1076.

107. Salabei J.K., Gibb A.A., Hill B.G. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis // *Nature Protocols*. – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 421–438.
108. Salmeen I., Palmer G. Electron Paramagnetic Resonance of Beef-Heart Ferricytochrome c // *The Journal of Chemical Physics*. – 1968. – Т. 48, № 5. – С. 2049–2052.
109. Schacterle G., Pollack R. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. // *Anal Biochem*. – 1973. – Т. 51, № 2. – С. 654–655.
110. Scheidt WR, Lee YJ. Recent Advances in the Stereochemistry of Metallotetrapyrroles // *Struct Bonding (Berlin)*. – 1987. – Т. 1, № 64. – С. 70.
111. Schmidt M., Giessl A., Laufs T., Hankeln T., Wolfrum U., Burmester T. How Does the Eye Breathe? // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Т. 278, № 3. – С. 1932–1935.
112. Schweitzer-Stenner R. Heme–Protein Interactions and Functional Relevant Heme Deformations: The Cytochrome c Case // *Molecules*. – 2022. – Т. 27, № 24. – С. 8751.
113. Semenova M.A., Bochkova Z.V., Smirnova O.M., Ignatova A.A., Parshina E.Y., Ziganshin R.H., Bocharov E.V., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Chertkova R.V. Development of a System for Biosynthesis, Isolation and Purification of Holoform of Recombinant Human Neuroglobin and Its Characteristics // *Биоорганическая химия*. – 2023. – Т. 49, № 3. – С. 319–330.
114. Semenova M.A., Bochkova Z.V., Smirnova O.M., Maksimov G.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A., Brazhe N.A., Chertkova R.V. Charged Amino Acid Substitutions Affect Conformation of Neuroglobin and Cytochrome c Heme Groups // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2024. – Т. 46, № 4. – С. 3364–3378.
115. Senge M.O., MacGowan S.A., O'Brien J.M. Conformational control of cofactors in nature – the influence of protein-induced macrocycle distortion on the

- biological function of tetrapyrroles // *Chemical Communications*. – 2015. – T. 51, № 96. – C. 17031–17063.
116. Senge M.O., Medforth C.J., Forsyth T.P., Lee D.A., Olmstead M.M., Jentzen W., Pandey R.K., Shelnut J.A., Smith K.M. Comparative Analysis of the Conformations of Symmetrically and Asymmetrically Deca- and Undecasubstituted Porphyrins Bearing Meso-Alkyl or -Aryl Groups // *Inorganic Chemistry*. – 1997. – T. 36, № 6. – C. 1149–1163.
117. Shaanan B. Structure of human oxyhaemoglobin at 2·1 resolution // *Journal of Molecular Biology*. – 1983. – T. 171, № 1. – C. 31–59.
118. Shelnut J., Song X.-Z., Ma J.-G., Jia S.-L., Jentzen W., Medforth C., Medforth C. Nonplanar porphyrins and their significance in proteins // *Chemical Society Reviews*. – 1998. – T. 27, № 1. – C. 31.
119. Shelnut J.A., Rousseau D.L., Friedman J.M., Simon S.R. Protein-heme interaction in hemoglobin: evidence from Raman difference spectroscopy. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1979. – T. 76, №9. – C. 4409–4413.
120. Shimada S., Shinzawa-Itoh K., Baba J., Aoe S., Shimada A., Yamashita E., Kang J., Tateno M., Yoshikawa S., Tsukihara T. Complex structure of cytochrome *c* – cytochrome *c* oxidase reveals a novel protein–protein interaction mode // *The EMBO Journal*. – 2017. – T. 36, № 3. – C. 291–300.
121. Simeonov M., Altuve A., Massiah M.A., Wang A., Eastman M.A., Benson D.R., Rivera M. Mitochondrial and Microsomal Ferric *b*<sub>5</sub> Cytochromes Exhibit Divergent Conformational Plasticity in the Context of a Common Fold // *Biochemistry*. – 2005. – T. 44, № 26. – C. 9308–9319.
122. Skourtis S.S., Waldeck D.H., Beratan D.N. Fluctuations in Biological and Bioinspired Electron-Transfer Reactions // *Annual Review of Physical Chemistry*. – 2010. – T. 61, № 1. – C. 461–485.
123. Solar Fernandez V., Marino M., Fiocchetti M. Neuroglobin in Retinal Neurodegeneration: A Potential Target in Therapeutic Approaches // *Cells*. – 2021. – T. 10, № 11. – C. 3200.

124. Solmaz S.R.N., Hunte C. Structure of Complex III with Bound Cytochrome *c* in Reduced State and Definition of a Minimal Core Interface for Electron Transfer // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – T. 283, № 25. – C. 17542–17549.
125. Spiro T.G. Resonance Raman Spectroscopy as a Probe of Heme Protein Structure and Dynamics // *Advances in Protein Chemistry*. – 1985. – T. 37. – C. 111–159.
126. Sun Y., Benabbas A., Zeng W., Kleingardner J.G., Bren K.L., Champion P.M. Investigations of heme distortion, low-frequency vibrational excitations, and electron transfer in cytochrome *c* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. – T. 111, № 18. – C. 6570–6575.
127. Sun Y., Karunakaran V., Champion P.M. Investigations of the Low-Frequency Spectral Density of Cytochrome *c* upon Equilibrium Unfolding // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2013. – T. 117, № 33. – C. 9615–9625.
128. Taanman J.-W. Human Cytochrome *c* Oxidase: Structure, Function, and Deficiency // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 1997. – T. 29, № 2. – C. 151–163.
129. Takano T., Dickerson R.E. Redox conformation changes in refined tuna cytochrome *c* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1980.
130. Takano Y., Kondo H.X., Kanematsu Y., Imada Y. Computational study of distortion effect of Fe-porphyrin found as a biological active site // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 2020. – T. 59, № 1. – C. 010502.
131. Takayama S.J., Irie K., Tai H., Kawahara T., Hirota S., Takabe T., Alcaraz L.A., Donaire A., Yamamoto Y. Electron transfer from cytochrome *c* to cupredoxins // *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2009. – T. 14, № 6. – C. 821–828.
132. Tejero J. Negative surface charges in neuroglobin modulate the interaction with cytochrome *c* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2020. – T. 523, № 3. – C. 567–572.
133. Tejero J., Sparacino-Watkins C.E., Ragireddy V., Frizzell S., Gladwin M.T. Exploring the Mechanisms of the Reductase Activity of Neuroglobin by Site-

- Directed Mutagenesis of the Heme Distal Pocket // *Biochemistry*. – 2015. – T. 54, № 3. – C. 722–733.
134. Tian Z., Liang M. Renal metabolism and hypertension // *Nature Communications*. – 2021. – T. 12, № 1. – C. 963.
135. Tiso M., Tejero J., Basu S., Azarov I., Wang X., Simplaceanu V., Frizzell S., Jayaraman T., Geary L., Shapiro C., Ho C., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Gladwin M.T. Human Neuroglobin Functions as a Redox-regulated Nitrite Reductase // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – T. 286, № 20. – C. 18277–18289.
136. Tiwari P.B., Astudillo L., Pham K., Wang X., He J., Bernad S., Derrien V., Sebban P., Miksovská J., Darici Y. Characterization of molecular mechanism of neuroglobin binding to cytochrome c: A surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry study // *Inorganic Chemistry Communications*. – 2015. – T. 62. – C. 37–41.
137. Tiwari P.B., Chapagain P.P., Üren A. Investigating molecular interactions between oxidized neuroglobin and cytochrome c // *Scientific Reports*. – 2018. – T. 8, № 1. – C. 10557.
138. Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S. The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å // *Science*. – 1996. – T. 272, № 5265. – C. 1136–1144.
139. Vafai S.B. and Mootha V.K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle // *Nature*. – 2012. – T. 491. – C. 374–383.
140. Vallone B., Nienhaus K., Matthes A., Brunori M., Nienhaus G.U. The structure of carbonmonoxy neuroglobin reveals a heme-sliding mechanism for control of ligand affinity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – T. 101, № 50. – C. 17351–17356.
141. Van Doorslaer S., Vinck, E., Trandafir, F., Ioanitecu, I., Dewilde, S., Moens, L. Tracing the Structure-Function Relationship of Neuroglobin and Cytoglobin using Resonance Raman and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy // *IUBMB Life*. – 2004. – T. 56, № 11–12. – C. 665–670.

142. Vuorinen K., Ylitalo K., Peuhkurinen K., Raatikainen P., Ala-Rämi A., Hassinen I.E. Mechanisms of Ischemic Preconditioning in Rat Myocardium: Roles of Adenosine, Cellular Energy State, and Mitochondrial F<sub>1</sub> F<sub>0</sub> -ATPase // *Circulation*. – 1995. – T. 91, № 11. – C. 2810–2818.
143. Watanabe S., Takahashi N., Uchida H., Wakasugi K. Human Neuroglobin Functions as an Oxidative Stress-responsive Sensor for Neuroprotection // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. – T. 287, № 36. – C. 30128–30138.
144. Xavier R. Chapa-Dubocq. Cardiac Function is not Susceptible to Moderate Disassembly of Mitochondrial Respiratory Supercomplexes // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – T. 21. – C. 1555.
145. Yeo B.-S., Mädler S., Schmid T., Zhang W., Zenobi R. Tip-Enhanced Raman Spectroscopy Can See More: The Case of Cytochrome *c* // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2008. – T. 112, № 13. – C. 4867–4873.
146. Ylitalo K., Ala-Rämi A., Vuorinen K., Peuhkurinen K., Lepojärvi M., Kaukoranta P., Kiviluoma K., Hassinen I. Reversible ischemic inhibition of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase in rat and human myocardium // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. – 2001. – T. 1504, № 2–3. – C. 329–339.
147. Yu Z., Xu J., Liu N., Wang Y., Li X., Pallast S., Van Leyen K., Wang X. Mitochondrial distribution of neuroglobin and its response to oxygen–glucose deprivation in primary-cultured mouse cortical neurons // *Neuroscience*. – 2012. – T. 218. – C. 235–242.
148. Zanetti Polzi L., Battistuzzi G., Borsari M., Pignataro M., Paltrinieri L., Daidone I., Bortolotti C.A.. Computational investigation of the electron transfer complex between neuroglobin and cytochrome *c* // *Supramolecular Chemistry*. – 2017. – T. 29, № 11. – C. 846–852.
149. Zoppellaro G., Harbitz E., Kaur R., Ensign A.A., Bren K.L., Andersson K.K. Modulation of the Ligand-Field Anisotropy in a Series of Ferric Low-Spin Cytochrome *c* Mutants derived from *Pseudomonas aeruginosa* Cytochrome *c* -551 and *Nitrosomonas europaea* Cytochrome *c* -552: A Nuclear Magnetic

- Resonance and Electron Paramagnetic Resonance Study // Journal of the American Chemical Society. – 2008. – Т. 130, № 46. – С. 15348–15360.
150. Ковба М.В., Пупышев В.И. Квантово-механическая модель молекулы.
151. Нельсон Д.Л., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера: в 3т. Т. 2: Биоэнергетика и метаболизм. Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний». Москва, 2014.
152. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. Мембранная биоэнергетика: Учебное пособие. М.: Издательство Московского Университета, 2010. Стр. 66.

### **Благодарности**

Выражаю глубокую признательность и благодарность своему научному руководителю, Надежде Александровне Браже, за организованный и теплый подход к моему обучению и направлению, за всестороннюю помощь на каждом этапе исследования и написания диссертации, за переданный опыт и неизменно доброжелательное отношение. Также искренне благодарю профессора Г.В. Максимова за интерес к моей работе и моральную поддержку, за постоянную помощь с оценкой результатов в ходе экспериментов и многочисленные рекомендации по написанию диссертации.

Выражаю признательность сотрудникам Института Биоорганической Химии, аспирантке Семеновой М.А. и к.б.н. Чертковой Р.В. за совместную многостадийную работу с мутантными формами цитохрома С и нейроглобина.

Приношу отдельную благодарность Никельшпарг Э.И. за чуткое и продуктивное руководство моей работой в бакалавриате и магистратуре, за обучение анализу научных статей, за помощь в освоении оксиметрии и метода выделения митохондрий. Благодарю Байжуманова А.А. за неоценимую помощь в работе с животными и за своевременные наставления на протяжении всех лет моего обучения. Благодарю профессора Гудилина Е.А. и его научную группу, в первую очередь Семенову А.А., за обучение синтезу плазмонных наноструктур.

Благодарю весь коллектив лаборатории биофизики клетки, в первую очередь, коллег А.А., Паршину Е.Ю, Браже А.Р., Юсиповича А.И. за дружественное отношение, поддержку в жизни и в работе и за помощь с исследованиями. Благодарю профессора Рубина А.Б. за детальное внимание к моей работе, продуктивные обсуждения, за ценные комментарии и замечания к диссертации, благодаря которым удалось значительно усовершенствовать автореферат. Благодарю всех сотрудников кафедры за сотрудничество и поддержку.

Благодарю д-р физ.-мат. наук, в.н.с. Коваленко И.Б. и к.б.н., с.н.с. Подгорного О.В. за рецензирование моей аспирантской выпускной работы, а также к.б.н., с.н.с. Вологушеву А.А. за рецензирование учебно-методического комплекса и Фурсову П.В. за помощь с оформлением диссертации.

Выражаю благодарность оппонентам профессору д.б.н. Лопиной О.Д., д.б.н. Сурину А.М. и профессору д.х.н. Горину Д.А. за согласие изучить и оппонировать мою работу.

Разные части представленной работы проводились при поддержке грантов РФФИ 21-74-00026, РФФИ 23-74-00006 (с использованием ОИ ИБХ РАН), РФФИ 23-44-00015, РФФИ 23-74-00006.