



УДК 577.158.8

**ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА И СТЕПЕНИ ОКИСЛЕННОСТИ
ФОСФОЛИПИДОВ НА ВСТРАИВАНИЕ В ЛИПОСОМЫ
И КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИТОХРОМОВ b_5 И P-450***Уваров В. Ю., Бачманова Г. П., Мазуров А. В.,
Арчаков А. И.**2-й Московский государственный медицинский институт им. Н. И. Пирогова*

Исследовано влияние степени окисленности фосфолипидов и холестерина на конформационное состояние и встраивание в липосомы цитохромов b_5 и P-450. Обнаружено, что окисление фосфолипидов протеолипосом со встроенным гемопротееидом не влияло на содержание α -спиральных структур в цитохроме P-450 и незначительно уменьшало спирализацию цитохрома b_5 . Введение холестерина в искусственные мембраны не влияло на содержание α -структур в обоих гемопротееидах. Встраивание цитохрома b_5 в фосфатидилхолиновую мембрану зависело от степени окисленности фосфолипида и было максимальным (10 нмоль гемопротееида/мг фосфолипида, молярное отношение 1:125) при индексе окисленности 0,5. Такого эффекта не наблюдалось в случае использования липосом, приготовленных из смеси микросомальных фосфолипидов. Встраивание цитохрома P-450 в мембрану липосом не зависело от степени окисленности липидов. Введение холестерина в фосфатидилхолиновые липосомы снижало эффективность встраивания в них цитохрома b_5 и не влияло на встраивание цитохрома P-450. В противоположность этому обогащение холестерином липосом из смеси микросомальных фосфолипидов не отражалось на эффективности встраивания обоих гемопротееидов.

Встраивание изолированных цитохромов P-450 и b_5 в искусственные мембраны приводит к стабилизации их вторичной структуры [1, 2]. Эти данные следует рассматривать как указание на то, что одной из функций липидного бислоя биомембран является стабилизация белковых молекул. Состояние самого бислоя в свою очередь определяют процессы перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот мембранных фосфолипидов и содержание в нем холестерина [3—6]. Имеется много указаний на изменение микровязкости, проницаемости, электрического сопротивления и ряда других физико-химических параметров бислоя мембран при окислении фосфолипидов или накоплении холестерина [7—9]. В то же время не известно действие этих факторов на конформационное состояние белков, встроенных в мембраны. В связи с этим нами исследовано влияние степени окисленности фосфолипидного бислоя и наличия в нем холестерина на конформационное состояние и эффективность встраивания цитохромов P-450 и b_5 в мембрану липосом.

На рис. 1а, б приведены УФ-спектры поглощения фосфатидилхолина и фосфолипидов, экстрагированных из микросом. Известно, что появление диеновых конъюгатов в липидах приводит к увеличению оптической плотности при 235 нм [10]. Образование конечных продуктов перекисного окисления фосфолипидов сопровождается появлением максимума поглощения при 265 нм [11].

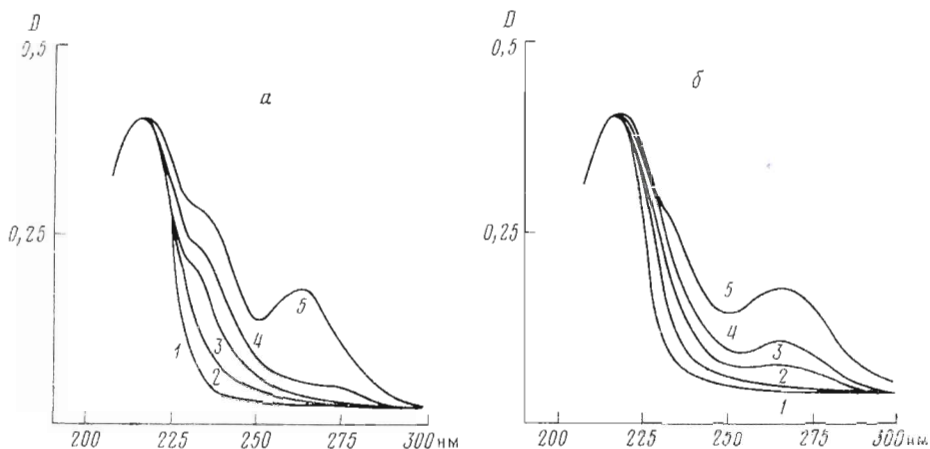


Рис. 1. Спектры поглощения фосфатидилхолина (а) и смеси микросомальных фосфолипидов (б) при времени УФ-освещения 0 (1), 10 (2), 30 (3), 50 (4), 70 (5) мин соответственно. Условия регистрации спектров: метанол, l 10 мм

В настоящей работе были выбраны фосфолипиды с пятью различными индексами окисленности ($I_{\text{окисл}}$), определяемыми по соотношению оптических плотностей при 215 и 235 нм. Из табл. 1 следует, что максимальная эффективность встраивания цитохрома b_5 наблюдается при использовании липосом с индексом окисленности, равным 0,5. Однако изменения эффективности встраивания в случае микросомальных фосфолипидов выражены гораздо менее значительно, чем при использовании липосом из фосфатидилхолина. Встраивание в липосомы другого белка мембран эндоплазматического ретикулума, цитохрома Р-450, практически не зависело ни от состава фосфолипидного бислоя, ни от степени окисленности липидов.

Содержание гемопротеинов в протеолипосомах составляло 20–70% для цитохрома b_5 и 25–40% для цитохрома Р-450 от исходного количества гемопротеинов. В то же время удельное содержание цитохрома b_5 в полученных протеолипосомах было ниже, чем в исходной инкубационной смеси, и равнялось 2–10 и 12–15 нмоль/мг фосфолипида соответственно. В случае протеолипосом с цитохромом Р-450 его удельное содержание было выше, чем в исходной смеси; 2,6–2,9 и 2 нмоль/мг фосфолипида соответственно. Следовательно, цитохром Р-450 встраивается в липосомы лучше, чем цитохром b_5 . Наблюдаемый эффект можно объяснить различной степенью гидрофобности молекул гемопротеинов.

При встраивании в липидный бислой наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции остатков триптофана в молекуле цитохрома b_5 [2, 12]. Это явление использовано нами для исследования кинетики встраивания данного белка в липосомы из фосфатидилхолина и смеси микросомальных фосфолипидов в зависимости от степени их окисленности. Из рис. 2 видно, что скорость встраивания цитохрома b_5 снижена в липосомах из фосфатидилхолина с индексом окисленности 0,7. Константы скорости встраивания цитохрома b_5 в липосомы с индексами окисленности 0,2–0,6 составляли $(0,30–0,35) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, а с индексом окисленности 0,7–0,23 $\cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. В случае искусственной мембраны из смеси микросомальных фосфолипидов скорость встраивания цитохрома b_5 не зависела от индекса окисленности липида и была равной скорости включения цитохрома b_5 в фосфатидилхолиновые липосомы с индексами окисленности 0,2–0,5. Эти результаты подтверждают высказанное ранее предположение о различном микроокружении цитохрома b_5 в фосфатидилхолиновых липосомах и липосомах, приготовленных из смеси микросомальных фосфолипидов [2].

Встраивание цитохромов b_5 и P-450 в липосомы, сформированные из липидов с разной степенью окисленности

Индекс окисленности $I_{\text{окисл}}$	Фосфатидилхолиновые липосомы		Липосомы из смеси микросомальных фосфолипидов	
	Цитохромы, нмоль/мг фосфолипида			
	b_5	P-450	b_5	P-450
0,2	2,2±0,1	2,7±0,1	2,0±0,1	2,3±0,1
0,4	4,0±0,3	2,6±0,1	2,2±0,1	2,9±0,2
0,5	10,2±0,7	2,8±0,2	2,7±0,2	2,9±0,3
0,6	6,6±0,2	—	2,0±0,2	—
0,7	4,0±0,1	2,7±0,1	1,5±0,1	1,4±0,1

Таблица 2

Встраивание цитохромов b_5 и P-450 в липосомы, обогащенные холестерином*

Фосфатидилхолиновые липосомы			Липосомы из смеси микросомальных фосфолипидов		
Холестерин/фосфолипидный индекс, моль/моль	Цитохромы, нмоль/мг фосфолипида		Холестерин/фосфолипидный индекс, моль/моль	Цитохромы, нмоль/мг фосфолипида	
	b_5	P-450		b_5	P-450
0,0	10,2±0,7	2,6±0,2	0,12	2,7±0,2	2,3±0,2
0,4	5,3±0,4	2,7±0,2	0,4	2,5±0,1	2,7±0,2
0,8	4,2±0,3	—	0,8	2,3±0,1	2,9±0,2

* $I_{\text{окисл}}$ липидов 0,5.

Сравнивая конформационное состояние белка, встроенного в липидный бислой с разными степенями окисленности фосфолипидов (рис. 3), можно видеть, что в случае как фосфатидилхолиновых липосом, так и липосом, приготовленных из смеси микросомальных фосфолипидов, незначительное снижение содержания α -спиральных структур наблюдается только тогда, когда в липидном бислое появляются продукты перекисного окисления, т. е. при $I_{\text{окисл}}$ 0,6—0,7.

При исследовании влияния обогащения смеси микросомальных липидов холестерином на встраивание цитохрома b_5 в приготовленные из них липосомы удалось показать, что удельное содержание гемопротенда в мембранах протеолипосом не зависело от наличия в них холестерина (табл. 2). В противоположность этому для фосфатидилхолиновых липосом, обогащенных холестерином, можно отметить значительное падение эффективности встраивания цитохрома b_5 . Тем не менее холестерин не вызывает изменения конформационного состояния цитохрома b_5 , включенного в липосомы как из смеси микросомальных фосфолипидов, так и из фосфатидилхолина. Обогащение холестерином липидного бислоя липосом не приводит к изменению эффективности встраивания в них цитохрома P-450 (табл. 2). Анализ спектров КД цитохрома P-450 свидетельствует о том, что содержание α -структур в данном гемопротейде не зависело от окисления липидов липосом или от обогащения их холестерином.

Сравнение функциональной активности цитохрома P-450, встроенного в модифицированный окислением или обогащением холестерином

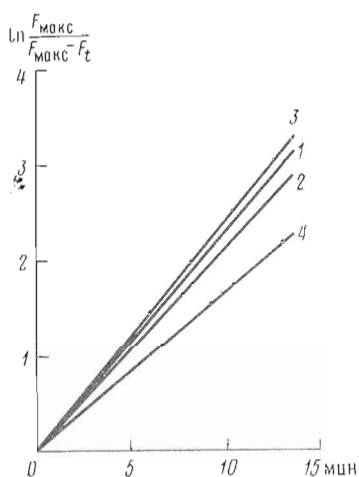


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика встраивания цитохрома b_5 в липосомы из фосфатидилхолина со степенью окисленности 0,2 или 0,6 (1), 0,4 (2), 0,5 (3), 0,7 (4). Инкубационная смесь объемом 3 мл содержала 100 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,6), 12 нмоль/мл цитохрома b_5 и 1 мг/мл фосфатидилхолина. $\lambda_{возб}$ 282 нм, $\lambda_{люч}$ 337 нм

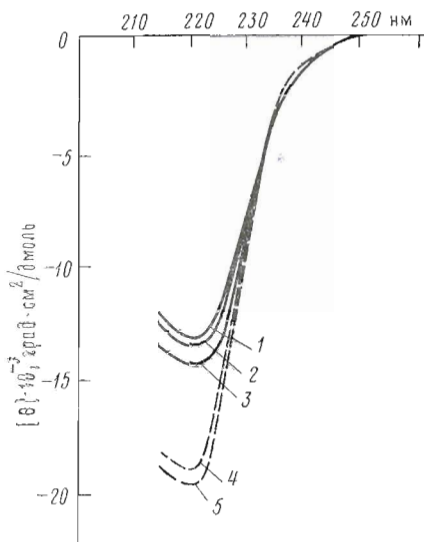


Рис. 3

Рис. 3. Спектры КД цитохрома b_5 , встроеного в липосомы со степенью окисленности фосфолипидов 0,7 (1, 4), 0,6 (2), 0,2 или 0,5 (3), 0,2–0,6 (5). Сплошные линии — липосомы из смеси микросомальных фосфолипидов, пунктирные — из фосфатидилхолина

фосфолипидный бислой, показало, что скорость N-деметилирования диметиланилина, *n*-гидроксилирования анилина и O-деалкилирования *n*-нитроанизола практически не зависела от состава бислоя (табл. 3). Это говорит о том, что при исследованных модификациях липидного матрикса искусственных мембран не происходит структурных изменений данного белка, способных нарушить его функционирование.

Таким образом, окисление фосфатидилхолина липосом и увеличение содержания в них холестерина оказывают влияние на эффективность встраивания в липидный бислой цитохрома b_5 . Структура и функциональные свойства цитохрома P-450 не зависят от данных модификаций искусственных мембран.

Экспериментальная часть

Холестерин, EDTA, трис-НСI-буфер — фирмы «Sigma», остальные реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и ос.ч.

Выделение цитохрома b_5 проводили по методу Снатца и Стриттматтера [13]. Очищенный цитохром b_5 содержал 60 нмоль гемопротеида на 1 мг белка. Препарат цитохрома P-450 выделяли по методу Имаи с некоторыми модификациями [14]. Очищенный цитохром P-450 содержал 18 нмоль гемопротеида на 1 мг белка.

Для получения липосом использовали яичный фосфатидилхолин, выделенный по методу [15], и смесь фосфолипидов, выделенную из микросом печени крысы по методу Фолча и др. [16]. Смесь фосфолипидов микросом содержала фосфатидилхолин (56%), фосфатидилэтаноламин (24%), сфингомиелин (8%), фосфатидилсерин и фосфатидилинозит (12%). Липосомы получали как описано ранее [4]. Фосфолипид определяли по методу [17], содержание белка — по методу Лоури и др. [18].

Скорость окисления диметиланилина, анилина и *n*-нитроанизола в присутствии цитохрома Р-450, встроенного в липосомы с разными индексами окисленности липида или обогащенные холестерином, в присутствии гидроперокси кумола, нмоль продукта·мин⁻¹·нмоль⁻¹ гемопротеида

Тип реакции	Фосфатидилхолиновые липосомы				
	$I_{\text{окисл}}$			холестерин/фосфолипидный индекс, моль/моль	
	0,2	0,4	0,6	0,0	0,4
N-Деметилирование диметиланилина	109±7,0	132±10	109±10	109±10	105±10
<i>n</i> -Гидроксилирование анилина	11,8±1,0	14,3±1,2	9,8±1,0	11,8±1,0	8,8±0,6
O-Деалкилирование <i>n</i> -нитроанизола	8,3±0,5	8,4±0,4	8,3±0,5	8,4±0,6	8,3±0,4

Тип реакции	Липосомы из смеси микросомальных фосфолипидов					Изолированный цитохром Р-450	Цитохром Р-450 микросом
	$I_{\text{окисл}}$			холестерин/фосфолипидный индекс, моль/моль			
	0,2	0,4	0,6	0,12	0,4		
N-Деметилирование диметиланилина	113±9,0	120±12	140±12	113±10	120±12	57±2,0	96±4,0
<i>n</i> -Гидроксилирование анилина	9,5±0,8	10,2±1,2	11,5±1,2	9,5±0,8	9,9±0,9	3,5±0,4	7,7±0,4
O-Деалкилирование <i>n</i> -нитроанизола	8,3±0,4	8,3±0,5	8,3±0,5	8,2±0,4	8,4±0,6	4,1±0,2	6,3±0,3

Количественную оценку содержания холестерина проводили по методу Вебстера [19].

Для получения искусственных мембран с различной степенью окисленности фосфолипида однослойные липосомы освещали ультрафиолетовым светом. В качестве источника света использовали лампу СВД-120А. Степень окисленности липидов определяли, регистрируя спектры поглощения фосфолипидов в диапазоне 210–300 нм на спектрофотометрах «Упicasm-8000» и «Perkin-Elmer-575» (Англия) по методу Клейна [20].

Липосомы, обогащенные холестерином, получали следующим образом: чистый фосфатидилхолин или смесь фосфолипидов микросом, растворенные в хлороформе, инкубировали с холестерином в течение 5 мин при 25°С. Концентрация фосфолипидов составляла 20 мг/мл, а холестерина — 4 или 8 мг/мл. Затем хлороформ выпаривали и смесь фосфолипидов и холестерина суспендировали в 100 мМ трис-НСI-буфере, рН 7,6. Полученную суспензию подвергали ультразвуковой обработке на ультразвуковом дезьинтеграторе MSE-100 Вт в течение 50 мин при 6°С. Для выделения однослойных липосом суспензию после озвучивания центрифугировали при 190 000g в течение 90 мин на центрифуге «Beckman L5-65» (ротор 40.2). Надсадочная жидкость содержала липосомы, которые использовались для встраивания цитохромов.

Изолированные цитохромы добавляли к липосомам в соотношении 12–15 нмоль цитохрома *b*₅ и 2 нмоль цитохрома Р-450 на 1 мг фосфолипида.

Исходные соотношения липид/белок выбирали, исходя из насыщающей концентрации по белку. Смесь инкубировали 40–60 мин при 30 и 37° С соответственно. Затем суспензию центрифугировали при 190 000g в течение 90 мин в присутствии 300 мМ NaCl. Осадок суспендировали в 100 мМ трис-HCl-буфере, pH 7,6, с 1 мМ EDTA и 1 мМ дитиотреитом. Встраивание цитохрома b_5 контролировали по увеличению интенсивности флуоресценции триптофана гемопротеида на спектрофотометре «Hitachi MPF-2A» (Япония) [2, 12]. Расчет константы скорости встраивания цитохрома b_5 проводили по методу Лето и сотр. [21]. Содержание цитохромов b_5 и P-450 определяли по методу Омур и Сато [22].

Спектры КД цитохромов b_5 и P-450, встроенных в фосфолипидный бислой, регистрировали как описано ранее [1, 12]. Инкубационная смесь объемом 0,5 мл содержала 0,2–0,4 мг белка на 1 мл 100 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,6. Спектры регистрировали на спектрополяриметре «Jasco J-20» (Япония) в кювете с длиной оптического пути 0,5 мм.

Скорость N-деметилирования диметиланилина, n-гидроксилирования анилина и O-деалкилирования n-нитроанизола в присутствии гидроперекиси кумида определяли как описано ранее [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Уваров В. Ю., Бачманова Г. И., Арчаков А. И., Сухомудренко А. Г., Мясоедова К. П. Конформация и тепловая стабильность растворимого и встроенного в мембрану липосом цитохрома P-450.— Биохимия, 1980, т. 45, № 8, с. 1463–1469.
2. Уваров В. Ю., Бачманова Г. И., Арчаков А. И., Хайгина С. З., Сухомудренко А. Г. Конформационное состояние растворимого и встроенного в искусственную мембрану цитохрома b_5 .— Биохимия, 1980, т. 45, № 10, с. 1859–1862.
3. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972, с. 114–171.
4. Блюгер А. Ф., Майоре А. Я. Peroxidation of lipids in liver in norm and in pathology.— В сб.: Биомембраны. Структура, функции, методы исследования. Рига.: Зинатне, 1977, с. 261–277.
5. Papahadjopoulos D. Cholesterol and cell membrane function: a hypothesis concerning the etiology of atherosclerosis.— J. Theor. Biol., 1973, v. 43, № 2, p. 329–337.
6. Oldfield E., Chapman D. Dynamics of lipids in membranes: heterogeneity and the role of cholesterol.— FEBS Letters, 1974, v. 23, № 2, p. 285–297.
7. Kimelberg H., Papahadjopoulos D. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions and cholesterol on (Na⁺-K⁺)-stimulated adenosin triphosphatase.— J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 3, p. 1071–1080.
8. Болдырев А. А., Ко Чже-Чжун. Влияние холестерина на активность мембранной Na, K-активируемой аденозинтрифосфатазы.— Бюл. эксперим. биол. и мед., 1977, № 12, с. 672–675.
9. Козлов Ю. П., Ригов В. Б., Каган В. Е. Транспорт Ca²⁺ и свободнорадикальное окисление липидов мембран саркоплазматического ретикулула.— Докл. АН СССР, 1977, т. 242, № 5, с. 1239–1242.
10. Brode W. R., Peterson J. W., Brown J. B., Frankel S. Studies on the chemistry of the fatty acid. Absorption spectra analysis of conjugation in fatty acid.— Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1944, v. 16, № 1, p. 77–80.
11. Swern D. Primary products of olefinic autoxidation.— In: Autoxidation and antioxidants (W. O. Lundberg, ed.). N. Y.: Interscience, 1961, v. 1, p. 1–54.
12. Duforoq J., Faucon J. F., Lussan C., Bernon R. Study of lipidprotein interactions in membrane models: intrinsic fluorescence of cytochrome b_5 — phospholipid complexes.— FEBS Lett., 1975, v. 57, № 1, p. 112–116.
13. Spatz L., Strittmatter P. A form of cytochrome b_5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, № 5, p. 1042–1046.
14. Карузина И. И., Бачманова Г. И., Менгазетдинов Д. Э., Мясоедова К. П., Жижарева Б. О., Кузнецова Г. П., Арчаков А. И. Выделение и свойства цитохрома P-450 из микросом печени кроликов.— Биохимия, 1979, т. 44, № 6, с. 1149–1159.
15. Dawson R. M. C. On the mechanism of action of phospholipase A.— Biochem. J., 1963, v. 88, № 3, p. 414–423.
16. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley C. A. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.— J. Biol. Chem., 1957, v. 226, № 1, p. 497–509.
17. Chem P. S., Toribara J., Huber W. Microdetermination of phosphorous.— Analyt. Chem., 1956, v. 28, № 11, p. 1756–1758.

18. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent.— *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
19. *Webster D.* The determination of total and ester cholesterol in whole blood, serum or plasma.— *Clin. chim. acta*, 1962, v. 7, № 2, p. 277–287.
20. *Klein R. A.* The detection of oxidation in liposome preparations.— *Biochem. et biophys. acta*, 1970, v. 210, № 3, p. 486–489.
21. *Leto T. L., Holloway P. W.* Mechanism of cytochrome b_5 binding to phosphatidylcholine vesicles.— *J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 12, p. 5015–5019.
22. *Omura T., Sato R.* The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature.— *J. Biol. Chem.*, 1964, v. 239, № 7, p. 2370–2378.

Поступила в редакцию
18.VI.1980

THE INFLUENCE OF CHOLESTEROL AND THE DEGREE OF PHOSPHOLIPID OXIDATION ON THE CONFORMATIONAL STATE OF CYTOCHROMES P-450 AND b_5

UVAROV V. Yu., BACHMANOVA G. I., MAZUROV A. V., ARCHAKOV A. I.

N. I. Pirogov 2-nd Moscow State Medical Institute, Moscow

The influence of cholesterol and the degree of phospholipid oxidation on the conformational state of cytochromes P-450 and b_5 and on their incorporation into liposomes has been investigated. Phospholipid oxidation in proteoliposomes had no influence on the α -helix content in cytochrome P-450 and slightly decreased it in cytochrome b_5 . Incorporation of cholesterol into artificial membranes did not influence the α -helix content in both hemoproteins. Cytochrome b_5 incorporation into phosphatidylcholine membranes depended on the degree of phospholipid oxidation and reached its maximum (10 nmoles of haemoprotein/mg phospholipid) at the oxidation index of 0.5. Such an effect was not observed with liposomes prepared from the mixture of microsomal phospholipids. Cytochrome P-450 incorporation into liposomal membrane showed no dependence on the degree of phospholipid oxidation. The presence of cholesterol in phosphatidylcholine liposomes had an adverse effect on cytochrome b_5 incorporation and no effect on incorporation of cytochrome P-450. On the contrary, cholesterol enrichment of liposomes made of microsomal phospholipids did not impair incorporation of both hemoproteins.