



УДК 577.112.854 : 577.35.335 : 541.6

**ВЛИЯНИЕ ЦИТОХРОМА *c* НА ДВИЖЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ
И ПРОНИЦАЕМОСТЬ МОДЕЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН.
ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ЯМР****Мальковская Г. М., Викторов А. В., Василенко И. А.,
Миронов А. Ф., Швец Б. И., Евстигнеева Р. П.***Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова***Образцов В. В., Тараховский Ю. С., Боровягин В. Л.***Институт биофизики Академии наук СССР, Пушкино***Петров В. И., Сенников Г. А.***Харьковское предприятие по производству бактериальных препаратов*

Методом ^{31}P -ЯМР спектроскопии и электронной микроскопии (замораживание-скальвание) изучено влияние температуры, pH, катионов Ca^{2+} и La^{3+} на ультраструктуру фосфатидилхолин-кардиолипидных водных дисперсий и на взаимодействии цитохрома *c* с фосфатидилхолин-кардиолипидными липосомами. Найдено, что цитохром *c* вызывает появление локальных небислойных участков в мембране при увеличении температуры и при добавлении многозарядных катионов Ca^{2+} и La^{3+} . При замене яичного фосфатидилхолина в смеси яичный фосфатидилхолин — кардиолипид на триофосфатидилхолин обнаружено, что цитохром *c* взаимодействует преимущественно с молекулами кардиолипина. С помощью спектроскопии ^1H -ЯМР найдено, что везикулы с включенным цитохромом *c* характеризуются повышенным проницаемостью для парамагнитных катионов Pr^{3+} и Eu^{3+} .

При изучении взаимодействия цитохрома *c* с фосфолипидными мембранами методами ^{31}P -ЯМР и электронной микроскопии [1] было найдено, что оно приводит к образованию складчатых структур и внутримембранных частиц. Однако в этих исследованиях использовались очень высокие соотношения белок/липид и содержание в мембране кардиолипидов значительно превышало его концентрацию в биологических мембранах. В настоящей работе методом ^{31}P -ЯМР и электронной микроскопией (замораживание-скальвание) изучена зависимость характера движения фосфолипидов в фосфатидилхолин-кардиолипидной мембране от присутствия в системе цитохрома *c*, а также от таких факторов, как температура, многозарядные катионы и pH, при соотношениях белок/липид и кардиолипид/фосфатидилхолин, близких к природным. Кроме того, методом ^1H -ЯМР со сдвиговыми реагентами изучена проницаемость фосфатидилхолин-кардиолипидных везикул в присутствии цитохрома *c*.

В отсутствие цитохрома *c* неозвученная дисперсия, состоящая из смеси фосфатидилхолин — кардиолипид (весовое соотношение 4 : 1), в интервале температур от 10 до 40° С представляет собой ламелярную структуру, которой соответствует сигнал ^{31}P -ЯМР с анизотропией химического сдвига около 50 м.д., максимумом, сдвинутым в более сильное поле, и «плечом», направленным в слабое поле (рис. 1а). При добавлении цитохрома *c* к фосфатидилхолин-кардиолипидным липосомам в спектре ^{31}P -ЯМР появляется узкий сигнал, сдвинутый в слабое поле относительно максимума анизотропного сигнала (рис. 1б—г). Подобный узкий сигнал в спектрах ^{31}P -ЯМР могут давать молекулы фосфолипидов, обладающие способностью к изотропному движению, характерному для небольших фосфолипидных везикул или сильно искривленных участков бислоя [2]. С помощью электронной микроскопии было установлено, что взаимодействие цитохрома *c* не приводит к измельчению липосом (рис. 2а, б). Следовательно, появление узкого сигнала связано только с искажениями бислоевой организации

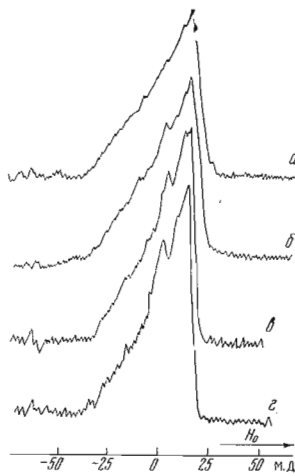


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР (рН 8,0; 25°C) фосфолипидных липосом водной дисперсии фосфатидилхолин — кардиолипид, 4 : 1 по весу (а) и этой же системы в присутствии цитохрома с при мольном соотношении липид/белок, равном 300 : 1 (б), 200 : 1 (в) и 100 : 1 (г)

фосфолипидов (на рис. 2б указаны стрелками) и увеличением подвижности фосфолипидов в мембране.

Как показано ранее [3—5], ультраструктура фосфолипидов в мембране чувствительна к таким факторам, как температура, рН, концентрация многозарядных катионов. Поэтому мы сочли целесообразным изучить влияние этих факторов на характер движения фосфолипидов в фосфатидилхолин-кардиолипидных мембранах, содержащих цитохром с.

При повышении температуры с $10\text{--}13$ до $38\text{--}40^\circ\text{C}$ интенсивность узкого сигнала в спектрах ^{31}P -ЯМР возрастает (рис. 3). Это, очевидно, связано с увеличением доли молекул фосфолипидов, имеющих небислойную упаковку. Важно отметить, что нарушения структуры бислойной мембраны, вызываемые повышением температуры, обратимы и при понижении температуры от 40 до 13°C вид спектра ^{31}P -ЯМР восстанавливается.

Изменение рН от 8,0 до 6,0 не влияет на вид спектра, причем заметного эффекта не наблюдается как в отсутствие, так и при добавлении цитохрома с. Следовательно, характер движения фосфолипидов в мембране не зависит от рН в этих пределах.

При добавлении многозарядных катионов к фосфатидилхолин-кардиолипидным липосомам в спектре ^{31}P -ЯМР появляется второй «минорный» максимум, смещенный в более слабое поле (рис. 4). Это указывает на образование в мембране структур, в которых молекулы фосфолипида способны двигаться более изотропно, чем в неискаженном бислое. Увеличение концентрации ионов Ca^{2+} , добавляемых к фосфатидилхолин-кардиолипидным липосомам, вызывает возрастание нарушений бислойной структуры, причем эти нарушения отчетливо проявляются при более высоких температурах. Сходное, но более сильное, чем ионы Ca^{2+} , действие на мембрану оказывают ионы La^{3+} (рис. 4А). Важно отметить, что в присутствии многозарядных катионов Ca^{2+} и La^{3+} искажения упаковки фосфолипидов в бислойной мембране, вызываемые цитохромом с, проявляются более значительно (рис. 4Б). Более значительные изменения фосфолипидного бислоя, вызываемые цитохромом с в присутствии ионов Ca^{2+} и La^{3+} , по-видимому, могут быть объяснены суммарным действием многозарядных катионов и самого цитохрома с, поскольку при используемом нами соотношении липид/белок не все молекулы кардиолипидина участвуют во взаимодействии с цитохромом с. Возрастание доли молекул кардиолипидина и фосфатидилхолина, пребывающих в небислойной структуре, при повышении температуры, на наш взгляд, может быть объяснено более высокой скоростью латеральной диффузии, в результате чего большее число молекул фосфолипидов получает возможность обмениваться между бислойной и небислойной организацией фосфолипидов.

Метод ^{31}P -ЯМР позволяет проследить за поведением отдельных классов фосфолипидов. Однако различия в химических сдвигах сигналов ядер ^{31}P -фосфолипидов природной структуры слишком малы (около 1 м.д.),

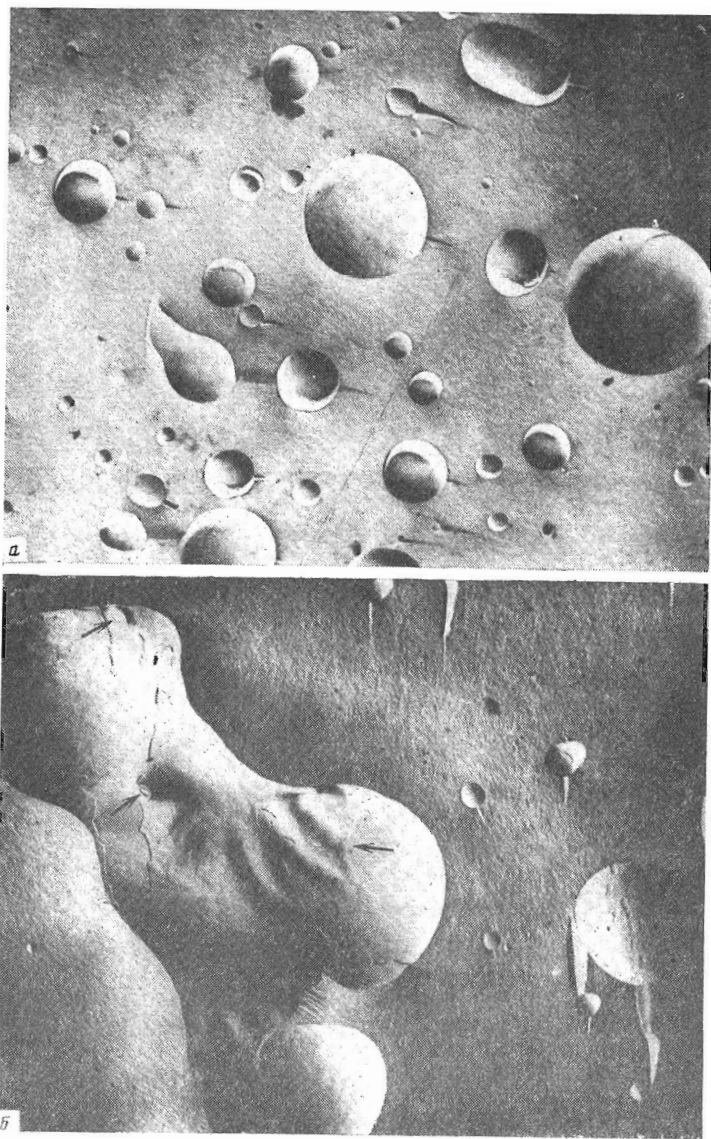


Рис. 2. Электронные микрофотографии липосом (25° С, рН 8,0), увеличение 34 000: а — фосфатидилхолин — кардиолипин (4:1 по весу), б — фосфатидилхолин — кардиолипин с цитохромом с (молярное соотношение липид / белок 100:1)

чтобы эти фосфолипиды можно было дифференцировать с помощью ^{31}P -ЯМР в биологических или липосомных мембранах, где анизотропия химического сдвига сигналов достигает 50 м.д. Поэтому мы использовали тиопный аналог фосфолипидов — тиофосфатидилхолин [6, 7], имеющий химический сдвиг, отличающийся от сигнала природных фосфолипидов на 59 м.д. Это позволило дискриминировать сигналы от тиофосфатидилхолина и кардиолипина в спектре ^{31}P -ЯМР и наблюдать за изменением в упаковке молекул каждого из фосфолипидов в отдельности (рис. 5). Введение в мембрану цитохрома с искажает существенным образом лишь сигнал ^{31}P -ЯМР от молекул кардиолипина. В спектре ^{31}P -ЯМР водной дисперсии смеси тиофосфатидилхолин — кардиолипин в соотношении по весу 4:1 появляется узкий сигнал в области, характерной для кардиолипина. Это говорит о том, что цитохром с специфически взаимодействует с кардиолипином, изменяя характер движения его молекул, делая его изотропным, приводя к латеральному разделению фаз.

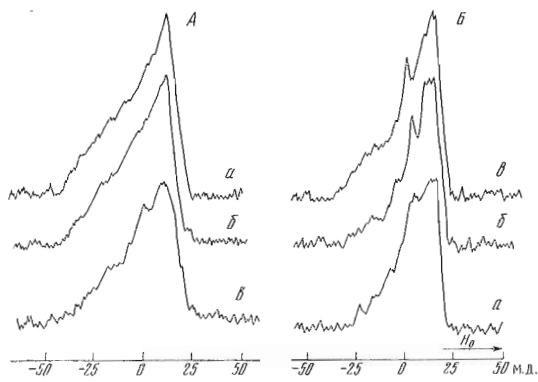


Рис. 3. Спектры ^{31}P -ЯМР фосфолипидных мембран при 11 (а), 25 (б) и 40° С (в). А — фосфатидилхолин — кардиолипин (4:1 по весу); В — та же система в присутствии цитохрома с (липид / белок, 200 : 1 моль/моль)

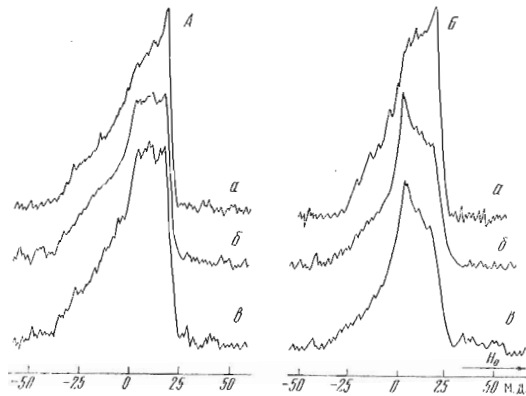


Рис. 4. Спектры ^{31}P -ЯМР фосфолипидных дисперсий в присутствии 10 мМ Ca^{2+} (а), 50 мМ Ca^{2+} (б) и 10 мМ La^{3+} (в). А — фосфатидилхолин — кардиолипин (4:1 по весу), В — та же система в присутствии цитохрома с (липид / белок, 200 : 1 моль/моль)

Искажения фосфатидилхолин-кардиолипидного бислоя, вызываемые цитохромом с, должны, очевидно, вызывать уменьшение проницаемости мембраны. Для изучения проницаемости на модельных мембранах может быть применена спектроскопия ЯМР с использованием гидрофильных сдвигающих реагентов (ионы лантанидов: Eu^{3+} , Pr^{3+} , Yb^{3+}). Как было показано ранее [8, 9], при добавлении в наружный объем озвученной фосфолипидной дисперсии этих реагентов в спектрах ^1H - и ^{31}P -ЯМР наблюдаются индуцированные сдвиги полярных группировок молекул фосфолипидов, расположенных на «наружной» поверхности мембраны, в то время как сигналы ЯМР от «внутренних» молекул фосфолипидов остаются неизменными.

В данной работе изучено влияние цитохрома с на проницаемость везикулярных мембран с помощью ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектроскопии с применением сдвигающих реагентов Eu^{3+} и Pr^{3+} . Везикулярные фосфатидилхолин-кардиолипидные мембраны в отсутствие цитохрома с являются непроницаемыми для парамагнитных катионов при температуре 40° С в течение нескольких часов. Так, после добавления к озвученной дисперсии липидов 10 мМ Pr^{3+} разница в химических сдвигах «внутреннего» и «наружного» N-метильных сигналов ($\Delta\delta$) остается постоянной. Однако связывание цитохрома с везикулами приводит к нарушению барьерных свойств мембраны. Как видно из рис. 6, в этом случае разница химических сдвигов

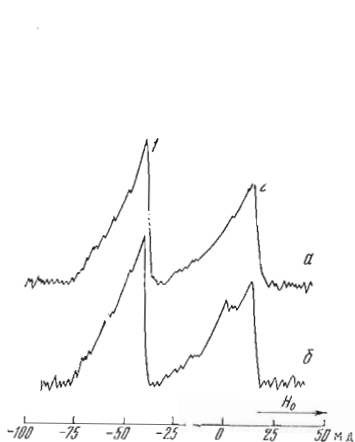


Рис. 5

Рис. 5. Спектры ^{31}P -ЯМР неозвученной водной дисперсии смеси тиофосфатидилхолин — кардиолипин (4:1 по весу) при 37°C в отсутствие (а) и в присутствии (б) цитохрома *c* (молярное соотношение липид/белок 200:1). 1 и 2 — сигналы, соответствующие тиофосфатидилхолину и кардиолипину

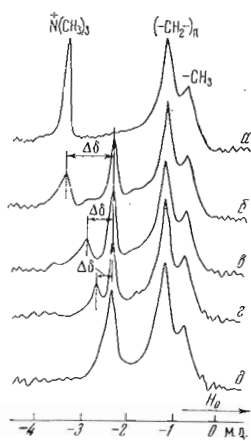


Рис. 6

Рис. 6. Спектры ^1H -ЯМР фосфатидилхолин-кардиолипидиновых везикулярных мембран без добавления сдвигающего реагента (а), в присутствии 10 mM Eu^{3+} (б), цитохрома *c* и 10 mM Eu^{3+} через 12 (в), 35 (г) и 90 мин (д) после добавления сдвигающего реагента. Соотношение липид/белок 200:1 моль/моль

указанных сигналов уменьшается с течением времени, что свидетельствует об увеличении проницаемости бислоя для ионов лантанидов.

Нарушения организации липидов в бислое, вызываемые присутствием цитохрома *c* и многозарядных катионов, наблюдались на мультислойных липосомах и поэтому не могут быть полностью применены для объяснения повышенной проницаемости фосфатидилхолин-кардиолипидиновых везикул, содержащих цитохром *c*. Возрастание проницаемости фосфатидилхолин-кардиолипидиновой везикулярной мембраны при включении цитохрома *c*, на наш взгляд, может быть объяснено нарушениями в структуре бислоя на границе раздела комплекса цитохрома *c* с фосфолипидом и фосфолипидного бислоя.

Экспериментальная часть

В данной работе использовались хроматографически чистые липиды: фосфатидилхолин, выделенный из яичных желтков [10], имеющий индекс окисленности $D_{233}/D_{215}=0,13$; кардиолипин, полученный по методу Орловой с соавт. [11], с индексом окисленности $D_{233}/D_{215}=0,85$. Цитохром *c* был выделен из сердечной мышцы крупного рогатого скота. Гомогенность белка доказана с помощью гель-электрофореза. Образец содержал 0,456% железа и имел отношение $D_{550}^{\text{вс}}/D_{280}^{\text{ок}}=1,062$, что находится в соответствии с литературными данными [12].

1,2-Дипальмитоил-*rac*-тиофосфатидилхолин был синтезирован по методу [13, 14].

Растворы CaCl_2 , $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ были приготовлены на деионированной воде.

Спектры ЯМР на ядрах ^{31}P и ^1H получены на импульсном спектрометре Bruker (ФРГ) на частотах 24,3 и 60 МГц соответственно.

За изменениями в структуре фосфолипидных мембран наблюдали с помощью электронной микроскопии. Использовался электронный микроскоп IEM-7A (Япония). Образцы были приготовлены методом замораживания-скалывания.

Липид-белковые комплексы получали следующим образом: растворы липидов — фосфатидилхолина и кардиолипина в соотношении 4:1 (по

весу) упаривали, затем к ним добавляли буфер 5 мМ трис-HCl, содержащий 1 мМ EDTA, или раствор цитохрома *c* в буфере и механическим встряхиванием получали грубую дисперсию.

Полиморфное состояние мембраны изучали при трех различных температурах: 10—13, 23—25 и 38—40°С. К липидам добавляли различное количество цитохрома *c*, достигая мольных соотношений липид/белок 100 : 1, 200 : 1 и 300 : 1.

Для изучения влияния цитохрома *c* на проницаемость фосфолипидных мембран везикулярные мембраны получали ультразвуковой обработкой (35 КГц) грубых водных дисперсий в течение 30 мин с последующим центрифугированием при 10 000g в течение 20 мин. К везикулам добавляли растворы парамагнитных ионов в таком количестве, чтобы их концентрация в образце была 10 мМ.

Авторы выражают благодарность Э. Е. Нифантьеву и Д. А. Предводителю (МГПИ им. В. И. Ленина) за предоставленный тионфосфатидил-холин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kruijff de B., Cullis P. R. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 602, № 2, p. 477-490.
2. Kruijff de B., Cullis P. R., Verkley A. J., Gerritsen W. J., Mombers C., Noordam P. C., Gier de J. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 555, № 1, p. 200-209.
3. Kruijff de B., Verkley A. J. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 559, № 2, p. 399-420.
4. Russel E. J., Oldfield E. Progress in NMR spectroscopy, 1981, v. 14, № 3, p. 113-136.
5. Malhotra B., Ross S., Tewari J. P. Chem. Phys. Lipids, 1981, v. 28, № 1, p. 33-39.
6. Нифантьев Э. Е., Предводителев Д. А., Смирнова Л. И., Фурсенко И. В. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1285-1309.
7. Нифантьев Э. Е., Предводителев Д. А., Аларкон Х. Х. Ж. орган. химии, 1978, т. 14, № 1, с. 63-71.
8. Bystrov V. F., Dubrovina N. I., Barsukov L. I., Bergelson L. D. Chem. Phys. Lipids, 1974, v. 6, № 2, p. 345-348.
9. Bergelson L. D. Methods in Membrane Biology, 1977, v. 9, p. 275-335.
10. Швець В. И., Сенников Г. А., Гольбец И. И., Орлова Г. Л., Краснопольский Ю. М. Фармацевтический ж., 1977, № 4, с. 79-81.
11. Орлова Г. Л., Краснопольский Ю. М., Гольбец И. И., Сенников Г. А., Швець В. И. Химия и технология органических производств. Межвузовский сборник, 1979, т. 9, № 2, с. 86-91.
12. Margoliash E., Frohwirt N. Biochem. J., 1959, v. 74, № 3, p. 570.
13. Чупин В. В., Василенко И. А., Предводителев Д. А., Серебrenникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Докл. АН СССР, 1979, т. 248, № 2, с. 233-235.
14. Чупин В. В., Василенко И. А., Серебrenникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 2, с. 768-772.

Поступила в редакцию

26.I.1982

После доработки

10.VI.1982

THE INFLUENCE OF CYTOCHROME *c* ON THE MOVEMENT OF PHOSPHOLIPIDS AND PERMEABILITY OF MODEL PHOSPHOLIPID MEMBRANES.

A ³¹P NMR STUDY

MALKOVSKAYA G. M., VICTOROV A. V., VASILENKO I. A., MIRONOV A. F., SHVETS V. I., EVSTIGNEEVA R. P., OBRAZTSOV V. V., TARAKHOVSKY Yu. S., BOROVYAGIN V. L., PETROV V. I., SENNIKOV G. A.

M. V. Lomonosov Institute of Chemical Technology, Moscow; Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino; Plant for Production of Bacterial Preparations, Kharkov

The influence of temperature, pH, Ca²⁺ and La³⁺ cations on the ultrastructure of phosphatidylcholine-cardiolipin aqueous dispersion and on the interaction of cytochrome *c* with phosphatidylcholine-cardiolipin liposomes was investigated by ³¹P NMR spectroscopy and electron microscopy (freeze-fracturing). Cytochrome *c* was found to induce local non-bilayer structures in membrane, whose portion becomes greater as temperature increases or in the presence of multicharged cation (Ca²⁺ and La³⁺). Replacing egg phosphatidylcholine by thion-phosphatidylcholine and using ³¹P NMR spectroscopy, it was ascertained that cytochrome *c* associates preferentially with cardiolipin molecules. The permeability of vesicular membrane containing cytochrome *c* was shown to be dramatically increased for paramagnetic cations Pr³⁺ or Eu³⁺.