

- ка вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда, *Bombyx mori* / М. С. Кацман, Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина и др. // Там же.— 1977.— 3, № 11.— С. 1455—1466.
10. Левитина Т. Л., Козлов Э. А., Серебряный С. Б. Трипсиновые пептиды полиэдреного белка вируса ядерного полиэдроза *B. mori* // Биохимия.— 1976.— 41, № 2.— С. 228—236.
 11. Eastley C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping techniques // Biochim. et biophys. acta.— 1965.— 107, N 2.— P. 386—388.
 12. Определение структуры пептидов комбинированным методом дансил—Эдман / Н. М. Гусак, М. Н. Овандер, Л. Б. Дробот, С. Б. Серебряный // Методы молекуляр. биологии.— Киев: Наук. думка.— 1979.— С. 142—154.
 13. Weiner A. M., Plott T., Weber R. Amino terminal sequence analysis of proteins, purified on a nanomole scale by gel electrophoresis // J. Biol. Chem.— 1972.— 247, N 10.— P. 3242—3251.
 14. Алахов Ю. Б., Бундулис М. А., Бундулис Ю. П. Первичная структура фактора элонгации G из *E. coli*. IV. Структура пептидов бромцанового расщепления молекулы G-фактора // Биоорг. химия.— 1983.— 9, № 3.— С. 304—314.
 15. The primary structure of the polyhedral protein of Nuclear Polyhedrosis virus (NPV) of *Bombyx mori* / S. V. Serebryani, T. L. Levitina, M. S. Kautzman et al. // J. Invert. Pathol.— 1977.— 30, N 3.— P. 442—443.
 16. Сравнение аминокислотных последовательностей белков тел включений вирусов ядерного полиэдроза тутового, непарного шелкопряда и большой вошциной моли / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биоорг. химия.— 1981.— 7, № 7.— С. 1008—1015.
 17. Некоторые физико-химические свойства белка тел включений вируса ядерного полиэдроза и вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, С. Б. Серебряный // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 3.— С. 121—124.
 18. Kozlov E. A., Levitina T. L., Gusak N. M. The primary structure of Baculovirus inclusion body proteins. Evolution and structure-function aspects // Curr. Top. Microbiol. and Immunol.— 1986.— 131.— P. 131—164.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 20.03.90

УДК 535.082.56:577.352.335

Г. П. Горбенко, Т. С. Дюбко, О. А. Нардид, В. А. Моисеев

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА P-450 С ФОСФОЛИПИДАМИ МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

С помощью тушения собственной флюоресценции белка исследовали влияние фосфолипидов на структурное состояние цитохрома P-450. Предполагается, что глубина погружения цитохрома P-450 в липидный матрикс модельных мембран уменьшается в присутствии кислых фосфолипидов.

Введение. В настоящее время для исследования молекулярных механизмов структурно-функциональных взаимосвязей в биомембранах широко применяются реконструированные липид-белковые системы. Ранее при изучении взаимодействия интегрального белка цитохрома P-450 с модельными фосфолипидными мембранами было показано, что фосфолипиды оказывают влияние на конформацию и агрегатное состояние белка [1—3], а также на степень погружения белковой молекулы в бислой [4].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании структурного состояния комплексов цитохрома P-450 с фосфолипидами с помощью тушения собственной флюоресценции белка внешним тушителем акрил-амидом.

Материалы и методы. Цитохром P-450 LM₂ выделяли из микросом печени кроликов, получавших фенобарбитал в течение 5 дней [5]. Протеолипосомы получали холат-диализным методом [1] из фосфатидилхолина и смесей фосфатидилхолина с фосфатидилсерином (4 : 1) и дифосфатидилглицерином (9 : 1). Молярное соотношение липид : бе-

© Г. П. ГОРБЕНКО, Т. С. ДЮБКО, О. А. НАРДИД, В. А. МОИСЕЕВ, 1991

лок составляло 1000 : 1 при концентрации белка $\sim 1 \cdot 10^{-6}$ М. В работе использовали яичный фосфатидилхолин, фосфатидилсерин из мозга крупного рогатого скота и дифосфатидилглицерин из сердца крупного рогатого скота. Предприятия по производству бактериальных препаратов (Харьков, СССР), холат натрия, трис(оксиметил)-аминметан гидрохлорид производства НПО «Биолар» (Олайне, СССР), Na_2 -ЭДТА («Serva», ФРГ). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ч. д. а. и х. ч. Спектры флуоресценции белка в 0,01 М трис-НСl-буфере, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4, регистрировали при длине волны возбуждения 280 нм на спектрофлуориметре Hitachi-850. Данные по тушению флуоресценции цитохрома Р-450 нейтральным тушителем акриламидом анализировали с помощью уравнения Штерна—Фольмера [6, 7]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \cdot [Q],$$

где F_0, F — интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя, K_{sv} — константа Штерна—Фольмера, $[Q]$ — концентрация тушителя.

Результаты и обсуждение. На рисунке приведены графики Штерна—Фольмера для тушения флуоресценции цитохрома Р-450 в растворе и в комплексе с фосфолипидами. Можно видеть, что взаимодействие белка с липидным матриксом модельных мембран сопровождается заметным снижением эффективности тушения флуоресценции белковых хромофоров акриламидом. Известно, что молекула цитохрома Р-450 содержит 12 остатков тирозина и один остаток триптофана [8]. Наблюдаемое уменьшение доступности ароматических остатков тушителю при встраивании цитохрома Р-450 в липосомы может быть обусловлено двумя основными факторами: изменением структурно-динамического состояния белковой глобулы и погружением хромофоров в бислой. Ранее с помощью методов флуоресцентной [1] и КД-спектроскопии [9] получены данные, свидетельствующие о перестройках конформации цитохрома Р-450 при образовании белок-липидного комплекса. Вместе с тем предполагается, что эти перестройки имеют локальный характер и не сопровождаются существенными нарушениями структуры белка [4]. Поэтому представляется более вероятной вторая причина изменения эффективности тушения флуоресценции — уменьшение доступности хромофоров акриламиду вследствие погружения белка в бислой. Сравнение констант Штерна—Фольмера (M^{-1} , приведены ниже), характеризующих тушение флуоресценции белка в протеолипосомах различного состава, показывает, что доступность хромофоров тушителю выше в случае заряженных липосом:

Цитохром Р-450	2,0
+ Фосфатидилхолин	0,2
+ Фосфатидилхолин : фосфатидилсерин	0,9
+ Фосфатидилхолин : дифосфатидилглицерин	0,5

Очевидно, это обусловлено меньшим погружением белковой молекулы в липидный матрикс липосом, содержащих фосфатидилсерин или дифосфатидилглицерин, по сравнению с фосфатидилхолиновыми везикулами. Полученные данные согласуются с результатами исследования вращательной подвижности цитохрома Р-450 в протеолипосомах различного состава, свидетельствующими об уменьшении степени погружения белковых олигомеров в бислой при добавлении к фосфатидилхолину кислых фосфолипидов [4]. Поскольку липосомы, состоящие из смеси фосфатидилхолина с фосфатидилсеринном (4 : 1) или дифосфатидилглицерином (9 : 1), имеют одинаковый суммарный заряд, можно предположить, что глубина встраивания цитохрома Р-450 в липидный матрикс заряженных везикул определяется, главным образом, физико-

химическими свойствами полярных головок фосфолипидов, а не зарядом поверхности бислоя.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что одним из путей модифицирующего влияния заряженных фосфоли-

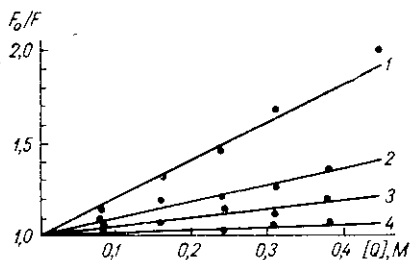


График Штерна—Фольмера для тушения флуоресценции цитохрома Р-450 акриламидом. Цитохром Р-450 в 0,01 М трис-НСl-буфере, 1 мМ ЭДТА, 20 % глицерин, рН 7,4 (1) и в протеолипосомах, сформированных из смесей (мол %) фосфатидилхолин: фосфатидилсерин (4:1) (2), фосфатидилхолин: дифосфатидилглицерин (9:1) (3) и фосфатидилхолина (4). Молярное отношение белок/липид 1:1 000

Stern-Volmer graph for quenching of cytochrome P-450 fluorescence by acrylamide. Cytochrome P-450 in 0.01 M tris-HCl-buffer, 1 mM EDTA, 20 % glycerol, pH 7.4 (1) and in proteoliposomes from phosphatidylcholine: phosphatidylserine (4:1, V/V) (2), phosphatidylcholine: diphosphatidylglycerol (9:1, V/V) (3) and phosphatidylcholine (4). Molar ratio of cytochrome P-450 phospholipid = 1:1000

пидов на структурно-функциональное состояние цитохрома Р-450 может быть изменение глубины погружения белка в фосфолипидный бислой.

Резюме

З допомогою тушення власної флуоресценції білка досліджували вплив фосфоліпідів на структурний стан цитохрому Р-450. Припускається, що глибина занурювання цитохрому Р-450 в ліпідний матрикс модельних мембран зменшується в присутності кислих фосфоліпідів.

Summary

The technique of fluorescence quenching permits studying the influence of phospholipids on the structural state of cytochrome P-450. It is supposed that the depth of protein incorporation in the lipid matrix of model membrane decreases in the presence of acid phospholipids.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Температурное тушение флуоресценции цитохрома Р-450 в протеолипосомах с различным физическим состоянием липидного бислоя / А. А. Ахрем, С. А. Романов, В. П. Карасев и др. // Биофизика.— 1988.— 33, № 2.— С. 275—281.
2. Мясоедова К. Н., Берндт П. Цитохром Р-450 в протеолипосомах: олигомерная структура изоформы LM₂ // Биохимия.— 1989.— 54, № 9.— С. 1445—1456.
3. Уваров В. Ю., Давыдов Р. М., Тимофеев В. П. ЭПР-спектроскопия спин-меченого цитохрома Р-450 LM₂ в изолированном и мембранносвязанном состояниях // Биофизика.— 1988.— 33, № 4.— С. 719—720.
4. Вращательная диффузия цитохрома Р-450 в модельной мембране различного фосфолипидного состава / А. А. Киселев, Г. Гарда, С. А. Финч и др. // Докл. АН СССР.— 1989.— 307, № 2.— С. 473—476.
5. Haugen D. A., Coon M. J. Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and β-naphthoflavone-inducible microsomal cytochrome P-450 // J. Biol. Chem.— 1976.— 251, N 24.— P. 7929—7939.
6. Лаквич Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.— 496 с.
7. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков.— Киев: Наук. думка, 1988.— 277 с.
8. Heinemann F. S., Ozols J. The complete amino acid sequence of rabbit phenobarbital-induced liver microsomal cytochrome P-450 // J. Biol. Chem.— 1983.— 258, N 7.— P. 4195—4205.
9. Влияние фосфолипидов и белков на конформационное состояние цитохрома Р-450 / Д. Вернике, Ю. Ю. Володин, В. Ю. Уваров, А. И. Арчаков // Всесоюз. конф. «Цитохром Р-450 и охрана внутренней среды человека»: Тез. докл.— Пущино, 1985.— С. 35.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины АН УССР,
Харьков

Получено 20.03.90