

УДК. 547.92.057

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ (22S,23S)- И (22R,23R)-3 β -ГИДРОКСИ-22,23-ОКСИДО-5 α -ЭРГОСТ-8(14)-ЕН-15-ОНОВ НА БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИЛОВЫХ ЭФИРОВ И АКТИВНОСТЬ АЦИЛ-КоА:ХОЛЕСТЕРИН-АЦИЛТРАНСФЕРАЗЫ В КЛЕТКАХ Нер G2

*А.Р. Мехтиев, Н.И. Козлова, В.В. Скрипник, А.Ю. Мишарин**

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
РАМН, 119992, Москва, Погодинская ул., 10.;
эл.почта: alexander.misharin@ibmc.msk.ru

Новые синтетические оксистерины (22S,23S)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (**I**) и (22R,23R)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (**II**) изменяли уровень биосинтеза холестерилловых эфиров в клетках гепатомы человека линии Нер G2 из [¹⁴C]ацетата (85% и 180% от контроля при 5 мкМ). Уровень биосинтеза холестерилловых эфиров в клетках Нер G2 из [¹⁴C]олеата в присутствии кетостерина (**I**) повышался пропорционально концентрации соединения, в то время как уровень биосинтеза холестерилловых эфиров в присутствии кетостерина (**II**) имел максимум (269 \pm 20% от контроля) при концентрации соединения 1 мкМ. В бесклеточной системе кетостерин (**I**) увеличивал скорость АСАТ-зависимого ацилирования холестерина подобно 25-гидроксихолестерину, а кетостерин (**II**), эффективно стимулируя начальную скорость АСАТ-катализируемой реакции, вызывал быструю инактивацию фермента.

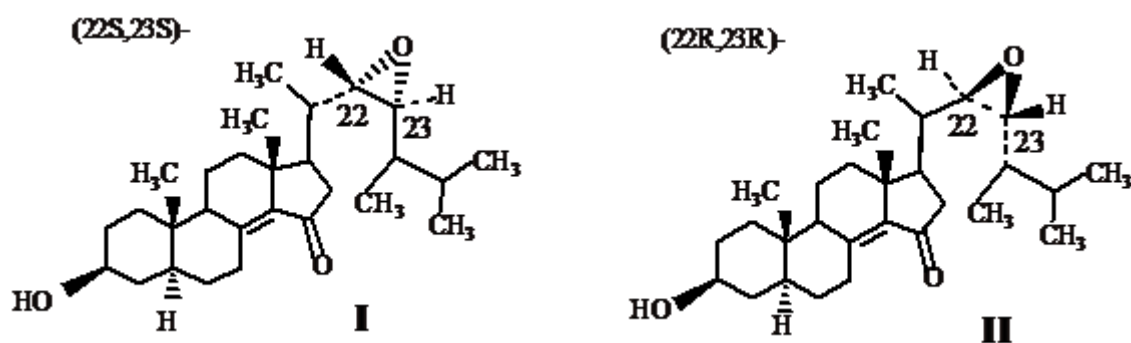
Ключевые слова: оксистерины, холестерин, холестерилловые эфиры, АСАТ, клетки Нер G2.

ВВЕДЕНИЕ. Синтетические 15-оксигенированные стеринны привлекают внимание исследователей вследствие их способности подавлять биосинтез и регулировать метаболизм холестерина в культуре клеток и проявлять гипохолестеринемическую активность *in vivo* [1]. Химический синтез и исследование биологической активности новых 15-оксигенированных стериннов, в особенности соединений, содержащих модифицированную боковую цепь, является важной задачей.

Недавно нами был осуществлён синтез серии новых Δ 8(14)-15-кетопроизводных ряда эргостана [2-5]. Два соединения из этой серии: (22S,23S)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (**I**) и (22R,23R)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (**II**) эффективно подавляли биосинтез холестерина и регулировали метаболизм липидов в клетках гепатомы человека линии Нер G2 [6].

Сокращения: АСАТ – ацил-кофермент А : холестерин-ацилтрансфераза (официальное систематическое название: SOAT – стерол-3-О-ацилтрансфераза (<http://www.gene.ucl.ac.uk/cgi-bin/nomenclature/searchgenes.pl>)); ЛПОНИ – липопротеины очень низкой плотности; PBS – фосфат-содержащий физиологический раствор; FCS – эмбриональная сыворотка теленка; ХЭ – холестерилловые эфиры, ХО – холестерилолеат; ФХ – фосфатидилхолин яичного желтка; 25НС – 25-гидроксихолестерин; PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

* – адресат для переписки



Важную роль в гомеостазе холестерина играет внутриклеточное образование холестерилловых эфиров в реакции, катализируемой ацил-кофермент А:холестерин-ацилтрансферазой (АСАТ) [7-10]. В клетках млекопитающих АСАТ-активностью обладают два фермента (АСАТ-1 и АСАТ-2) [7-10]; в клетках печени активность АСАТ определяет образование и секрецию ЛПОНП [10-12]. Целью настоящей работы является исследование влияния соединений (I) и (II) на биосинтез холестерилловых эфиров и активность АСАТ в клетках гепатомы Нер G2.

МЕТОДИКА. Холестерин, 25НС, дезоксихолат Na, дитиотреитол, PMSF, ЭДТА, трис-НСI и ФХ получены от фирмы “Sigma”; $[1-^{14}\text{C}]$ ацетат Na, $[1-^{14}\text{C}]$ олеат Na и $[1-^{14}\text{C}]$ олеил-КоА от “Amersham”; культуральный пластик от “Greiner”, “Costar” и “Corning”, среды и FCS от “Gibco BRL” и “HyClone”; растворители очищены стандартными методами; (22S,23S)-3β-гидрокси-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он (I) и (22R,23R)-3β-гидрокси-22,23-оксидо-5α-эргост-8(14)-ен-15-он (II) синтезированы по методу [5].

Концентрацию белка определяли реакцией с бицинхониновой кислотой [13], концентрацию холестерина - ферментативным методом при помощи стандартного набора “Оксохром ХОЛЕСТЕРИН” фирмы “Lachema” по протоколу фирмы-изготовителя.

ТСХ липидных экстрактов проводили на пластинках Kieselgel UV₂₅₄ фирмы “Merck” в системах гексан-диэтиловый эфир-CH₃COOH (70:29:1) в присутствии внутренних стандартов (холестерина, холестерилолеата, триолеина, олеиновой кислоты); после проявления фракций в парах иода, зоны соскабливали и проводили измерение радиоактивности в толуольном сцинтилляторе на счетчике фирмы “LKB”.

Клетки гепатомы человека линии Нер G2, полученные из Европейской Коллекции Клеточных Культур (ECACC, Salisbury), культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в среде RPMI 1640 с 10% FCS. Клетки выращивали в 24- или 6- луночных планшетах или флаконах, площадью 25 см². Соединения (I) и (II) добавляли к культуральной среде в этанольном растворе, содержание этанола во всех опытах, включая соответствующие контроли, составляло 0,4%.

Влияние соединений (I) и (II) на уровень биосинтеза холестерилловых эфиров в клетках Нер G2 из $[^{14}\text{C}]$ ацетата. Клетки Нер G2 инкубировали 24 ч с соединениями (I) и (II) в концентрации 5 мкМ в среде, содержащей 10% FCS, затем среду заменяли на свежую, содержащую 10% FCS, $[1-^{14}\text{C}]$ ацетат Na (5 мкКи на 1 мл среды) (опыт 1) или 10% FCS, $[1-^{14}\text{C}]$ ацетат Na (5 мкКи на 1 мл среды) и соединения (I) и (II) в концентрации 5 мкМ (опыт 2), и продолжали инкубацию 6 ч. Клетки трижды промывали PBS, липиды экстрагировали смесью гексан-изопропанол (3:2) и разделяли ТСХ, клеточный остаток использовали для определения содержания белка. Уровень биосинтеза холестерина, жирных кислот, триглицеридов и холестерилловых эфиров [14] рассчитывали по включению радиоактивной метки в соответствующие фракции, нормируя на содержание клеточного белка. Каждое определение проводили в трех повторах в трёх независимых экспериментах.

Влияние соединений (I) и (II) на уровень биосинтеза холестероловых эфиров в клетках Нер G2 из [^{14}C]олеата. Клетки Нер G2 инкубировали 24 ч в среде, содержащей 10% FCS, затем среду заменяли на свежую, содержащую 10% FCS, исследуемые соединения (I) и (II) в различных концентрациях и [^{14}C]олеат Na (мкКи на 1 мл среды) и продолжали инкубацию 6 ч. Клетки трижды промывали PBS, липиды экстрагировали смесью гексан-изопропанол (3:2) и разделяли ТСХ, клеточный остаток использовали для определения содержания белка. Уровень биосинтеза холестероловых эфиров [14] рассчитывали по включению радиоактивной метки в соответствующую фракцию, нормируя на содержание клеточного белка. Каждое определение проводили в трех повторах в трех независимых экспериментах.

Влияние соединений (I) и (II) на активность АСАТ в бесклеточной системе. Получение клеточного лизата; приготовление модельных субстратов, содержащих холестерин, 25НС, кетостерины (I) и (II); инкубацию модельных субстратов с клеточным лизатом и [^{14}C]олеил-КоА проводили по методу [15].

Для получения клеточного лизата клетки Нер G2, выращенные в культуральном флаконе, соскабливали, промывали PBS при 4°C, центрифугировали 5 мин при 20°C и 100 g и замораживали при -70°C. Остаток гомогенизировали 3 мин при 4°C в 900 мкл 10 мМ трис-НСl буфера (pH 7,6), содержащего 10 мМ KCl, 1,5 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и 1 мМ дитиотреитола, затем к гомогенату прибавляли 100 мкл 100 мМ трис-НСl буфера (pH 7,6), содержащего 400 мМ KCl, 35 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и 1 мМ дитиотреитола и наконец, полученную смесь разбавляли вдвое 50 мМ трис-НСl буфером (pH 7,8), содержащим 5 мМ ЭДТА, 0,1 мМ PMSF и 48 мМ дезоксихолат Na. Аликвота полученного лизата (60 мкл), используемая в качестве источника АСАТ для одного определения, содержала 20 мкг белка и 20 мкг холестерина.

Для приготовления модельных субстратов 100 мМ растворы ФХ, холестерина, 25НС, кетостеринов (I) и (II) в изопропанол смешивали в рассчитанных соотношениях, упаривали досуха, растворяли в 100 мкл изопропанола и аликвоту объемом 40 мкл впрыскивали при встряхивании в 2 мл 50 мМ трис-НСl буфера (pH 7,8), содержащего 5 мМ ЭДТА и 48 мМ дезоксихолата Na. Аликвота полученного модельного субстрата, используемого для одного определения (100 мкл) содержала 800 мкг ФХ, 30 мкг холестерина, 150 мкг оксистерина.

К 100 мкл раствора модельного субстрата прибавляли 60 мкл клеточного лизата и смесь выдерживали 20 мин при 4°C. К полученной смеси прибавляли [^{14}C]олеил-КоА (0,018 мкКи) в 40 мкл 100 мМ трис-НСl буфера (pH 7,8), содержащего 12,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Таким образом, каждая проба содержала 20 мкг клеточного белка, 800 мкг ФХ, 50 мкг холестерина, 150 мкг оксистерина и 310 пмоль олеил-КоА. Пробы инкубировали при 37°C в течение 5, 10 или 15 мин. Реакции останавливали добавлением 2 мл хлороформа, прибавляли 800 мкл PBS и отделяли хлороформный слой. Хлороформный экстракт сушили Na_2SO_4 , упаривали и радиоактивные продукты разделяли ТСХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для изучения влияния соединений (I) и (II) на биосинтез ХЭ в клетках Нер G2 были проведены опыты по оценке скорости биосинтеза из радиоактивных предшественников - [^{14}C]ацетата и [^{14}C]олеата.

Клетки Нер G2, преинкубированные с соединениями (I) и (II) в концентрации 5 мМ в течение 24 ч, выдерживали 6 ч с [^{14}C]ацетатом в отсутствии (опыт 1) или в присутствии (опыт 2) исследуемых соединений, после чего определялось содержание радиоактивности во фракции ХЭ (рис. 1). Очевидно, что включение радиоактивности во фракцию ХЭ зависит от скоростей биосинтеза холестерина и жирной кислоты, а также от скорости АСАТ-зависимого ацилирования холестерина. Ранее [6] было найдено, что в этих условиях кетостерины (I) и (II) вдвое снижают включение [^{14}C]ацетата в холестерин, не оказывая заметного влияния на включение [^{14}C]ацетата в жирные кислоты.

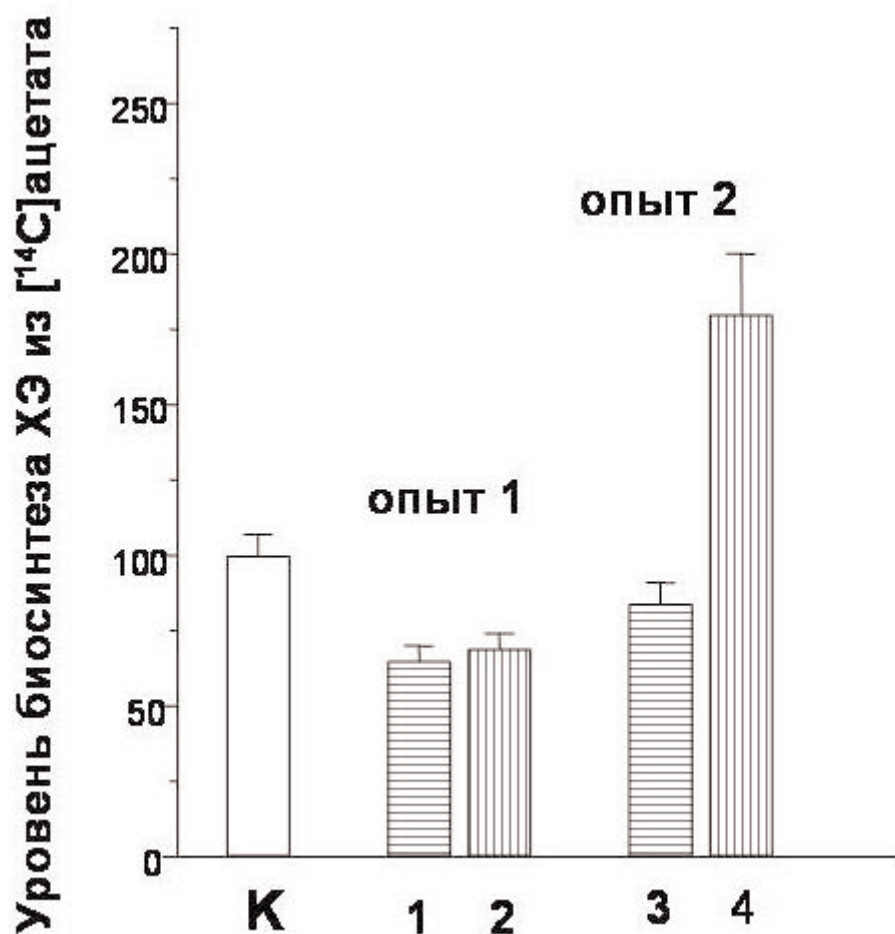


Рисунок 1.

Влияние соединений (I) и (II) на уровень биосинтеза ХЭ из $[^{14}\text{C}]$ ацетата в клетках Нер G2, прединкубированных 24 ч в среде, содержащей 10% FCS и исследуемые соединения в концентрации 5 мкМ (см. Методика).

К - Контрольное значение (100%, 5500 имп/мин/1 мг клеточного белка за 6 ч).

1 - Образование $[^{14}\text{C}]$ ХЭ в клетках прединкубированных с соединением (I); 2 - образование $[^{14}\text{C}]$ ХЭ в клетках прединкубированных с соединением (II) (опыт 1 проводился в отсутствие кетостеринов в среде). 3 - Образование $[^{14}\text{C}]$ ХЭ в клетках прединкубированных с соединением (I); 4 - образование $[^{14}\text{C}]$ ХЭ в клетках прединкубированных с соединением (II) (опыт 2 проводился в присутствии 5 мкМ кетостеринов в среде).

Из рисунка 1 видно, что уровень биосинтеза ХЭ из $[^{14}\text{C}]$ ацетата в клетках, преинкубированных с кетостеринами (I) и (II) (опыт 1), ниже, чем в контроле (65% и 69% соответственно), что согласуется с ингибирующим эффектом соединений на биосинтез холестерина. Уровень биосинтеза ХЭ из $[^{14}\text{C}]$ ацетата в присутствии соединений (I) и (II) (опыт 2) был достоверно повышен, причем в присутствии соединения (II) наблюдалось значительное повышение (180% от контроля). Из этих данных следует, что предварительная инкубация клеток Нер G2 с кетостеринами (I) и (II) не влияет на уровень биосинтеза ХЭ, но присутствие кетостеринов во время инкубации клеток с радиоактивным предшественником, оказывает стимулирующий эффект.

Подобный эффект ранее был описан для некоторых оксистериннов, являющихся аллостерическими регуляторами АСАТ [16,17], в частности, 25НС в четыре раза стимулировал биосинтез ХЭ в клетках Нер G2, но эффект пропал после выдерживания клеток в среде без 25НС [18].

Влияние соединений (I) и (II) на уровень биосинтеза ХЭ из [14 C]олеата представлено на рисунке 2. Клетки Нер G2 в присутствии 10% FCS инкубировали с соединениями (I) и (II) и [14 C]олеиновой кислотой [14, 15, 19] в течение 6 ч, и измеряли включение радиоактивности во фракцию ХЭ. Зависимости уровня биосинтеза [14 C]ХО в клетках от концентрации соединений (I) и (II) резко различались. Кетостерин (I) стимулировал включение [14 C]олеата во фракцию ХЭ пропорционально его концентрации; кетостерин (II) эффективно увеличивал включение радиоактивности во фракцию ХЭ в низких концентрациях (0–2 мкМ), но при более высоких концентрациях (3–6 мкМ) стимулирующий эффект пропадал. Низкий уровень биосинтеза холестерилвых эфиров при 18 мкМ соединения (II) можно объяснить тем, что в этих условиях проявляется общий цитотоксический эффект соединения [5], приводящий к заметному ингибированию всех путей ацетатного биосинтеза.

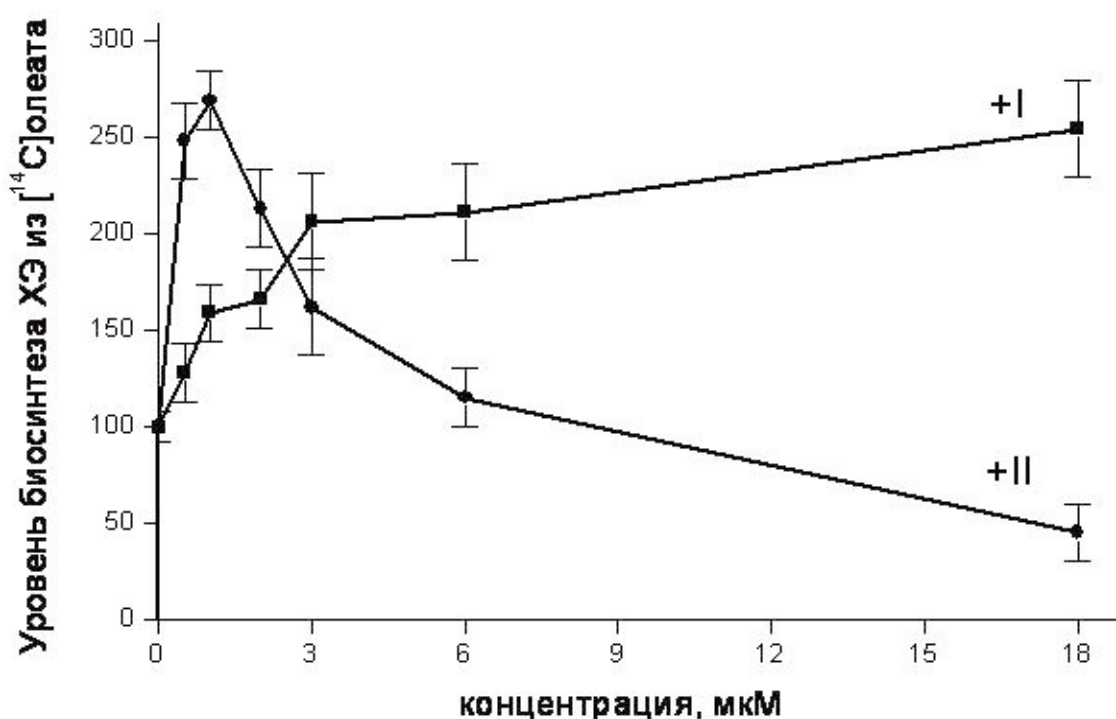


Рисунок 2.

Влияние соединений (I) и (II) на уровень биосинтеза ХЭ из [14 C]олеата в клетках Нер G2 в среде, содержащей 10% FCS (см. Методика). Контрольное значение (уровень биосинтеза ХЭ в отсутствии исследуемых соединений), принятое за 100%, составляло 1200 имп/мин/1 мг клеточного белка за 6 ч.

Эксперименты с культурой клеток Нер G2 (рис. 1 и 2) показали, что кетостерины (I) и (II) оказывают различное влияние на биосинтез ХЭ, причем эффект кетостеринов не зависит от их предварительной инкубации с клетками, а проявляется только в присутствии соединений (I) и (II). Это свидетельствует, что кетостерины (I) и (II) оказывают непосредственное влияние на образование ХЭ в реакции, катализируемой АСАТ. Оценка биосинтеза ХЭ в интактных клетках требует длительной инкубации клеток с радиоактивными предшественниками и поэтому позволяет получить лишь усредненные по времени значения уровня биосинтеза ХЭ, но не дает возможности судить о влиянии соединений на активность АСАТ.

ВЛИЯНИЕ ОКСИСТЕРИНОВ НА СИНТЕЗ И ОБМЕН ХОЛЕСТЕРИЛОВЫХ ЭФИРОВ

Известно несколько способов определения ферментативной активности АСАТ в бесклеточных системах, основанных на реакции $[^{14}\text{C}]$ олеоил-КоА с холестерином, входящим в состав модельного субстрата, в присутствии источника АСАТ (микросомальной фракции клеток или клеточного лизата) [15, 20-23]. В данной работе мы использовали метод [15]. Для выбора оптимального состава модельного субстрата, обеспечивающего линейность зависимости образования $[^{14}\text{C}]\text{ХО}$ от времени на начальном участке, мы провели предварительные опыты, в которых использовались мицеллы с различным содержанием холестерина и 25НС. На рисунке 3А показано образование $[^{14}\text{C}]\text{ХО}$ в АСАТ-катализируемой реакции в отсутствие (прямая К) и в присутствии 25НС (прямая +25НС). Рассчитанные из графика 3А скорости ферментативной реакции $[9,6 (\pm 1) \text{ пмоль } \text{ХО} / \text{мин} / 1 \text{ мг клеточного белка}]$ и двукратный стимулирующий эффект 25НС на активность АСАТ соответствовали описанным в работе [15]. В данном опыте инкубация $[^{14}\text{C}]$ олеоил-КоА проводилась с модельным субстратом, содержащим 50 мкг холестерина и 150 мкг 25НС.

На рисунке 3Б показано образование $[^{14}\text{C}]\text{ХО}$ в АСАТ-катализируемой реакции в отсутствие кетостеринов (К), в присутствии кетостерина (I) (+I), в присутствии кетостерина (II) (+II). В каждой из инкубационных проб содержание холестерина составляло 50 мкг, а содержание кетостеринов (I) или (II) - 150 мкг.

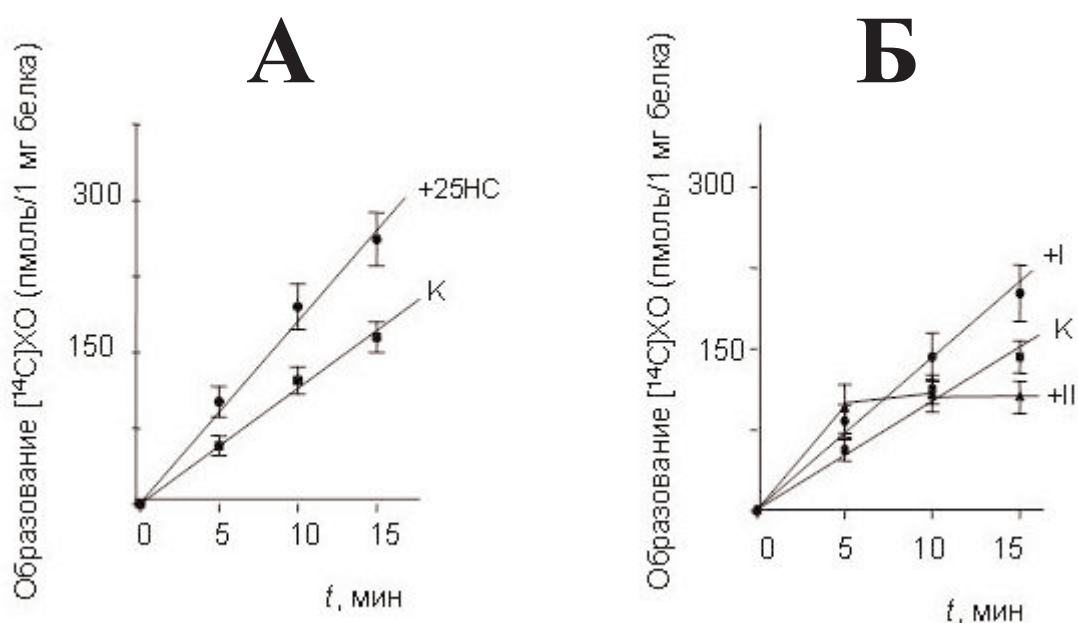


Рисунок 3.

А. АСАТ-зависимое образование $[^{14}\text{C}]\text{ХО}$ в реакции $[^{14}\text{C}]$ олеоил-КоА и модельного субстрата, содержащего 50 мкг холестерина (К) или 50 мкг холестерина и 150 мкг 25НС (+25НС) (см. Методика).

Б. АСАТ-зависимое образование $[^{14}\text{C}]\text{ХО}$ в реакции $[^{14}\text{C}]$ олеоил-КоА и модельного субстрата, содержащего 50 мкг холестерина (К); 50 мкг холестерина и 150 мкг кетостерина (I) (+I); 50 мкг холестерина и 150 мкг кетостерина (II) (+II) (см. Методика).

В присутствии соединения (I) начальная скорость АСАТ-зависимого ацилирования холестерина сохраняла линейную зависимость от времени в течение 15 мин и превышала начальную скорость реакции в контрольном эксперименте на 45%. Стимулирующий эффект кетостерина (I) на активность АСАТ был ниже, чем эффект 25НС в тех же условиях.

В присутствии соединения (II) скорость образования [^{14}C]ХО за первые 5 мин была значительно выше, чем в контроле. Однако при увеличении времени инкубации не наблюдалось дальнейшего увеличения [^{14}C]ХО (рис. 3Б). Последнее указывает на быструю инактивацию фермента. Однако вопрос о том, чем вызвана быстрая инактивация АСАТ под действием соединения (II): непосредственным взаимодействием кетостерина (II) с ферментом или особенностью структуры модельного субстрата, содержащего кетостерин (II), остается открытым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Результаты данной работы показали, что кетостерины (I) и (II) влияют на биосинтез холестерилвых эфиров в клетках Нер G2, непосредственно регулируя активность АСАТ. Эффекты эпимерных по С22 и С23 эпоксидов (I) и (II) резко различаются. Это свидетельствует о том, что стереохимическая конфигурация эпоксидной группы в боковой цепи соединений (I) и (II) определяет влияние соединений на биосинтез холестерилвых эфиров и активность АСАТ. Таким образом, результаты, полученные в данной работе и ранее [6], позволяют рассматривать $\Delta 8(14)$ -15-кетопроизводные ряда эргостана, содержащие эпоксигруппу в боковой цепи, как перспективные регуляторы ферментов метаболизма стерина в клетках печени.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект РФФИ 06-04-48803).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schroepfer G.J.* (2000) *Physiol. Rev.*, **80**, 361-554.
2. *Мишарин А.Ю., Тимофеев В.П.* (2004) *Биоорган. химия*, **30**, 84-88.
3. *Пийр Е.А., Медведева Н.В., Каширина Н.М., Шевелев А.Я., Мишарин А.Ю.* (2004) *Биоорган. химия*, **30**, 547-551.
4. *Флегентов Г.Ю., Пийр Е.А., Медведева Н.В., Ткачев Я.В., Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю.* (2005) *Биоорган. химия*, **31**, 312-319.
5. *Misharin A.Yu, Ivanov V.S., Mehtiev A.R., Morozovich G.E, Tkachev Ya.V., Timofeev V.P.* (2007). *Steroids*, **72**, 305-312.
6. *Мехтиев А.Р., Морозевич Г.Е., Иванов В.С., Мишарин А.Ю.* (2007) *Биомед. химия*, **53**, 321-327.
7. *Oelkers P., Behari A., Cromley D., Billheimer J.T., Sturley S.L.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 26765–26771.
8. *Buhman K.F., Accad M., Farese R.V.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1529**, 142-154.
9. *Chang T.Y., Chang C.C.Y., Lu X., Lin S.* (2001) *J. Lipid Res.*, **42**, 1933–1938.
10. *Smith J.L., Rangaraj K., Simpson R., Maclean D.J., Nathanson L.K., Stuart K.A., Scott S.P., Ramm G.A., de Jersey J.* (2004). *J. Lipid Res.*, **45**, 686-696.
11. *Spady D.K., Willard M.N., Meidell R.S.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 27005–27012.
12. *Rudel L.R., Lee R.G., Parini P.* (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 1112-1118.
13. *Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.* (1985) *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
14. *Goldstein J.L., Anderson R.G.W., Brown M.S.* (1979) *Methods Enzymol.*, **98**, 241-261.
15. *Cheng D., Chang C.C.Y., Qu X.-M., Chang T.Y.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 685-695.
16. *Miller S.C., Melnikov G.* (1984). *J. Lipid Res.*, **25**, 991–999.
17. *Morin R.J., Peng S.K.* (1992) *Lipids*, **27**, 478-480.
18. *Kisseleva A.F., Gogyunova L.E., Medvedeva N.V., Alquier C., Morozkin A.D., Misharin A.Yu.* (1999) *FEBS Lett.*, **446**, 163-168.
19. *Harte R.A., Yeaman S.J., McElhinney J., Suckling C.J., Jackson B., Suckling K.E.* (1996) *Chem. Phys. Lipids*, **83**, 45-59.

20. Cadigan K.M., Chang T.Y. (1988) J. Lipid Res., **29**, 1683-1692.
21. Chang C.C.Y., Chen J., Thomas M.A., Cheng D. Del Priore V.A., Newton R.S., Pape M.E., Chang T.Y. (1995) J. Biol. Chem. **270**, 29532-29540.
22. Chang C.C.Y., Lee C.Y.G., Chang E.T., Cruz J.C., Levesque M.C., Chang T.Y. (1998) J. Biol. Chem. **273**, 35132-35141.
23. Zhang Y., Yu C., Liu J., Spencer T.A., Chang C.C.Y., Chang T.Y. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 11642-11647.

Поступила: 08. 10. 2007.

EFFECTS OF (22S,23S)- AND (22R,23R)-3 β -HYDROXY-22,23-OXIDO-5 α -ERGOST-8(14)-EN-15-ONES ON CHOLESTERYL ESTERS BIOSYNTHESIS AND ACYL-CoA:CHOLESTEROL ACYL TRANSFERASE ACTIVITY IN HEP G2 CELLS

A.R. Mehtiev, N.I. Kozlova, V.V. Skripnik, A.Yu. Misharin

Orechovich Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119992 Russia;
e-mail: alexander.misharin@ibmc.msk.ru

Novel synthetic oxysterols (22S,23S)-3 β -hydroxy-22,23-oxido-5 α -ergost-8(14)-en-15-one (**I**) and (22R,23R)-3 β -hydroxy-22,23-oxido-5 α -ergost-8(14)-en-15-one (**II**) influenced cholesteryl esters biosynthesis in human hepatoma Hep G2 cell line from [¹⁴C]acetate (85% and 180% compared to control at the concentrations of 5 μ M). The level of cholesteryl esters biosynthesis in Hep G2 cells from [¹⁴C]oleate increased in the presence of ketosterol (**I**) in a dose dependent manner, whereas the level of cholesteryl esters biosynthesis in the presence of ketosterol (**II**) reached the maximal value (269 \pm 20% from control) at the concentration of 1 μ M. In a cell free system ketosterol (**I**) increased the rate of ACAT-dependent cholesterol acylation like 25-hydroxycholesterol, however, ketosterol (**II**), efficiently stimulating initial rate of ACAT-catalyzed cholesterol esterification, caused in rapid inactivation of this enzyme.

Key words: oxysterols, cholesterol, cholesteryl esters, ACAT, Hep G2 cells.