



УДК 577.112.851:543.422.27:543.426

ОБРАЗОВАНИЕ МИЦЕЛЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ
АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I С ДИМИРИСТОИЛФОСФАТИДИЛХОЛИНОМ*Мишарин А. Ю., Медведева Н. В., Бушмакина Н. Г.,
Антонов И. В., Бушуева Т. Л.**Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Изменения структуры аполипопротеина А-I из липопротеинов высокой плотности плазмы крови человека, вызываемые добавлением 2-хлорэтанола, исследованы методами флуоресцентной и ЭПР-спектроскопии.

Показаны обратимые изменения степени иммобилизации ковалентно связанной с белком спиновой метки и флуоресценции триптофановых хромофоров в интервале концентраций 2-хлорэтанола 0–40%.

Присутствие димиристоилфосфатидилхолина оказывает влияние на эти спектральные параметры при концентрации 2-хлорэтанола ниже 30%. Равновесным диализом показано отсутствие связывания мономерной формы димиристоилфосфатидилхолина с аполипопротеином А-I. Сделан вывод: комплексообразование аполипопротеина А-I с фосфатидилхолином в водно-органической среде вызывается мицеллообразованием липида.

Комплексообразование аполипопротеинов с липидами широко используется для изучения специфики липидно-белковых взаимодействий в липопротеинах, а также для выяснения многих вопросов метаболизма липопротеинов [1–4].

Комплексы апоА-I с фосфолипидами, а также способы получения таких частиц, основанные на инкубации компонентов при температуре фазового перехода фосфолипидов, или в присутствии детергента недавно освещались в обзорах [5, 6]. В основе этих методов комплексообразования лежит связывание поверхностно-активного белка с липидным агрегатом (липосомами фосфатидилхолина или смешанными мицеллами фосфатидилхолин–детергент) с последующим формированием мицеллярного белок-липидного комплекса. Как было показано в работах [7, 8], лизофосфатидилхолин образует комплексы с апоА-I в водной среде при концентрации как выше, так и ниже ККМ.

Нами [9] был предложен способ комплексообразования апоА-I с фосфатидилхолином и холестерином в присутствии органического растворителя (2-хлорэтанола), что позволило выделить тройные комплексы с относительно высоким содержанием белка. Оказалось, что полученные частицы могут служить моделями липопротеинов высокой плотности при взаимодействии последних с клетками в культуре [10].

Настоящая работа является продолжением изучения комплексообразования апоА-I с липидами в водно-органической среде. Концентрация мономерной формы фосфатидилхолина, естественно, зависит от содержания 2-хлорэтанола. В то же время 2-хлорэтанол существенно влияет на структуру апоА-I, увеличивая долю α -спиральных участков. В данной работе предпринята попытка связать структурные перестройки молекулы апоА-I, вызываемые добавлением 2-хлорэтанола, со способностью белка образовывать комплексы с ДМФХ в мономерной или мицеллярной форме. Для характеристики конформационных изменений молекулы апоА-I в растворах и в комплексе апоА-I/ДМФХ использованы методы ковалентно связанной спиновой метки и собственной флуоресценции триптофановых остатков апоА-I.

Сокращения: апоА-I – аполипопротеин А-I, ККМ – критическая концентрация мицеллообразования, ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин, КД – круговой диализ.

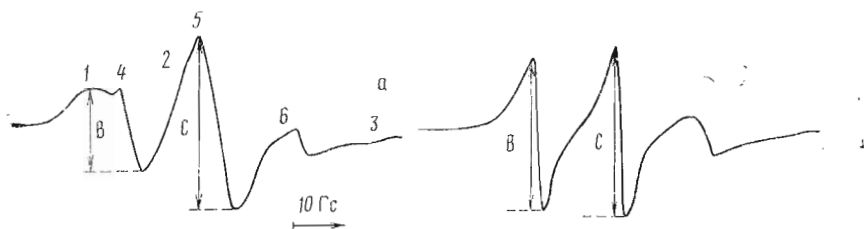


Рис. 1. Спектры ЭПР SL-апоА-I (20 мкМ) в буфере А (а) и в 50% водном 2-хлорэтаноле (б). Пики 1–3 отвечают иммобилизованной форме спиновой метки, 4–6 – слабой иммобилизации; В и С – низкополюсная и центральная компонента спектра

Парамагнитное производное триазинилхлорида (1), реагирующее с нуклеофильными остатками в белках [11], использовано для получения спин-меченого апоА-I (SL-апоА-I). Спектр ЭПР SL-апоА-I в буфере (рис. 1а) представляет собой суперпозицию двух триплетов – соответствующих значительной иммобилизации парамагнитного фрагмента (пики 1, 2, 3) и слабой иммобилизации (пики 4, 5, 6). Добавление 2-хлорэтанола к SL-апоА-I вызывает качественные изменения формы спектра (трансформируется «иммобилизованный спектр», пики 1, 2, 3) при этом подвижность спиновой метки значительно увеличивается и в 50% 2-хлорэтаноле спектр представляет собой триплет с хорошо разрешенными компонентами (рис. 1б), по положению совпадающими с компонентами «слабоиммобилизованного» спектра.

За происходящими структурными изменениями белка в растворах 2-хлорэтанола разной концентрации судили по изменению отношения интенсивностей низкополюсной и центральной компонент спектра ЭПР, В/С (см. рис. 1), которое характеризует подвижность метки [11]. Изменение этого параметра при титровании свидетельствует об увеличении конформационной подвижности белка в местах локализации метки при переходе от воды к 2-хлорэтанолю. Результаты титрования 2-хлорэтанолом SL-апоА-I в присутствии и в отсутствие ДМФХ представлены на рисунке 2а. Спектральные изменения полностью обратимы в интервале концентраций 2-хлорэтанола 0–40% (рис. 2, 1, 2), дальнейшее увеличение содержания 2-хлорэтанола в смеси не вызывает заметных спектральных изменений. В присутствии ДМФХ изменения значений В/С от концентрации 2-хлорэтанола происходят в интервале концентраций 2-хлорэтанола 30–50% (рис. 2а, 3). При этом значения параметра В/С при соответствующих концентрациях 2-хлорэтанола для спектров спин-меченого апоА-I в присутствии ДМФХ отличаются от таковых для белка в отсутствие липида. Спектр SL-апоА-I в 15% 2-хлорэтаноле в присутствии ДМФХ практически идентичен спектру выделенного комплекса SL-апоА-I/ДМФХ (см. «Экспериментальную часть»).

Ранее [9] метод спинового зонда был использован нами для исследования влияния концентрации 2-хлорэтанола на агрегацию фосфатидилхолинов. На рис. 2б и 2в представлены спектры ЭПР спин-меченого фосфатидилхолина (II) в смеси с ДМФХ (1 : 100 моль/моль) и их изменения в зависимости от концентрации 2-хлорэтанола. Спектр ЭПР в 50% 2-хлорэтаноле представляет собой триплет, характерный для мономерной формы фосфолипидов. Снижение концентрации 2-хлорэтанола в смеси приводит к появлению сигнала (а), характерного для спин-меченого фосфатидилхолина (II) в агрегатах ДМФХ. На рис. 2б представлен экспериментальный спектр в 15% 2-хлорэтаноле. Отношение интенсивностей сигнала в точках а и д (I_a/I_d соответственно) характеризует отношение мицеллярной и мономерной форм фосфатидилхолина. Результаты титрования смеси спин-меченой фосфатидилхолина (II)/ДМФХ буфером А (рис. 2в) указывают на резкое увеличение концентрации мицеллярной формы фосфолипидов при снижении концентрации 2-хлорэтанола ниже 30%. Сравнение рис. 2а и 2в свидетельствует о том, что образование комплекса апоА-I/ДМФХ происходит синфазно с агрегацией ДМФХ.

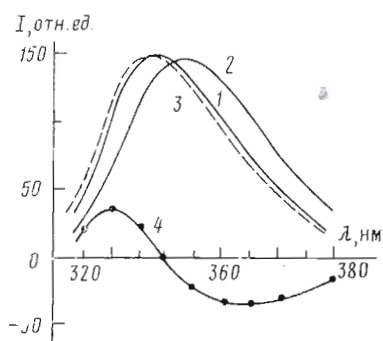
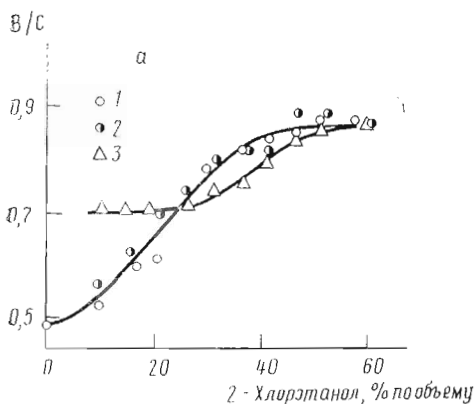


Рис. 3

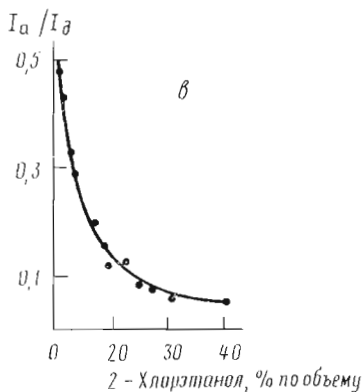
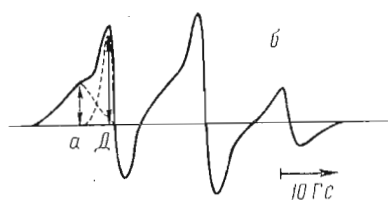


Рис. 2

Рис. 2. Влияние 2-хлорэтанола на спектры ЭПР SL-апоА-I и спин-меченого фосфатидилхолина (П): а — Изменение параметра B/C в спектрах ЭПР SL-апоА-I в зависимости от концентрации 2-хлорэтанола (1 — прямое и 2 — обратное титрование); то же в присутствии ДМФХ (3); б — Спектр ЭПР смеси спин-меченой фосфатидилхолин (П)/ДМФХ (1:100 моль/моль) в 15% 2-хлорэтаноле. I_a/I_D — отношение интенсивностей компонент спектра мицеллярной и мономерной форм радикала (П). (Концентрация фосфолипида (П) 20 мкМ). в — Изменение параметра I_a/I_D (рис. 2б) в зависимости от концентрации 2-хлорэтанола в смеси

Рис. 3. Спектры флуоресценции апоА-I в буфере А (1), в 50% 2-хлорэтаноле (2), спектр комплекса апоА-I/ДМФХ (1:120 моль/моль) в буфере А (3), разность спектров (1) и (2) — (4)

Спектры флуоресценции апоА-I в буфере А (рис. 3, спектр 1) и в 50% 2-хлорэтаноле (рис. 3, спектр 2) значительно различаются по положению максимума без заметного изменения квантового выхода. Это свидетельствует о различном окружении триптофановых хромофоров в воде и в присутствии высоких концентраций 2-хлорэтанола. Разностный спектр (рис. 3, график 4) указывает, что различия в интенсивности спектров апоА-I в воде и 50% 2-хлорэтаноле максимальны при 320 и 365 нм. Анализ интенсивности при двух длинах волн позволяет судить о структурных перестройках белка, сопровождающих изменения локального окружения хромофора [12]. Очевидно, что сдвиг спектра флуоресценции при добавлении 2-хлорэтанола обязан вызвать изменения интенсивности при определенной длине волны (в нашем случае выбраны 320 и 360 нм). Рис. 4а показывает, что титрование апоА-I 2-хлорэтанолом приводит к нелинейной зависимости интенсивности при 320 нм от интенсивности при 360 нм, что, как известно, характеризует структурный переход [12].

Прямые, проведенные из начала координат через точки, соответствующие 0 и 50% концентрациям 2-хлорэтанола в смеси, ограничивают участок перехода между двумя состояниями хромофоров [12] (рис. 4а). Из рисунка видно, что процесс перехода триптофановых хромофоров завершается при достижении 30% содержания 2-хлорэтанола в смеси.

Рис. 4б показывает зависимость положения максимума флуоресценции апоА-I в отсутствие и в присутствии ДМФХ от концентрации 2-хлор-

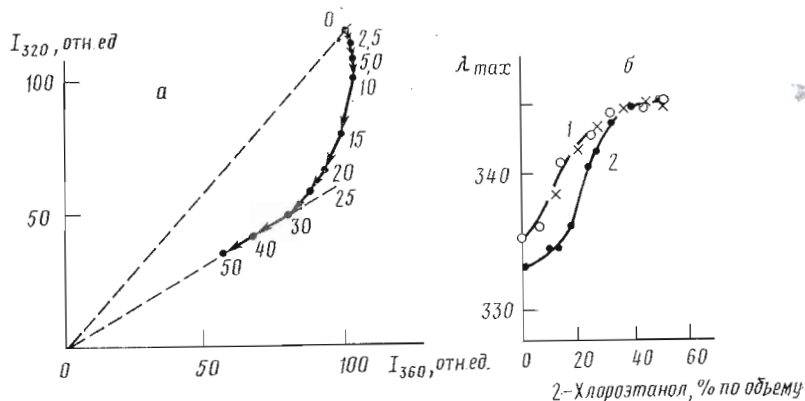


Рис. 4. Влияние 2-хлорэтанола на спектры флуоресценции апоА-I и смеси апоА-I/ДМФХ (1 : 100, моль/моль): а — Зависимость интенсивности флуоресценции при 320 нм от интенсивности флуоресценции при 360 нм для апоА-I в присутствии 2-хлорэтанола в разных концентрациях. б — Изменение положения максимума флуоресценции апоА-I (кривая 1) и смеси апоА-I/ДМФХ (кривая 2) в зависимости от концентрации 2-хлорэтанола

этанолола. Присутствие ДМФХ приводит к коротковолновому сдвигу максимума флуоресценции при низких (<30%) концентрациях 2-хлорэтанола

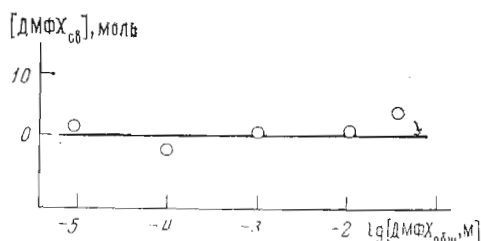
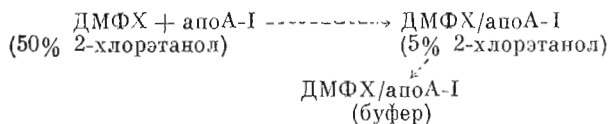


Рис. 5. Данные равновесного микродиализа (см. «Экспериментальную часть»)

в смеси. Спектр флуоресценции выделенного комплекса апоА-I/ДМФХ (рис. 3, спектр 3) совпадает со спектром комплекса, полученного методом детергентного диализа [4, 13]. Метод равновесного диализа продемонстрировал отсутствие комплексообразования в 50% 2-хлорэтаноле (рис. 5).

Если же концентрацию 2-хлорэтанола в среде уменьшить, например, разбавлением буфером до значения, вызывающего агрегацию ДМФХ, то происходит образование мицеллярного комплекса. Ниже в качестве примера приведена схема получения водорастворимого комплекса апоА-I/ДМФХ.



Выделенный комплекс состава 1 : 120, моль/моль по данным электронной микроскопии, градиентного гель-электрофореза, аналитического ультрацентрифугирования близок к комплексам той же стехиометрии, полученным другими методами (см., например, обзоры [5, 6]); анализ структурных характеристик комплексов апоА-I/ДМФХ разной стехиометрии, полученных в присутствии 2-хлорэтанола, дан в отдельном сообщении.

Данные, полученные из спектров ЭПР и флуоресценции, свидетельствуют о значительном влиянии 2-хлорэтанола на конформацию апоА-I. Эти результаты согласуются с данными спектроскопии КД об увеличении числа спиральных участков [14, 15] аполипопротеинов, отмеченном в присутствии некоторых органических растворителей и детергентов [1, 2, 6]. Симбатность в наблюдаемых изменениях подвижности ковалентно-связанной с апоА-I спиновой метки (I) и собственной триптофановой флуоресценции белка (белок содержит 4 остатка триптофана) в зависи-

мости от содержания 2-хлорэтанола в среде свидетельствует о том, что молекула белка претерпевает довольно значительные конформационные перестройки в области локализации триптофановых хромофоров. Такой вывод соответствует данным [16–19] об изменении спектральных характеристик триптофановых хромофоров апоА-I при связывании липидов или детергентов. Следует отметить, что влияние концентрации 2-хлорэтанола на характеристики спектров ЭПР SL-апоА-I и флуоресценции апоА-I проявляется в достаточно широком интервале концентраций 2-хлорэтанола и полностью обратимо. В то же время агрегация ДМФХ при понижении концентрации 2-хлорэтанола происходит в узком интервале концентраций. Отсутствие связывания ДМФХ с апоА-I в 50% 2-хлорэтаноле, образование комплекса в 5% 2-хлорэтаноле и синфазное изменение спектральных свойств смеси апоА-I/ДМФХ и агрегации ДМФХ позволяют заключить, что обязательным условием образования комплекса апоА-I с ДМФХ является агрегация ДМФХ.

Экспериментальная часть

Препарат апоА-I получали из липопротеинов высокой плотности донорской плазмы, как описано ранее [9]. ДМФХ (Sigma, США) был гомогенен по данным ТСХ на пластинках с силикагелем (Merck, ФРГ) в системе CHCl_3 – метанол – вода (65 : 25 : 4); [^{14}C]ДМФХ производства Amersham (Англия).

Стабильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-1-оксипиперидин-4-(2,4-дихлортриазин-6)амин (I) 1-стеароил-2-(9-доксилгептадеканойл)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (II) синтезировали по методам [20, 21].

Концентрацию белка определяли согласно работе [22], концентрацию ДМФХ – по общему фосфору [23]. Рабочий буфер А содержал 0,15 М NaCl, 0,05 М трис-HCl, 1 мМ NaN_3 , 1 мМ EDTA, pH 7,4.

Спин-меченый апоА-I (SL-апоА-I). К раствору 2 мг апоА-I в 2 мл 0,2 М NaHCO_3 / Na_2CO_3 -буфера, pH 10,0 добавляли 50 мкл 75 мМ раствора радикала (I) в диоксане (молярное соотношение апоА-I/(I), 1 : 50). Смесь инкубировали 48 ч при 20°С. Избыток непрореагировавшей метки отделяли на колонке с Toyo Pearl HW-55 (Toyo Soda, Япония) (1,0×40 см), уравновешенной водой. Фракцию, содержащую спин-меченый белок, концентрировали в диализном мешке, помещая его в полиэтиленгликоль 35 000 (Loba Chemie, Австрия), и диализовали против буфера А. Полученный таким образом препарат содержал 2,6–0,3 моль радикала/моль апоА-I и по электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле был идентичен исходному препарату апоА-I.

Комплекс апоА-I/ДМФХ. К раствору 1,5 мг апоА-I в 1 мл буфера А добавляли 3 мг ДМФХ в 1 мл 2-хлорэтанола, смесь перемешивали 1 мин, добавляли 10 мл буфера А, смесь перемешивали в течение 1 мин, затем диализовали против буфера А (3×1 л, 24 ч), концентрировали в диализном мешке, помещая в полиэтиленгликоль, и хроматографировали на колонке с сефарозой CL-4В (Pharmacia, Швеция). Выделенный комплекс характеризовали по соотношению ДМФХ/апоА-I. Состав хроматографически гомогенного комплекса соответствовал соотношению ДМФХ/апоА-I 120 (±15) : 1, моль/моль.

Комплекс SL-апоА-I/ДМФХ того же состава был получен аналогично.

Равновесный микродиализ проводили в 2-камерной тefлоновой ячейке (объем камеры 100 мкл), снабженной мембраной Visking Dialysis Tubing (Serva, ФРГ). Опытную камеру заполняли смесью 2-хлорэтанола/буфер А (1 : 1, по объему), в которой были растворены апоА-I (3 мг, 0,1 мкмоль) и ДМФХ, содержащий [^{14}C]ДМФХ с удельной активностью 1 мКи/1 ммоль ДМФХ; камеру сравнения – тем же раствором, не содержащим апоА-I. Диализ проводили при 25°С, используя следующие начальные концентрации ДМФХ: 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , $3 \cdot 10^{-2}$ М.

Аликвоты по 10 мкл отбирали через 24 ч (время достаточное для полного установления равновесия) из каждой камеры и измеряли радиоактивность в сцинтиллаторе ЖС-8 (Союзреактив), на счетчике Rack Beta 1215 (I.K.B., Швеция). Количество связанного с белком ДМФХ определяли по формуле

$$\text{ДМФХ}_{\text{св}} = A V_{\text{к}} / (V_{\text{а}} A_{\text{у}}),$$

где $\text{ДМФХ}_{\text{св}}$ – количество связанного ДМФХ (моль), А – разность в радиоактивности растворов в опытной камере и камере сравнения (имп/мин), $V_{\text{к}}$ – объем камеры (мкл), $V_{\text{а}}$ – объем аликвоты (мкл), $A_{\text{у}}$ – удельная радиоактивность исходного раствора ДМФХ (имп/(мин·ммоль)).

Спектральные измерения. Спектры ЭПР регистрировали на приборе E-109 (Varian, США), используя микроволновую частоту 9,15 МГц, в плоской кварцевой кювете объемом 50 мкл. Температуру образца (26°С) поддерживали термopриставкой. Мощность СВЧ 20 и 5 мВт, амплитуда модуляции 2 и 0,5 Гс. Концентрацию связанной с белком метки определяли сравнением с сигналом от стандартного раствора 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксида с использованием системы обработки данных E-900 (Varian, США).

Корректированные спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Aminco-500 (США) с термостатированным кюветодержателем. Измерения проводили в кварцевой кювете с оптическим путем 1 см при 25°С. Длина волны возбуждающего света 295 нм. Величину квантового выхода оценивали путем сравнения площадей под спектрами исследуемого образца и водного раствора триптофана одинаковой оптической плотности (считая значение квантового выхода для триптофана 0,2 при 25°С [24]). Точность определения квантового выхода ±10%. Точность определения положения максимума флуоресценции ±1 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Morrisset J. D., Jackson R. L., Gotto A. M.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1977. V. 472. № 2. P. 93–133.
2. *Scanu A. M., Burue R. E., Minovilovic M.* // *Crit. Rev. Biochem.* 1982. V. 13. № 1. P. 109–140.
3. *Pownall H. J., Morrisset J. D., Sparrow I. T., Smith L. C., Shepherd J., Jackson R. L., Gotto A. M.* // *Lipids.* 1979. V. 14. № 3. P. 428–434.
4. *Eisenberg S.* // *J. Lipid. Res.* 1984. V. 25. № 10. P. 1017–1058.
5. *Jonas A.* // *Exp. Lung Res.* 1984. V. 6. № 2. P. 255–270.
6. *Misharin A. Yu., Antonov I. V.* // *Soc. Med. Rev. A. Cardiol/Eds Chazov E. I., Smirnov V. N. Harwood: Acad. Publish GmbH.* 1987. V. 1. P. 211–233.
7. *Gwynne J., Palumbo G., Brewer H. B., Edeloch H.* // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. № 19. P. 7300–7306.
8. *Barbeu D. L., Jonas A., Teng T. L., Scanu A. M.* // *Biochemistry.* 1979. V. 18. № 3. P. 362–369.
9. *Antonov I. V., Medvedeva N. V., Misharin A. Yu., Morozkin A. D., Ruuge E. K.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. V. 835. № 1. P. 50–57.
10. *Orekhov A. N., Misharin A. Yu., Tertov V. V., Khashimov Kh. A., Pokrovsky S. N., Repin V. S., Smirnov V. N.* // *Lancet.* 1984. V. 8412. № 2. P. 1149–1150.
11. *Лухренштейн Г. И.* Метод синхронных меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974. С. 34.
12. *Бурштейн Е. А.* Собственная люминесценция белка. М.: ВИНТИ, сер. Биофизика. 1977. Т. 7. С. 120–125.
13. *Swaney J. B., Chung B. C.* // *Biochemistry.* 1980. V. 19. № 24. P. 5637–5644.
14. *Gwynne J., Brewer H. B., Edelhoch H.* // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. № 8. P. 2411–2416.
15. *Chou P. V., Fassman G. D.* // *Biochemistry.* 1974. V. 13. № 2. P. 222–229.
16. *Baker H. N., Gotto A. M., Jackson R. L.* // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. № 9. P. 2725–2738.
17. *Brewer H. B., Fairwell T., Larue A., Ronan R., Hauser H., Bronzert T.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1978. V. 80. № 2. P. 623–630.
18. *Tall A. R., Shipley G. G., Small D. M.* // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 12. P. 3749–3755.
19. *Jonas A., Krainovich D. J.* // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. № 7. P. 2194–2199.
20. *Мишарин А. Ю., Бушмакина Н. Г., Чернов Б. К.* Способ получения спин-меченых лецитинов и эфиров холестерина: А. с. 1126574 СССР // Б. И. 1984. № 44.
21. *Sykulev Yu. K., Timofeev V. P., Nezlin R. S., Misharin A. Yu., Franek F.* // *FEBS Lett.* 1979. V. 101. № 1. P. 27–30.
22. *Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Folbert N. E.* // *Analyt. Biochem.* 1978. V. 87. № 1. P. 206–210.
23. *Vaskovsky V. E., Kostetsky E. V., Vasendin I. M.* // *J. Chromatogr.* 1975. V. 114. № 1. P. 129–141.
24. *Feale F. W. J., Weber G.* // *Biochem. J.* 1957. V. 65. № 2. P. 476–482.

Поступила в редакцию 10.VIII.1987
После доработки 24.V.1988

FORMATION OF MICELLAR COMPLEXES OF APOLIPOPROTEIN AI WITH DIMYRISTOYLPHOSPHATIDYLCHOLINE

MISHARIN A. Yu., MEDVEDEVA N. V., BUSHMAKINA N. G., ANTONOV I. V.,
BUSHUEVA T. L.

*Cargiology Research Centre, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

Structural changes of apolipoprotein AI from human plasma high density lipoproteins in 2-chloroethanol solutions were studied using spin label and fluorescence techniques. Reversible changes in spectral parameters occur in 2-chloroethanol concentration range 0–40% and are affected by dimyristoylphosphatidylcholine, of 2-chloroethanol concentration does not exceed 30%. Dialysis experiments demonstrated the absence of binding of monomer phosphatidylcholine with apolipoprotein AI. It thus follows that formation of complexes of apolipoprotein AI with dimyristoylphosphatidylcholine is caused by lipid micella aggregation.