



УДК 577.112.856.012.5

© 1991 г.

А. Ю. Мишарин, П. Ю. Замалева, Т. Л. Бушуева,
Н. В. Медведева

РЕКОМБИНАЦИЯ МИЦЕЛЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ АПОЛИПОПРОТЕИНА А1 — ФОСФАТИДИЛХОЛИН В ПРИСУТСТВИИ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕКСА

*Институт экспериментальной кардиологии, Всесоюзный кардиологический научный
центр АМН СССР, Москва*

Изучено взаимодействие мицеллярных комплексов аполипопротеина А1 и фосфатидилхолина (АпоА1—ДМФХ и АпоА1—ЯФХ) с компонентами комплекса — АпоА1 (или дансил-А1) и фосфатидилхолином (ДМФХ, ЯФХ и спин-меченым ФХ) в отсутствие липопротеинов и компонентов плазмы. Показано, что в присутствии компонентов комплекса происходит рекомбинация, сопровождающаяся изменением размера и стехиометрии. Связывание белка с комплексом — быстрый процесс, а встраивание ФХ в комплекс зависит от скорости диссоциации агрегата ФХ. Наблюдаемая рекомбинация комплекса в присутствии одного из компонентов является кинетически сложным процессом, скорость образования новых комплексов определяется перераспределением ФХ между мицеллами.

Мицеллярные комплексы аполипопротеинов с липидами (в частности, комплексы АпоА1 с ФХ) — удобные модели для исследования липидно-белковых взаимодействий, структуры и биологической роли липопротеинов [1—4]. В литературе описаны структурные изменения двухкомпонентных комплексов АпоА1 — ФХ, происходящие при насыщении комплексов холестерином [5], при взаимодействии с отдельными липопротеинами или аполипопротеинами [6, 7], в присутствии донора холестерина и лецитин-холестерин-ацилтрансферазы [8—10] (трансформация), в присутствии некоторых белковых компонентов плазмы [11, 12] (конверсия). Имеются сведения о быстрой рекомбинации радиоактивного АпоА1, введенного внутривенно в делипидированной форме или в составе мицеллярных комплексов, с компонентами ЛВП [13, 14].

В настоящем сообщении изучается взаимодействие комплексов АпоА1—ФХ с отдельными компонентами комплекса: АпоА1 и ФХ в отсутствие других липопротеинов и компонентов плазмы. Исследуемые нами двухкомпонентные мицеллярные комплексы существуют в равновесии с мономерной формой ФХ и диссоциированным АпоА1. Добавление любого из компонентов вызывает сдвиг этого равновесия, что в принципе должно приводить к образованию новых мицелл, отличающихся стехиометрическим составом. Задача настоящей работы — качественное описание происходящей рекомбинации. В работе использованы мицеллярные комплексы АпоА1 — ДМФХ состава 1 : 100 и 1 : 40 (моль/моль), полученные по методу, предложенному нами ранее, и охарактеризованные как в работах [15, 16], комплексы АпоА1 — ЯФХ состава 1 : 20 (моль/моль), получение и характеристика которых публикуется отдельно, данселированный АпоА1, липосомы из ДМФХ, ЯФХ и СМФХ. Как известно [17], данселирование

Используемые сокращения: АпоА1 — аполипопротеин А1; ФХ — фосфатидилхолин; ДМФХ — 1,2-димиристоил-*L*- α -фосфатидилхолин; ЯФХ — фосфатидилхолин яичного желтка; СМФХ — спин-меченый ФХ, 1-стеароил-2-(9-доксил)-гептадеканоил-*L*- α -фосфатидилхолин; ЛФХ — лизофосфатидилхолин, полученный обработкой ЯФХ фосфатазой А₂; дансил — 5,5-диметиламинонафталинсульфонил; ЛВП — липопротеины высокой плотности; КЖХ — колоночная жидкостная хроматография.

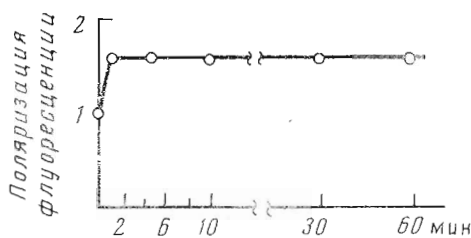


Рис. 1

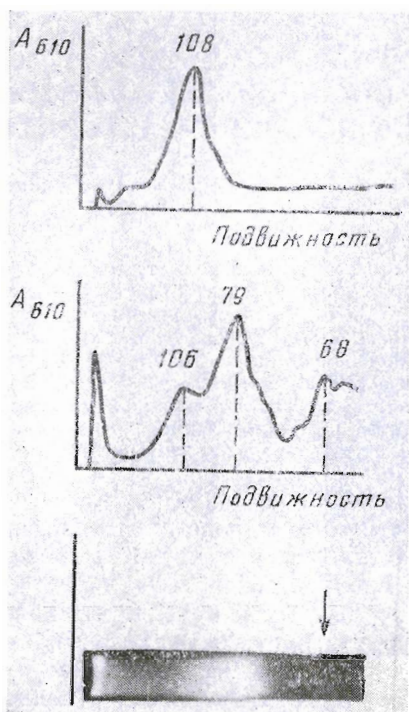


Рис. 3

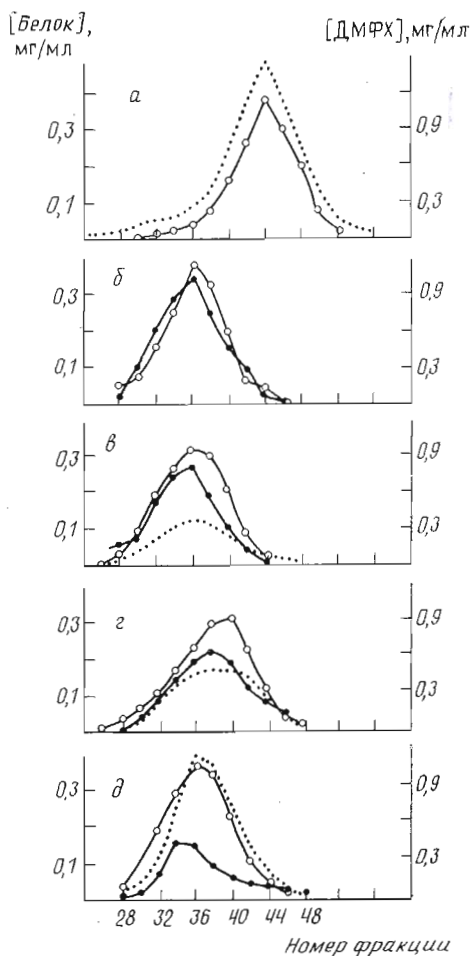


Рис. 2

Рис. 1. Поляризация флуоресценции дансил-А1 при 510 нм в присутствии комплекса ApoA1 — ДМФХ (1 : 100). Соотношение дансил-А1 — ApoA1-комплекса 1 : 1. Значение поляризации флуоресценции дансил-А1 в буфере принято за 100%

Рис. 2. Гель-хроматография на колонке (1,6 × 90 см) с сефарозой CL 4В (скорость элюции 14 мл/ч): а — дансил-А1 (1,0 мг); б — комплекс ApoA1 — ДМФХ (1,0 мг ApoA1); в — смесь дансил-А1 (0,33 мг) и комплекса (0,67 мг ApoA1); г — смесь дансил-А1 (0,5 мг) и комплекса (0,5 мг ApoA1); д — смесь дансил-А1 (0,75 мг) и комплекса (0,25 мг ApoA1). Пунктирные кривые — флуоресценция при 510 нм; кривые со светлыми кружками — концентрация белка; кривые с темными кружками — концентрация ДМФХ

Рис. 3. Денситограммы градиентного (4—30%) гель-электрофореза: а — комплекс ApoA1 — ДМФХ (1 : 100, 10 мкг ApoA1); б — комплекс ApoA1 — ДМФХ в присутствии делиндрированного ApoA1 (10 мкг); в — электрофореграмма смеси комплекса ApoA1 — ДМФХ (1 : 100, 10 мкг ApoA1) и дансил-А1 10 (мкг) (фотография при облучении светом с длиной волны 355 нм, стрелками указаны значения электрофоретической подвижности исходного комплекса и димера А1)

ApoA1 не изменяет способности белка связываться с липидами, а наличие доксильного фрагмента в молекуле СМФХ не препятствует встраиванию его в фосфолипидные мицеллы [18]. В то же время наличие метки (флуоресцентной или спиновой) позволяет измерять кинетику происходящих процессов при помощи спектральных методов.

Возрастание поляризации флуоресценции дансильных остатков дансил-А1 при связывании с липидами — удобный параметр для исследова-

ния комплексообразования [17, 19]. При добавлении к дансил-А1 эквивалента комплекса АпоА1 — ДМФХ (1 : 100) поляризация флуоресценции дансильных остатков увеличивается на 60%. Изменение поляризации флуоресценции происходило при смешивании компонентов (рис. 1). Поляризация флуоресценции имела практически то же значение, как и для комплекса дансил-А1 — ДМФХ.

Гель-хроматография смесей дансильрованного АпоА1 и комплекса АпоА1 — ДМФХ (0,5 : 1; 1 : 1; 3 : 1 моль/моль) показывает, что дансильрованный белок входит в состав комплексов (рис. 2).

Данные градиентного неденатурирующего гель-электрофореза показывают изменение размеров комплекса АпоА1 — ФХ при совместном нанесении с делипидированным АпоА1 (или дансил-А1). Продукты взаимодействия комплекса АпоА1 — ФХ с делипидированным АпоА1 характеризуются увеличением гетерогенности с преобладанием более мелкой фракции (рис. 3), которая содержит комплексы с низким содержанием фосфолипидов и димеры АпоА1. Аналогичный опыт, проведенный с препаратом дансильрованного АпоА1, показывает преимущественную локализацию дансильного хромофора в области электрофоретической подвижности комплекса. Полученные данные свидетельствуют о быстром связывании АпоА1 с мицеллярным комплексом и образовании новых мицелл, однако не дают возможности охарактеризовать прочность, состав и размеры полученных мицелл. После быстрого связывания АпоА1 с комплексом происходит дальнейшая рекомбинация получающихся мицелл. Она, очевидно, определяется скоростью перераспределения ФХ.

Для оценки скоростей взаимодействия комплексов АпоА1 — ФХ с полислойными липосомами ФХ использовали методы светорассеяния и спинового зонда. Разрыв липосом ДМФХ в присутствии АпоА1 сопровождается уменьшением светорассеяния при 325 нм [20]. Измерение светорассеяния при 30° С не показывает заметного различия в скоростях комплексообразования АпоА1 и комплекса АпоА1 — ДМФХ (1 : 40 моль/моль) с ДМФХ (полученное значение $t_{1/2}$ составляет 260 (± 50) мин и близко к найденному в работе [20]). Разрыв полислойных липосом ДМФХ комплексом АпоА1 — ДМФХ (1 : 40 моль ДМФХ липосом/моль ДМФХ комплекса) при 30° С требует около 30 ч.

Спектр ЭПР СМФХ, введенного в буфер в виде полислойных липосом, представляет собой синглет (рис. 4), обусловленный спин-спиновым и диполь-дипольным взаимодействием парамагнитных фрагментов в липидном агрегате [21, 22]. При добавлении комплекса АпоА1 — ДМФХ СМФХ встраивается в мицеллу, при этом в спектре ЭПР появляется триплетная компонента, отвечающая СМФХ в составе комплекса. Форма спектров ЭПР спин-меченых комплексов зависит от соотношения СМФХ и ФХ в образце (из-за различных вкладов диполь-дипольного и обменного взаимодействия), однако скорость спектральных изменений в пределах ошибки опыта не зависит от структуры ФХ в комплексе, концентрации СМФХ и соотношения СМФХ — ФХ комплекса. Изменения спектров ЭПР СМФХ во времени после добавления комплексов АпоА1 — ДМФХ (1 : 40) и АпоА1 — ЯФХ (1 : 100) приведены на рис. 5.

Параметром, по которому оценивали скорость рекомбинации СМФХ с мицеллярными комплексами, является I_1/I_2 , изменение которого пропорционально времени. Таким образом, взаимодействие СМФХ с мицеллярными комплексами АпоА1 — ДМФХ и АпоА1 — ЯФХ представляет собой процесс, имеющий нулевой порядок по концентрации СМФХ.

В таком случае скоростью лимитирующими стадиями процесса может быть либо диссоциация агрегата СМФХ, либо диффузия молекул СМФХ в составе быстро образующегося первичного ассоциата. Однако мгновенное исчезновение сигнала диссоциированной формы СМФХ (рис. 4б, верхний спектр) при добавлении комплекса, независимость скорости трансформации спектра ЭПР от структуры ФХ в комплексе и влияние лизофосфатидилхолина, ускоряющего спектральные изменения (рис. 5), свидетельствуют в пользу первого предположения. После 24 ч инкубации комплекса АпоА1 — ФХ с полислойными липосомами ДМФХ комплексы,

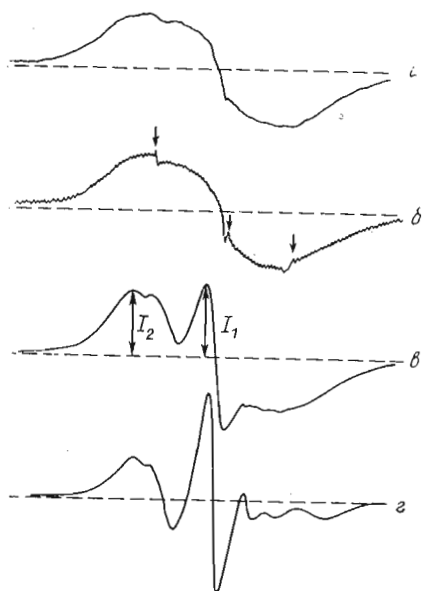


Рис. 4

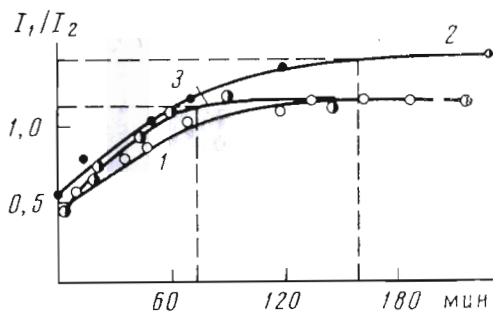


Рис. 5

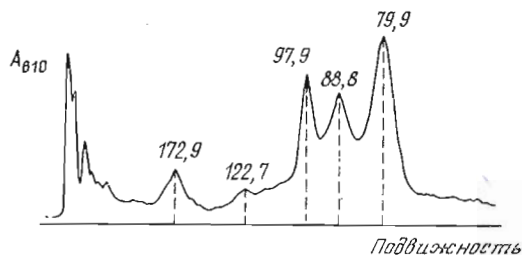
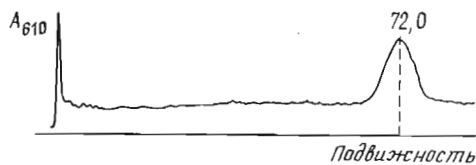


Рис. 6

Рис. 4. Спектры ЭПР СМФХ: *а* — СМФХ в буфере (10^{-4} М); *б* — СМФХ в буфере (10^{-6} М), стрелкой указаны сигналы от мономерной формы метки в растворе; *в* — СМФХ после инкубации 4 ч с комплексом АпоА1—ДМФХ (1 : 40), концентрация СМФХ $2 \cdot 10^{-6}$ М, концентрация ДМФХ 10^{-4} М; *г* — СМФХ после инкубации в течение 4 ч с комплексом АпоА1—ЯФХ (1 : 40), концентрация СМФХ $5 \cdot 10^{-6}$ М, концентрация ЯФХ $2 \cdot 10^{-4}$ М

Рис. 5. Изменения спектров ЭПР СМФХ при инкубации СМФХ с комплексом АпоА1—ДМФХ (1 : 40) (1), с комплексом АпоА1—ЯФХ (1 : 40) (2) с комплексом АпоА1—ЯФХ—ЛФХ (1 : 40 : 2) (3)

Рис. 6. Денситограммы градиентного гель-электрофореза: *а* — комплекс АпоА1—ЯФХ (1 : 20, 10 мкг АпоА1); *б* — после инкубации с избытком ЯФХ и последующим выделением (см. «Экспер. часть»)

выделенные ультрацентрифугированием или гель-хроматографией, увеличиваются в размерах. Состав полученных комплексов близок к максимально насыщенным комплексам, описанным нами ранее. Данные градиентного гель-электрофореза (рис. 6) выделенных комплексов АпоА1 — ЯФХ показывают значительное увеличение размеров комплексов и образование дискретных фракций, совпадающих по подвижности с крупными комплексами АпоА1 — ЯФХ, полученными хелатным диализом [23—25].

Мицеллярные двухкомпонентные комплексы АпоА1 с ФХ, выделенные в гомогенном состоянии, обладают способностью к рекомбинации в присутствии компонентов комплекса. Инкубация комплекса с ФХ приводит к укрупнению, а с делипидированным АпоА1 — к уменьшению размеров мицелл. Рекомбинация представляет собой кинетически сложный процесс. Формально при добавлении к мицеллярному комплексу АпоА1 — ФХ делипидированного АпоА1 или ФХ изменяется химический потенциал компонентов комплекса, а образование новых мицеллярных комплексов определяется скоростью уравнивания химических потенциалов. В данной работе показана возможность изменения стехиометрии и размеров двухкомпонентных комплексов АпоА1 — ФХ, лишенных неполярного «кора», в присутствии компонентов комплекса. Необходимо отметить, что при инкубации нативных глобулярных ЛВП с избытком АпоА1 наблюдалось лишь частичное замещение белкового компонента в липопротеине без заметных структурных изменений частицы [26, 27]. Это, очевидно, указывает на определяющую роль «кора» из неполярных липидов в стабильности структуры глобулярных ЛВП.

Экспериментальная часть

ЛВП выделяли из плазмы здоровых доноров по [28], АпоА1 получали по [29], дансильирование АпоА1 проводили по [17], полученный препарат содержал 2,6 ($\pm 0,3$) дансильных остатка на молекулу белка. Спин-меченый фосфатидилхолин синтезировали по [30], полислойные липосомы фосфатидилхолина получали по [31].

ДМФХ, трис-НСl, кумасси ярко-синий G-250 получены от фирмы Sigma, сефароза CL 4B — от фирмы Pharmacia, ЯФХ (Merck) очищен хроматографией на силикагеле с использованием линейного градиента хлороформ — метанол (1 : 4 — 3 : 2, по объему).

Приготовление комплексов АпоА1 с фосфатидилхолинами проводили как описано ранее [15, 16]. Комплексы АпоА1 — ДМФХ получали при 23° С, комплексы с ЯФХ при 0—2° С.

Связывание АпоА1 или дансильированного АпоА1 с комплексом АпоА1 — ДМФХ (1 : 100, моль/моль) проводили смешиванием растворов белка и комплекса в 0,005 М трис-НСl-буфере, рН 7,4, содержащем 0,14 М NaCl (для хроматографического выделения продуктов) или в 0,09 М трис-боратном буфере, рН 8,4 (для электрофореза продуктов).

Хроматографию осуществляли на колонке (1,6 × 90 см) с сефарозой CL4B; фракции анализировали на содержание фосфолипидов [32] и белка [33], по поглощению при 280 и 335 нм, а также по флуоресценции при 510 нм.

Инкубацию комплексов АпоА1 — ЯФХ с избытком липосом ЯФХ проводили в течение 24 ч при 2° С, затем препарат центрифугировали при $4 \cdot 10^4$ об/мин 48 ч в плотности 1,25 г/л. Фракцию, содержащую белок, отделяли от крупных фосфолипидных агрегатов гель-хроматографией на колонке с сефарозой и анализировали методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза.

Градиентный гель-электрофорез проводили на пластинах полиакриламидного (4—30%) геля по методу [23], после окрашивания геля сканировали на лазерном денситометре Ultra Scan 2202 (ЛКВ) при 610 нм. После электрофореза продукта связывания дансильированного АпоА1 с комплексом АпоА1 — ДМФХ гель фотографировали при облучении светом с длиной волны 335 нм.

Изменения светорассеяния ДМФХ при взаимодействии с делипидированным АпоА1 или с комплексом АпоА1 — ДМФХ проводили на приборе UO 2000, Shimadzu (Япония) в кюветах с оптическим путем 0,5 и 1 см при 30° С, измеряя оптическую плотность при 325 нм, как описано в работе [20].

Для исследования скорости рекомбинации СМФХ с комплексами 5 мкл спиртового раствора СМФХ (10^{-2} или 10^{-4} М) вводили микрошприцем в 500 мкл буфера, отбирали 200 мкл аликвоты, добавляли к ней расчи-

ганное количество комплекса в том же буфере и регистрировали спектр ЭПР через определенные промежутки времени. Спектры регистрировали на приборе Varian E 109, используя микроволновую частоту 9,15 МГц, в плоской кварцевой кювете объемом 50 мкл при 24° С. Мощность СВЧ 20 и 5 мВт, амплитуда модуляции 2,0 и 0,5 Гс.

Спектры флуоресценции дансил-А1 регистрировали в режиме «Ratio» на спектрофлуориметре Aminco SPF 500 (США) с поляризационной приставкой в стандартной термостатированной кварцевой кювете, используя длину волны возбуждения 340 нм. Степень поляризации флуоресценции (P) рассчитывали при длине волны флуоресценции 510 нм по уравнению $P = (I_{\perp} - I_{\parallel}) / (I_{\perp} + I_{\parallel})$, где фактор $G = I_{\perp} / I_{\parallel}$ (I_{\parallel} и I_{\perp} — компоненты флуоресценции, поляризованные параллельно и перпендикулярно направлению поляризации возбуждающего света) является корректирующим множителем для неодинакового пропускания поляризованных компонент излучения через монохроматор.

Авторы благодарны профессору А. Николсу и доктору П. Блэнш (Калифорнийский университет, Беркли, США) за участие в обсуждении результатов, критические замечания и за предоставленную возможность использования программы для расчета стоксовских радиусов из данных градиентного гель-электрофореза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Morisett J. D., Jackson R. L., Gotto A. M.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1977. V. 472. № 2. P. 93—133.
2. *Atkinson D., Small D. M.* // *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1986. V. 15. P. 403—456.
3. *Jonas A.* // *J. Lipid Res.* 1986. V. 24. № 3. P. 689—698.
4. *Misharin A. Yu., Antonov I. V.* // *Soc. Med. Rev. Cardiol.* V. 2 / Eds Chazov E. I., Smirnov V. N., Harwood Acad. Publish. GmbH., 1987. P. 211—233.
5. *Lundberg B. B.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1988. V. 962. № 2. P. 265—274.
6. *Sharoch Z., Nichols A. V.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. V. 878. № 2. P. 152—163.
7. *Musliner T. A., Mehnfelder H. J., Krauss R. M.* // *J. Lipid Res.* 1988. V. 29. № 3. P. 349—361.
8. *Pownall H. J., Van Winkle W. B., Pao Q., Rhode M., Gotto A. M.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1982. V. 713. № 3. P. 494—503.
9. *Jonas A., Mc Hugh H. T.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 794. № 3. P. 361—372.
10. *Nichols A. V., Blanche P. J., Gong E. J., Shore V. G., Forte T. M.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 834. P. 285—300.
11. *Rye K.-A., Barter P. J.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. V. 875. № 3. P. 429—438.
12. *Rye K.-A.* // *J. Lipid Res.* 1989. V. 27. P. 986—997.
13. *Levine D.* // *Atherosclerosis diagnostics and treatment. International Symposium.* 1988, 7—9 May, Dagomys, USSR.
14. *Koizumi J., Kano M., Okabayashi K., Jadhav A., Thompson G. R.* // *J. Lipid Res.* 1988. V. 29. № 1. P. 1405—1415.
15. *Мишарин А. Ю., Медведева Н. В., Антонов И. В., Бушмакина Н. Г., Бушueva Т. Л.* // *Биоорг. химия.* 1988. Т. 14. № 11. С. 1551—1556.
16. *Мишарин А. Ю., Замаева Н. Ю., Антонов И. В., Бушмакина Н. Г., Медведева Н. В., Морозкин А. Д.* // *Биоорг. химия.* 1989. Т. 15. № 6. С. 773—780.
17. *Jonas A.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1975. V. 393. № 3. P. 471—482.
18. *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.
19. *Jonas A., Dregler S. M., Patterson B. W.* // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 5. P. 2183—2189.
20. *Pownall H. J., Massey J. B., Kusserow S. A., Gotto A. M.* // *Biochemistry.* 1978. V. 17. № 7. P. 1183—1189.
21. *Смит Я., Бутлер К.* // *Метод спиновых меток. Теория и применение / Ред. Берлинер Л. М.: Мир, 1979. С. 444, 489.*
22. *King M. D., Marsh D.* // *Biochemistry.* 1987. V. 26. № 5. P. 1224—1231.
23. *Blanche P. J., Gong E. L., Forte T. M., Nichols A. V.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1981. V. 665. P. 408—419.
24. *Nichols A. V., Gong E. L., Blanche P. J., Forte T. M.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1983. V. 750. № 2. P. 353—364.
25. *Forte T. M., Ren C. I., Nordhausen R. W., Nichols A. V.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. V. 834. № 3. P. 386—395.
26. *Massey J. B., Gotto A. M., Pownall H. J.* // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 12. P. 10167—10173.
27. *Van Tournout P., Caster H., Lievens M.-J., Rosseneu M., Assman G.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1981. V. 663. № 3. P. 630—636.

28. *Lindgren F. T.* // Preparative ultracentrifugation laboratory procedures and suggestion for lipoprotein analysis // Ed. Perkin E. C. Amer. Oil Chemists Soc., 1975. P. 204—224.
29. *Мишарин А. Ю., Хлюстов В. Н., Цибульский В. П., Каменева А. М., Репин В. С., Ермолин Г. А.* Способ получения аполипопротеина А1: А.с. 1400034 СССР. // Б. И. 1988. № 4. С. 126.
30. *Мишарин А. Ю., Бушмакина Н. Г., Черноб Б. К.* Способ получения спин-меченых лецитинов и спин-меченых эфиров холестерина: А.с. 1126574 СССР. // Б.И. 1984. № 7. С. 44.
31. *Batzri S., Korn E. D.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1973. V. 298. P. 1015—1019.
32. *Vaskovsky V. E., Kostetsky E. V., Vasendin I. M.* // *Chromatography.* 1975. V. 114. № 1. P. 129—141.
33. *Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber Folbert N. E.* // *Analyt. Biochem.* 1979. V. 87. № 1. P. 206—211.

Поступила в редакцию
23.I.1990

A. Yu. MISHARIN, N. Yu. ZAMAEVA, T. L. BUSHUEVA, N. V. MEDVEDEVA

RECOMBINATION OF MICELLAR COMPLEXES APOLIPOPROTEIN
A1—PHOSPHATIDYL CHOLINE IN THE PRESENCE OF COMPLEX
COMPONENTS

*Institute of Experimental Cardiology. Cardiology Research Centre,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Interaction of micellar complexes apolipoprotein A1 — phosphatidyl choline (apoA1 — DMPC and apoA1 — EPC) with complex components: apoA1 (dansyl-A1) and phosphatidyl cholines (DMPC, EPC and spin labelled PC) was studied in the absence of lipoproteins and plasma components. Recombination of the complexes (changes in complex sizes and stoichiometry) was shown to occur in the presence of the complex components. Interaction of lipid-free apoA1 with the complex is a fast process; incorporation of PC molecule takes place more slowly. This recombination is considered to be a kinetically complicated process, the rate of recombination depending on PC exchange and interconversion.