



УДК 577.112.856.012.5 : 543.422.27

© 1991 г.

*И. В. Медведева, А. Ю. Мишарин***ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ АПОЛИПОПРОТЕИНА А1 В СОСТАВЕ ЛВП И КОМПЛЕКСОВ С ДИМИРИСТОИЛФОСФАТИДИЛХОЛИНОМ. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕ.ОДОМ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ***Институт экспериментальной кардиологии, Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва*

Аполипопротеин А1 (АпоА1) обработан избытком спин-метки 2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-оксил-4-(2,4-дихлор-1,3,5-триазинил-6)-амина при pH 9,8. Полученные препараты спин-меченого АпоА1 содержали 7,2 (± 1) парамагнитных центров на 1 молекулу белка. Спектры ЭПР спин-меченого АпоА1, содержащего 7 парамагнитных центров, характеризуются спин-спиновым и диполь-дипольным взаимодействием радикалов, локализованных в одной молекуле белка. Низкотемпературные спектры ЭПР (77 К) спин-меченого АпоА1 имели значения параметра d_1/d , равные 0,76 (в буфере pH 7,4), 0,59 (в 3 М NaCl), 0,55 (в 3 М гуанидинийхлориде), 0,44 (в 40% 2-хлорэтанол).

Получены мицеллярные комплексы спин-меченого АпоА1 с ДМФХ, содержащие 20 и 190 молекул ДМФХ на 1 молекулу белка, и ЛВП₃, содержащий спин-меченый АпоА1. Сопоставление ЭПР-спектров при 77 К позволяет видеть структурные различия АпоА1 в составе комплексов спин-меченый АпоА1 — ДМФХ 1 : 20 и 1 : 190 (моль/моль). Результаты указывают на важность внутримолекулярных белок-белковых гидрофобных контактов для структуры ЛВП и мицеллярных комплексов АпоА1 с фосфатидилхолином.

Аполипопротеин А1 (АпоА1) — основной белковый компонент ЛВП. Он способен к самоассоциации, образует мицеллярные комплексы с липидами и детергентами, локализуется на поверхности раздела фаз, активирует лецитин-холестерин-ацилтрансферазу плазмы. АпоА1 обладает высокой конформационной подвижностью и слабо выраженной третичной структурой [1—4]. При связывании с фосфолипидами АпоА1 образует дискообразные мицеллы, стехиометрический состав и размеры которых определяются условиями комплексообразования [5—9]. Недавно нами было показано, что максимальная полезная работа одной молекулы АпоА1 по стабилизации смешанной мицеллы с ДМФХ не является постоянной и зависит от стехиометрии комплекса [9]. Это заставило нас искать экспериментальные подходы, позволяющие видеть структурные различия белка в составе мицеллярных комплексов АпоА1 — ДМФХ различной стехиометрии, а также в составе природных ЛВП.

В настоящей работе применен метод низкотемпературного ЭПР с использованием спиновой метки. Для модификации АпоА1 использован стабильный радикал СМТХ. Как было показано ранее [8], реакция АпоА1 с избытком СМТХ в натрий-карбонат-бикарбонатном буфере при pH 8,3 приводит к модификации 2,1 ($\pm 0,5$) лизиновых остатков в молекуле АпоА1 (M 28 100).

Проведение реакции при pH 9,8 приводило к модификации 6—8 лизиновых остатков (показано титрованием NH_2 -групп, см. «Экспер. часть»). Согласно спектрам ЭПР, количество спин-меток, ковалентно связанных с одной молекулой АпоА1, составляло 6—8 для препаратов АпоА1,

Используемые сокращения: АпоА1 — аполипопротеин А1; ДМФХ — 1,2-димиристоил *L*- α -фосфатидилхолин; ЛВП — липопротеины высокой плотности; СМТХ — спин-меченый триазинилхлорид, 2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-оксил-4-(2,4-дихлор-1,3,5-триазинил-6)-амин; СМА1 — спин-меченый аполипопротеин А1.

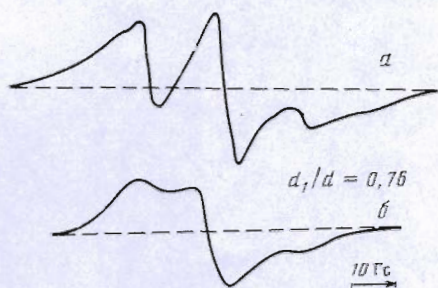


Рис. 1. Спектры ЭПР СМА1 в буфере: *a* — при 26° С; *б* — при 77 К. Концентрация белка 10^{-5} М

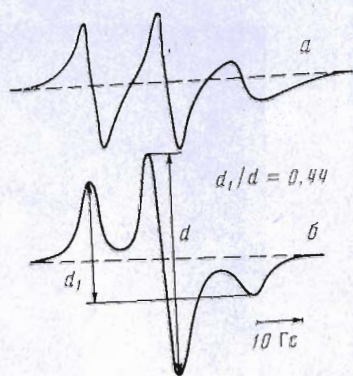


Рис. 2. Спектры ЭПР СМА1 в 40% водном растворе 2-хлорэтанола: *a* — при 26° С; *б* — при 77 К. Концентрация белка 10^{-5} М; показаны параметры ЭПР-спектра d_1 и d

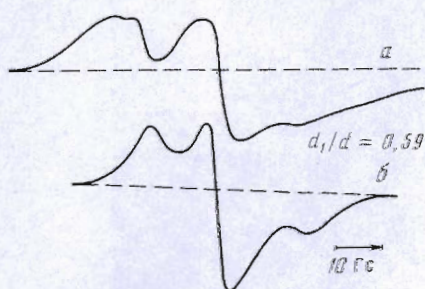


Рис. 3. Спектры ЭПР СМА1 в 3 М растворе NaCl: *a* — при 26° С; *б* — при 77 К. Концентрация белка 10^{-5} М

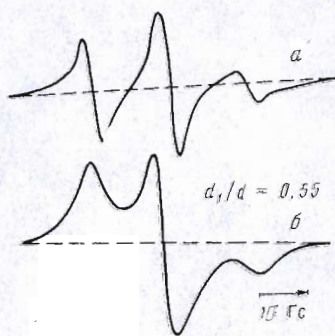


Рис. 4. Спектры ЭПР СМА1 в 3 М растворе гуанидиний хлорида: *a* — при 26° С; *б* — при 77 К. Концентрация белка 10^{-5} М

меченных при pH 9,8 (СМА1) (в 6 опытах). В статье приведены эксперименты с использованием препарата СМА1, содержащего $7,2 (\pm 1,0)$ спиновых меток на 1 молекулу белка. Результаты для других препаратов аналогичны.

Спектр ЭПР СМА1, записанный при 26° С (рис. 1*a*), искажен взаимодействием парамагнитных центров и характерен для полирадикалов [10—15]. Эти искажения, обусловленные статическим обменным и диполь-дипольным взаимодействиями парамагнитных центров, привели к кажущемуся стягиванию крайних компонент спектра к центру. Спектры ЭПР СМА1 в буфере не зависели от концентрации белка в интервале 10^{-6} — 10^{-4} М. Очевидно, что за искажение спектра ЭПР отвечает взаимодействие парамагнитных центров, локализованных в одной молекуле АпоА1.

Как известно, из спектров полирадикалов, записанных при 77 К, можно получить информацию о взаимном расположении парамагнитных центров по параметру d_1/d . Для бирадикалов параметр d_1/d позволяет рассчитать расстояние между взаимодействующими парамагнитными центрами [11]. В случае полирадикала точная оценка расстояний между парамагнитными центрами в пределах одной макромолекулы невозможна, однако значение параметра d_1/d , превышающее 0,45, указывает на взаимодействие спинов-меток. Для спин-меченого АпоА1 в буфере d_1/d составляет 0,76 (рис. 2*б*).

В данной работе значения параметра d_1/d использованы для характеристики структурных особенностей АпоА1 в растворе, в составе комплексов с ДМФХ, а также в составе глобулярных ЛВП. Поскольку нет возможности прямо связать параметры низкотемпературного спектра ЭПР с вторичной и третичной структурой белка, предварительно были полу-

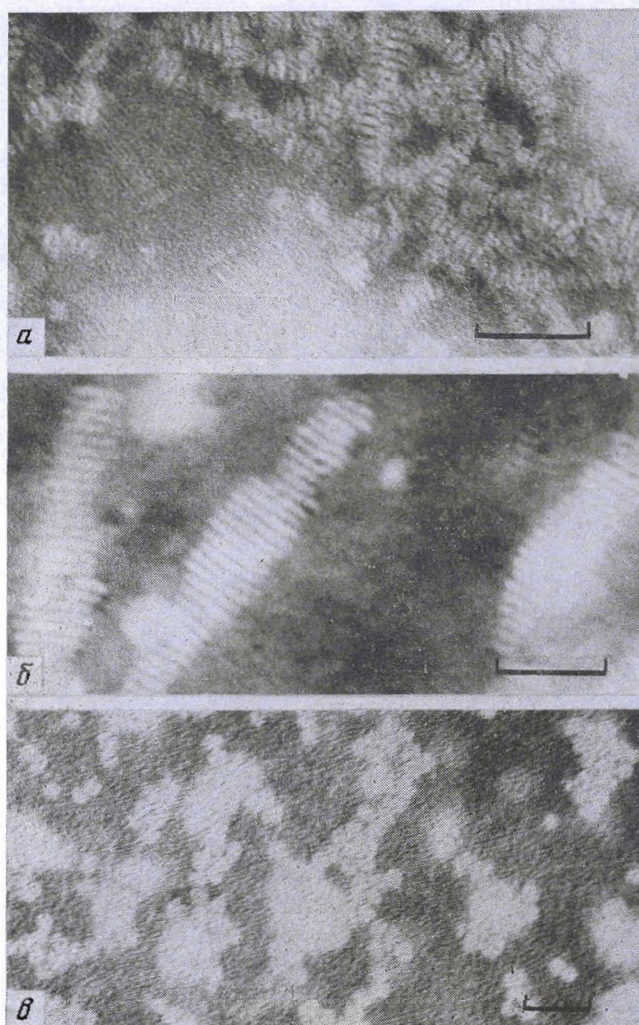


Рис. 5. Электронные микрофотографии комплексов СМА1—ДФХ 1 : 20 моль/моль (а), СМА1—ДФХ 1 : 190 моль/моль (б) и ЛВП, содержащего СМА1 (в), при 100 000-кратном увеличении. Маркер 30 нм

чены спектры ЭПР СМА1 в 40% 2-хлорэтаноле, 3 М гуанидинийхлориде и 3 М NaCl (рис. 2—4). (Результаты влияния денатурирующих реагентов, органических растворителей, изменения ионной силы раствора на спектры ЭПР СМА1 при комнатной температуре даны в отдельном сообщении).

В присутствии 2-хлорэтанола, способствующего стабилизации спиральных участков белка, взаимодействия парамагнитных центров не наблюдается, в то время как в присутствии солей, когда степень спиральности АпоА1 достаточно высока, спектр сильно искажен. Очевидно, не существует однозначного соответствия между изменением вторичной структуры АпоА1 и взаимодействием парамагнитных центров. Другими словами, высокоспирализованный АпоА1 «раскрывается» при сольватации 2-хлорэтанолом, но «сжимается» при увеличении ионной силы. Спектр ЭПР СМА1 при 26° С, денатурированного в гуанидинийхлориде, показывает высокую подвижность меток относительно неструктурированного белка и отсутствие заметного обменного взаимодействия радикалов.

Модификация лизиновых остатков АпоА1 СМТХ не препятствует образованию мицеллярных комплексов с ДМФХ. Дискообразные комплексы СМА1 с ДМФХ состава 1 : 20 и 1 : 190 были получены в присутствии 2-хлорэтанола [8, 9]. Препараты ЛВП₃, содержащие СМА1, получены об-

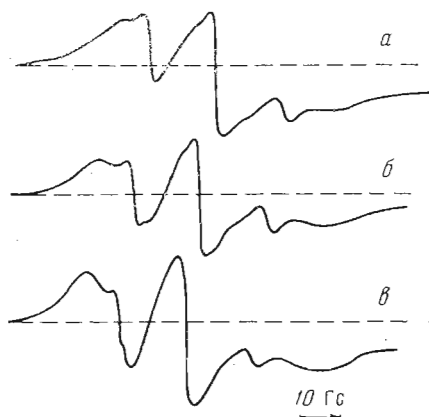


Рис. 6. Спектры ЭПР комплексов SMA1—ДМФХ 1 : 20 моль/моль (а), SMA1—ДМФХ 1 : 190 моль/моль (б) и ЛВП, содержащего SMA1 (в), при 26° С

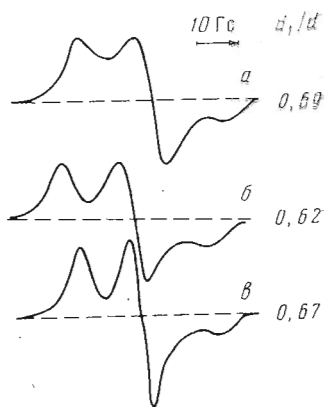


Рис. 7. Спектры ЭПР комплексов SMA1—ДМФХ 1 : 20 моль/моль (а), SMA1—ДМФХ 1 : 190 моль/моль (б) и ЛВП, содержащего SMA1 (в), при 77 К

меном нативного ApoA1 на спин-меченый белок и выделены препаративным ультрацентрифугированием с последующей гель-хроматографией. Состав, седиментационные характеристики, а также данные градиентного гель-электрофореза и гель-хроматографии спин-меченых ЛВП не отличались от исходных ЛВП. Электронные микрофотографии спин-меченых комплексов и спин-меченых ЛВП даны на рис. 5.

Спектры ЭПР спин-меченых комплексов и спин-меченого ЛВП (рис. 6 и 7) характеризуются различным значением параметра d_1/d . Константы восстановления радикалов аскорбиновой кислотой при 26° С были практически равны, т. е. в обоих случаях экспонированность радикалов в водную среду одинакова. Следовательно, различия в спектрах ЭПР характеризуют особенности пространственной структуры белкового компонента, а не разную локализацию парамагнитных центров в комплексе.

Сравнивая низкотемпературные спектры ЭПР спин-меченых ЛВП и спин-меченых комплексов со спектрами SMA1 в 2-хлорэтаноле, можно утверждать, что конформации ApoA1, в которых не наблюдается диполь-дипольного взаимодействия между парамагнитными центрами, не реализуются в составе мицеллярных и глобулярных комплексов.

Значение параметров d_1/d для комплексов SMA1—ДМФХ зависит от стехиометрии комплексов и размеров дискообразной мицеллы. В малых комплексах с высоким отношением ApoA1 к ДМФХ диполь-дипольное взаимодействие радикалов проявляется сильнее, чем в больших. Это можно объяснить, рассмотрев известную модель строения дискообразного мицеллярного комплекса аполипопротеина с фосфолипидом, где белок локализован на периферии диска [16—19]. Как было предположено нами ранее [9], значительная часть амфифильных фрагментов полипептидной цепи не контактирует с липидами комплекса, а образует белок-белковые гидрофобные контакты. Более сильное диполь-дипольное взаимодействие в комплексах ApoA1—ДМФХ (1 : 20) по сравнению с комплексами 1 : 190 свидетельствует о более компактной структуре белка и большем числе таких белок-белковых контактов. Наблюдаемая асимметрия спектра (при комнатной температуре) и значения параметра d_1/d (77К) для ЛВП₃, содержащих SMA1, указывают на то, что и в структуре глобулярных липопротеинов возможность гидрофобных белок-белковых контактов сохраняется. Наблюдаемое диполь-дипольное и обменное взаимодействие спиновых меток в составе ЛВП₃ согласуется с существованием «шарнирных» доменов аполипопротеинов, связанных гидрофобными связями, которые были предсказаны в работе [20].

Экспериментальная часть

ЛВП выделяли из плазмы здоровых доноров [21], АпоА1 получали по [22], спин-меченый триазирилхлорид [2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-оксил-4-(2,4-дихлор-1,3,5-триазирил-6)-амин], СМТХ, синтезировали по [23], ДМФХ, трис-НСl, кумасси ярко-синий G-250, гуанидинийхлорид, мочеви́на получена от фирмы Sigma, сефароза CL 4В и набор стандартных белков — от фирмы Pharmacia, 2-хлорэтанол — от фирмы Merck.

Спектры поглощения сняты на приборе Shimadzu 2000, спектры кругового дихроизма — на приборе Mark III (Jouan). Электронные микрофотографии (негативное контрастирование) получены на приборе JEM 100 (Jeol) при 66 000- и 100 000-кратном увеличении.

Концентрацию белка определяли по [24], ДМФХ и фосфолипидов ЛВП — по липидному фосфору [25], холестерина и холестерилэфи́ров — по [26], триглицеридов — по [27], свободных аминокрупп белка — по [28].

Спин-меченый АпоА1 (СМА1). К раствору 12 мг АпоА1 в 6 мл 0,2 М натрий-карбонат-бикарбонатного буфера (рН 9,8) добавляли 100 мкл 0,2 М раствора СМТХ в абс. диоксане и выдерживали смесь 40 ч при 4° С, осадок отделяли центрифугированием, к раствору добавляли мочеви́ну до концентрации 2 М, концентрировали при пониженном давлении и хроматографировали на колонке (1,6 × 60 см) с TSK 50 HW (Тоyo Soda) в буфере, содержащем 5 М мочеви́ну, 1 мМ NaN₃, 1 мМ EDTA, 0,01 М трис-НСl (рН 7,4). Фракцию, содержащую спин-меченый белок, диализовали против буфера, содержащего 0,01 М трис-НСl (рН 7,4) и 1 мМ EDTA.

Получение комплексов СМА1 — ДМФХ. Раствор 3 мг СМА1 (меченого СМТХ при рН 8,3 или 9,8) в 1,5 мл буфера (0,05 М трис-НСl, 0,001 М EDTA, 0,14 М NaCl, рН 7,4) смешивали с рассчитанным количеством ДМФХ в 1,5 мл 2-хлорэтанола, перемешивали на вортексе 30 с и наносили на колонку (1,6 × 90 см) с сефарозой, уравновешенной буфером. Хроматографию проводили в буфере со скоростью 15 мл/ч, собирая фракции по 2 мл.

ЛВП, содержащий СМА1. Препарат ЛВП₃ (1,5 г белка) инкубировали 48 ч с 9 мг СМА1 в 12 мл 0,01 М трис-НСl-буфера (рН 7,4) при 4° С, доводили плотность раствора сухим NaBr до 1,210 г/мл и центрифугировали 24 ч при 40 000 об/мин (ультрацентрифуга L-8 (Beckman, США), ротор Tu 65). Полученный препарат анализировали по составу, характеризовали аналитическим ультрацентрифугированием и гель-хроматографией на калиброванной колонке с сефарозой CL 4В.

Спектры ЭПР. Спектральные измерения проводили на приборе E-109 (Varian), используя микроволновую частоту 9,15 МГц. Прибор был оснащен термостаткой. Образец помещали в плоскую кварцевую кювету объемом 50 мкл (для регистраций спектров при 26° С) либо в специальный дюаровский сосуд (для регистраций спектров при 77К). Мощность СВЧ была 20 и 5 мВт, амплитуда модуляции 2,0 и 0,5 Гс при 26° С и соответственно 20 мВт и 2 Гс при 77К.

Концентрацию связанной с белком спин-метки определяли с помощью системы обработки данных E-900 (Varian) с использованием радикала 2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-окси́ла в качестве стандарта.

Диполь-дипольные взаимодействия характеризовали отношением суммы крайних компонент низкотемпературного спектра ЭПР к центральной компоненте d_1/d . Значения этого параметра в исследуемых препаратах сравнивали с зависимостями d_1/d от концентрации парамагнитных центров [12] и от расстояний между взаимодействующими парамагнитными центрами в бирадикалах [11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morisset J. D., Jackson R. L., Gotto A. M. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 472. P. 93—133.
2. Scanu A. M., Edelstein C., Shen B. W. // Lipid-protein interaction / Eds Jost P. C., Griffith O. H. N. Y.: Wiley, 1982. P. 259—316.

3. Atkinson D., Small D. M. // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1986. V. 15. P. 403—456.
4. Tall A. R., Shipley G. G., Small D. M. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 3749—3755.
5. Matz C. E., Jonas A. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 4536—4540.
6. Jonas A., Mc Hugh H. T. // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 794. P. 361—372.
7. Antonov I. V., Medvedeva N. V., Misharin A. Yu., Morozkin A. D., Ruuge E. K. // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. V. 835. P. 50—57.
8. Мишарин А. Ю., Медведева Н. В., Бушмакина Н. Г., Антонов И. В., Бушьева Т. Л. // *Биоорг. химия.* 1988. Т. 14. С. 1551—1556.
9. Мишарин А. Ю., Замеева Н. Ю., Антонов И. В., Бушмакина Н. Г., Медведева Н. В., Морозкин А. Д. // *Биоорг. химия.* 1989. Т. 15. С. 773—780.
10. Wyard S. J. // *Proc. Phys. Soc.* 1965. V. 86. P. 587.
11. Кокорин А. Н., Замараев К. Н., Григорян Г. Л., Иванов В. И., Розанцев Э. Г. // *Биофизика.* 1972. Т. 17. С. 34—42.
12. Bienvenue A., Vidal M., Sainte-Marie J., Phillipot J. // *Biochim. et biophys. acta.* 1985. V. 835. P. 557—566.
13. Luckhurst G. R. // *Spin Labeling. Theory and Application* // Ed. Berliner L. J. N. Y.: Acad. Press, 1976. P. 133—181.
14. Бучаченко А. Л., Вассерман А. М. Стабильные радикалы. М.: Химия, 1973. С. 98—106.
15. Смит Я., Бутлер К. // *Метод спиновых меток. Теория и применение* / Ред. Берлинер Л. М.: Мир, 1979. С. 444—485.
16. Atkinson D., Smith H. M., Dickson J., Austin J. P. // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 252. P. 744—754.
17. Tall A. R., Small D. M., Deckelbaum R. J., Shipley G. G. // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 4701—4717.
18. Broilette C. G., Jones J. L., Ng T. C., Kercret H., Chung B. H., Segrest J. P. // *Biochemistry.* 1984. V. 23. P. 359—367.
19. Anantharamaiah G. M., Jones J. L., Broilette C. G., Smidt C. F., Chung B. H., Hughes T. A., Brown A. S., Segrest J. P. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 10248—10256.
20. Cheng M. C., Segrest J. P., Albers J. J., Cone T. J., Broilette C. G., Chung B. H., Kashyap M., Glascock M. A., Anantharamaiah G. M. // *J. Lipid Res.* 1987. V. 28. P. 913—929.
21. Lindgren F. T. // *Preparative ultracentrifugation labor procedure and suggestion for lipoprotein analysis* / Ed. Perkin E. C. Amer. Oil Chemists Soc., 1975. P. 204—224.
22. Edelstein C., Lim C. T., Scanu A. M. // *J. Biol. Chem.* 1971. V. 247. P. 5842—5849.
23. Sykulev Yu. K., Timofeev V. P., Nezlin R. S., Misharin A. Yu., Franek F. // *FEBS Lett.* 1979. V. 101. P. 27—30.
24. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Folbert N. E. // *Analyt. Biochem.* 1978. V. 87. P. 206—209.
25. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. V., Vasendin I. M. // *J. Chromatogr.* 1975. V. 114. P. 129—141.
26. Abell L. L., Brodie B. B., Kendall F. E. // *J. Biol. Chem.* 1952. V. 195. P. 356—366.
27. Bucolo G., David H. // *Clin. Chem.* 1973. V. 19. P. 476—482.
28. Satake K., Okuyama T. // *J. Biochem. (Tokyo).* 1960. V. 47. P. 654—661.

Поступила в редакцию
23.I.1990

N. V. MEDVEDEVA, A. Yu. MISHARIN

STRUCTURAL FEATURES OF APOLIPOPROTEIN A1 IN HDLs AND IN COMPLEXES WITH DMPC. LOW TEMPERATURE ESR STUDY

Cardiology Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Apolipoprotein A1 (apoA1) was labelled with the excess of 2,2,6,6-tetramethylpiperidiny-N-oxyl-4-(2,4-dichloro-1,3,5-triazinyl-6)-amine at pH 9.8. The products, containing 7.2 (± 1) paramagnetic labels per 1 molecule of apoA1, showed spin-spin and dipole-dipole exchange interactions. The ESR spectra of the spin labelled A1 (at 77K) had $d1/d$ values 0.76 (at pH 7.4), 0.59 (in 3 M NaCl), 0.55 (in 3 M guanidinium hydrochloride), 0.44 (in 40% 2-chloroethanol).

Micellar complexes of spin labelled apoA1/DMPC (1 : 20 mol/mol and 1 : 190 mol/mol) and HDL containing spin labelled apoA1 were prepared. Comparison of ESR spectra at 77 K showed that apoA1 structure varies in the complexes with different stoichiometry and in spin labelled HDL. These data show the importance of hydrophobic protein-protein interactions for the structure of HDL and synthetic complexes of apoA1 with phosphatidyl choline.