



УДК 577.352.2

ДЕТЕРГЕНТНЫЕ СВОЙСТВА АПОЛИПОПРОТЕИНА А1
В МИЦЕЛЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСАХ
С ДИМИРИСТОИЛФОСФАТИДИЛХОЛИНОМ

Мишарин А. Ю., Замаева Н. Ю., Антонов П. В.,
Буимакина Н. Г., Медведова И. В., Морозкин А. Д.

*Институт экспериментальной кардиологии,
Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Бислойные дискообразные мицеллярные комплексы аполипопротеина А1 с димиристоилфосфатидилхолином состава 1:20, 1:40, 1:100, 1:250 (моль/моль) получены в кинетически контролируемых условиях. Средние размеры комплексов рассчитаны из данных аналитического ультрацентрифугирования, градиентного гелеэлектрофореза и электронной микроскопии. Для характеристики детергентных свойств аполипопротеина А1 (АпоА1) в составе комплексов введен параметр Δs_{A1} (площадь поверхности дискообразного комплекса, приходящаяся на молекулу белка). Значения Δs_{A1} , пропорциональные максимальной работе молекулы АпоА1 по стабилизации мицеллы, различаются для комплексов разной стехиометрии.

Обсуждается возможное участие фрагментов полипептидной цепи АпоА1 в образовании как липид-белковых, так и белок-белковых гидрофобных контактов в комплексах, различающихся по стехиометрии. Влияние белок-белковых взаимодействий на стехиометрию и структуру комплекса, а также на детергентные свойства белка показано на примерах комплексообразования димиристоилфосфатидилхолина с пептидами триптического гидролиза АпоА1 и с ковалентно связанным димером АпоА1.

Искусственные комплексы аполипопротеинов с липидами [1-4] широко используются в исследованиях белково-липидных взаимодействий [5-10], транспорта холестерина [11-14], липопротеиновых рецепторов [15, 16], взаимодействия липопротеинов различных классов [17-20]. Изучение комплексов аполипопротеинов с липидами дает возможность полнее представить структурные особенности липопротеинов. В основе представлений о химической природе связывания апобелков с липидами лежит модель «амфифильного спирального домена» [21], которая получила убедительные экспериментальные подтверждения [22-25]. Изучение комплексообразования синтетических пептидов с фосфолипидами и оценка детергентных свойств апобелка по «гидрофобному моменту домена» [26, 27] позволяет локализовать участки полипептидной цепи апобелков, способные к связыванию с липидной мицеллой.

Тем не менее такой подход не дает ответа на вопросы: 1) какие предсказанные амфифильные спиральные участки реализуются в конкретном липидно-белковом комплексе, 2) возможно ли участие неполярной поверхности амфифильного участка в образовании не только белок-липидного, но и белок-белкового контакта.

В предыдущем сообщении [28] нами было показано, что образование смешанных мицелл АпоА1 с димиристоилфосфатидилхолином (ДМФХ) при разбавлении раствора в 2-хлорэтанол водой вызывается агрегацией липидов. Следовательно, стехиометрический состав образующихся мицеллярных комплексов должен подчиняться кинетическому контролю и зависеть от соотношения реагентов в инкубационной смеси. Существование устойчивых мицеллярных комплексов АпоА1-ДМФХ с различной сте-

Сокращения: АпоА1 — аполипопротеин А1, ДМФХ — 1,2-димиристоил-*sn*-фосфатидилхолин, ДПФХ — 1,2-дипальмитоил-*sn*-фосфатидилхолин, доксил — 2,2-диметил-4,4-спирооксазолидип-3-*N*-оксн.

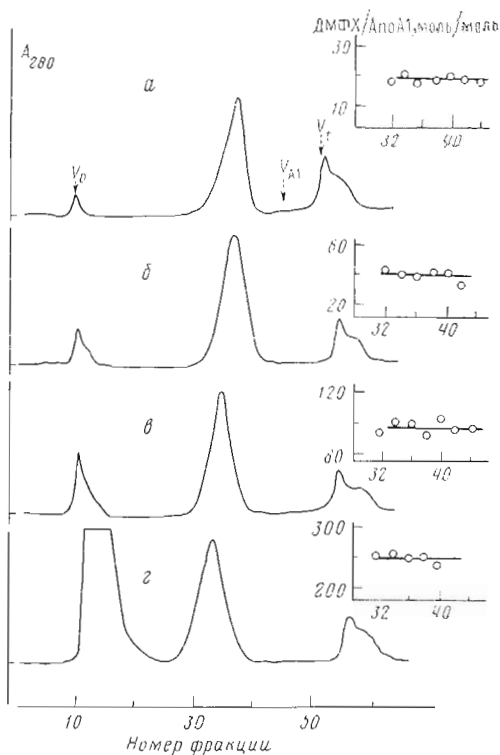


Рис. 1

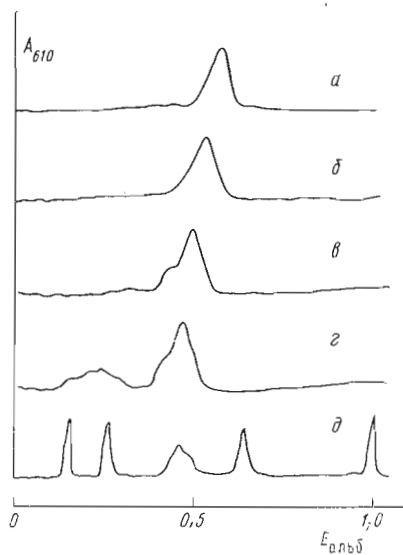


Рис. 2

Рис. 1. Выделение комплексов ApoA1-ДМФХ с соотношением компонентов 1:20 (а), 1:40 (б), 1:100 (в), 1:250 (г) гель-хроматографией (см. «Экспер. часть»). Стрелками показан свободный (V_0) и полный (V_{A1}) объем колонки и место выхода ApoA1 (V_{A1}). Фракции 32-40 соответствуют комплексу ApoA1-ДМФХ. Справа приведен анализ состава этих фракций

Рис. 2. Денситограмма градиентного веденатурирующего гель-электрофореза комплексов ApoA1-ДМФХ состава 1:20 (а), 1:40 (б), 1:100 (в), 1:250 (г) и смеси стандартных белков (д) (слева направо: тироглобулин, ферритин, каталаза, альдолаза, альбумин)

хиометрией, естественно должно быть связано с различиями в поверхностно-активных свойствах ApoA1 в составе комплекса.

Цель настоящей работы состоит в характеристике структурных различий комплексов ApoA1-ДМФХ с разной стехиометрией и сопоставлении детергентных свойств ApoA1 в составе таких комплексов.

В работе мы использовали предложенный ранее [28] метод получения мицеллярных комплексов, заключающийся в смешивании ApoA1 с рассчитанным количеством ДМФХ в 50% водном 2-хлорэтаноле с последующей гель-хроматографией в водной среде. При молярном соотношении ApoA1 и ДМФХ в инкубационной смеси, равном 1:20, 1:40, 1:100, выделены комплексы такой же стехиометрии; при начальном соотношении 1:500 выделены комплексы среднего состава 1:250, причем избыток ДМФХ отделяется в виде крупных частиц, не содержащих белка. Профили хроматографического элюирования комплекса с анализом состава фракций приведены на рис. 1, денситограммы градиентного гель-электрофореза комплексов — на рис. 2, электронные микрофотографии — на рис. 3. Данные аналитического ультрацентрифугирования по стехиометрического состава комплексов сведены в таблицу.

Сравнение характеристик полученных нами комплексов с опубликованными данными [1-4, 29, 30] позволяет заключить, что комплексы состава 1:100 и 1:250 практически неотличимы от комплексов, полученных методом детергентного диализа. В то же время использованный в данной работе метод комплексообразования позволил получить и оха-

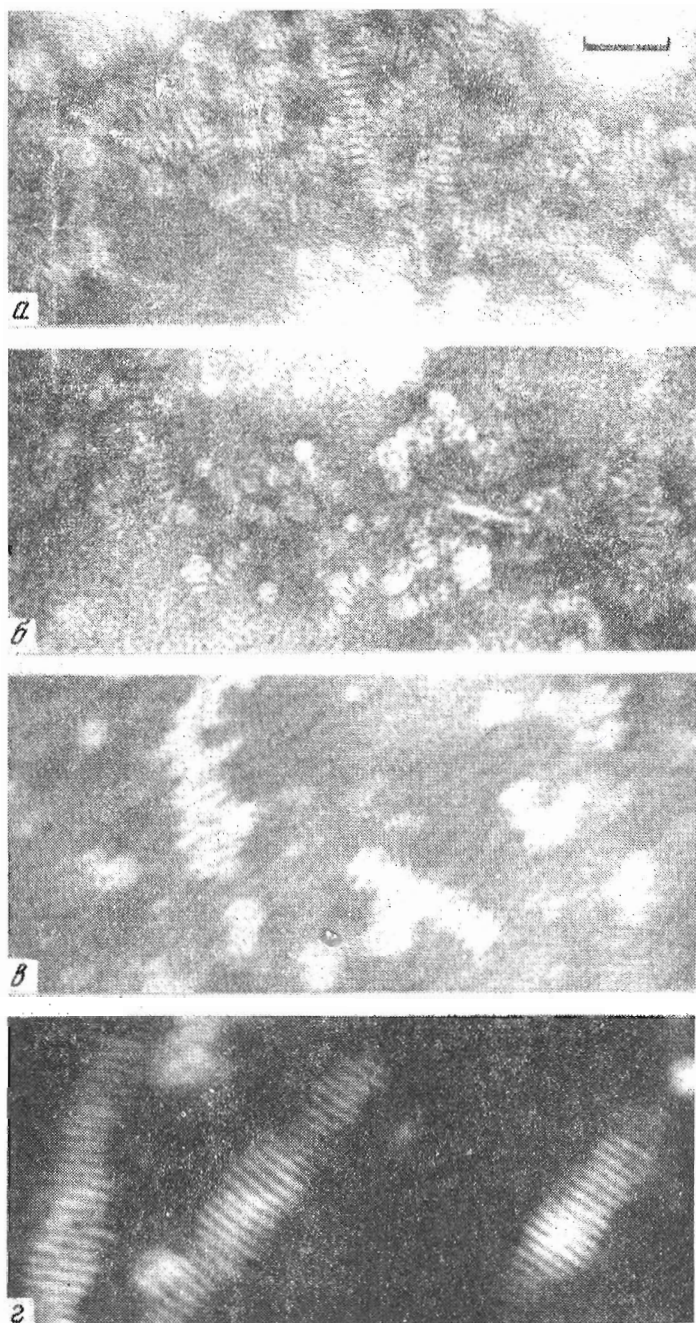


Рис. 3. Электронные микрофотографии комплексов ApoA1-ДМФХ состава 1:20 (а), 1:40 (б), 1:100 (в), 1:250 (г) при 100 000-кратном увеличении. Маркер 30 нм

рактизовать бислойные комплексы с высоким содержанием белка (1:20 и 1:40). Следует отметить, что эти комплексы практически неразличимы по размерам и седиментационным характеристикам, несмотря на различия в составе. Возможность существования мицелл подобного состава недавно была продемонстрирована методом малоуглового рентгеновского рассеяния [31].

Спектры флуоресценции триптофановых остатков ApoA1 в составе комплексов разной стехиометрии близки (λ_{max} 329–330 нм), спектры кругового дихроизма не показали достоверных различий. Это не позволило нам судить о различиях в числе амфифильных доменов.

Характеристика комплексов АпоА1—ДМФХ

Состав комплекса ДМФХ—АпоА1, моль/моль	$s_{20,w}, S$	АпоА1/комплекс *, молекула/частица	Средние размеры диска **, нм ($2r \times h$)
20	3,6	4,7	10,6×4,4
40	3,4	3,7	10,6×4,4
100	3,7	2,3	11,1×4,4
250	4,2 ***	4,7	20,0×4,4

* Рассчитано на основании стехиометрического состава и парциальных объемов компонентов по [18].

** Усредненные значения, полученные при измерении не менее 200 образцов.

*** Значение для основного компонента (80%), гомогенного в условиях ультрацентрифугирования.

Принимая во внимание способ комплексообразования, мы предположили, что амфифильные участки белка способны образовывать как белок-липидные, так и белок-белковые гидрофобные контакты. Полученные в результате мицеллы имеют различные размеры (таблица), а следовательно, и различную удельную поверхность. Площадь поверхности дискообразной частицы с радиусом r и толщиной h

$$s = 2\pi r(r+h),$$

а максимальная полезная работа сил поверхностного натяжения

$$A_{\max} = s\sigma,$$

где σ — коэффициент поверхностного натяжения на границе раздела мицелла/водная фаза. Исходя из этих простейших соотношений и принимая во внимание разное число молекул АпоА1 в частицах каждого из типов комплексов (таблица), можно показать, что в зависимости от стехиометрии комплекса каждая молекула АпоА1 способна совершать различную максимальную работу по стабилизации поверхности смешанной мицеллы. Для характеристики детергентных свойств АпоА1 в комплексах с фосфатидилхолином мы выбрали параметр Δs_{A1} (площадь поверхности смешанной мицеллы, приходящуюся на молекулу АпоА1 в составе мицеллы).

Сходство зависимостей Δs_{A1} от соотношения АпоА1 — фосфатидилхолил, полученных в данной работе, а также рассчитанных из литературных данных (рис. 4), указывает на монотонное изменение детергентных характеристик белка при изменении состава комплекса. Одним из возможных объяснений монотонного изменения детергентных свойств белка в составе мицеллярного комплекса может служить предположение, что эти изменения определяются заменой гидрофобных белок-белковых контактов на белок-липидные. В связи с этим естественно было предположить, что стабилизация белок-белковых контактов путем образования ковалентной связи в составе мицеллярного комплекса должна существенно влиять на детергентные свойства белка.

Для получения ковалентно связанного димера ((АпоА1)₂) была использована обработка комплекса с ДМФХ состава 1:100 диметилсуберимидатом [34, 35] (см. «Экспериментальную часть»). При рекомбинации такого димера с 200—1000-кратным избытком ДМФХ были выделены комплексы, содержащие не более 150 молекул ДМФХ на частицу (фракции 32—42, рис. 5а). На электронной микрофотографии (рис. 5б) видны дискообразные мицеллы, ассоциированные в протяженные стопки, аналогичные комплексам немодифицированного АпоА1 с ДМФХ.

Чувствительным зондом на изменение фазового состояния фосфолипидов в комплексе с аполипопротеннами является 5-доксилстеариновая кислота [36, 37]. Сравнение зависимостей спектров ЭПР 5-доксилстеариновой кислоты в составе комплексов АпоА1—ДМФХ и (АпоА1)₂—ДМФХ от температуры (рис. 6) свидетельствует о различии в подвижности липидной фазы комплексов. Стабилизация белок-белковых контактов ковалентной связью в составе мицеллы не только изменяет максимальное число связанных молекул липида, но и приводит к уменьшению под-

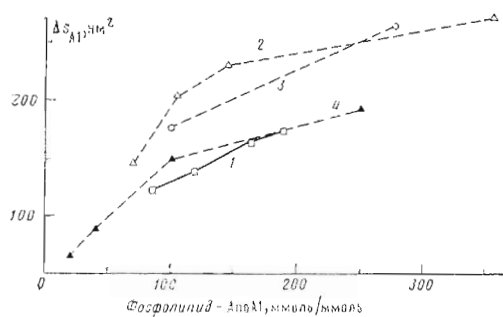


Рис. 4

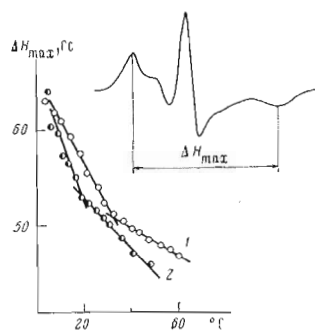


Рис. 6

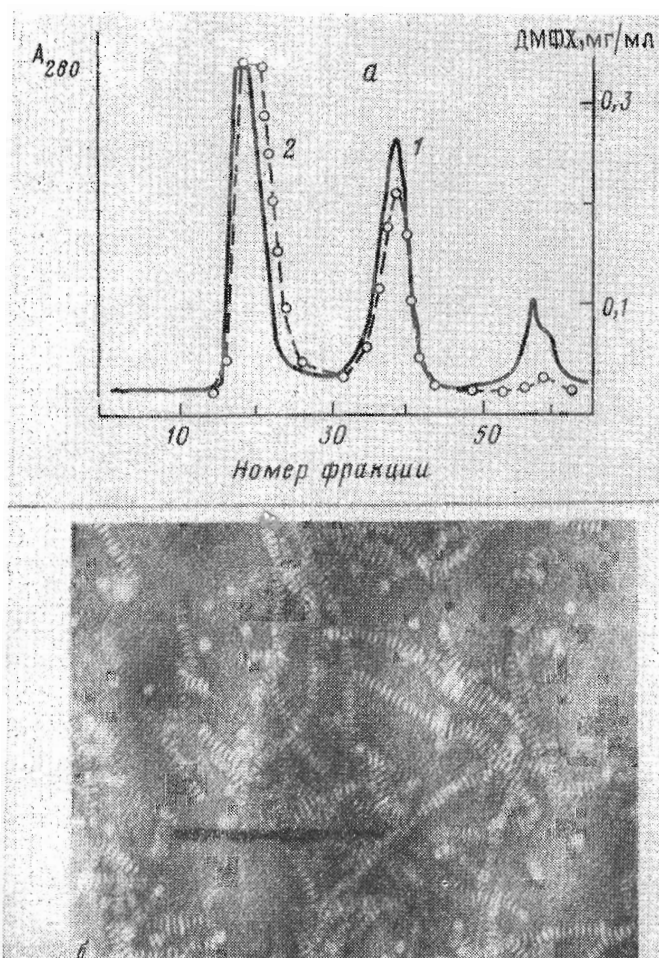


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость параметра ΔS_{A1} от состава комплексов АпоА1 с фосфатидилхолином яичного желтка (1; значения рассчитаны из данных работы [18]); с ДПФХ (2; значения рассчитаны из данных [32]; 3 - то же из данных [33]); с ДМФХ (4; данные настоящей работы)

Рис. 5. Комплекс (АпоА1)₂-ДМФХ: а - выделение гель-хроматографией (1 - A_{280} , 2 - ДМФХ), б - электронная микрофотография мицеллярных комплексов из фракций 33-41. Маркер 120 нм

Рис. 6. Температурные зависимости спектров ЭПР 5-доксилстеариновой кислоты (ΔH_{max}) в комплексе (АпоА1)₂-ДМФХ (1) и комплексе АпоА1-ДМФХ состава 1:100 (2).

Экспериментальный спектр при 20° С с обозначением параметра ΔH_{max} приведен в верхней части рисунка

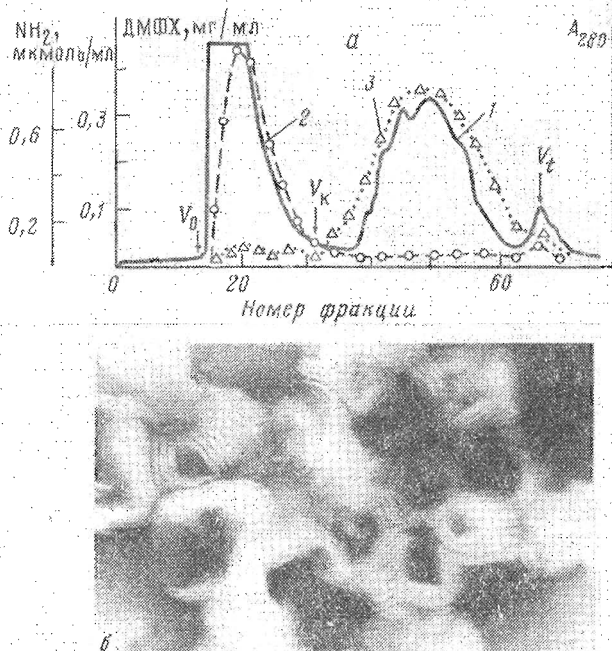


Рис. 7. Взаимодействие смеси пептидов триптического гидролиза АпоА1 с ДМФХ: *a* — хроматография продуктов инкубации (см. «Экспер. часть») на колонке (1,6×80 см) с сефарозой CL-4В (1 — A_{280} , 2 — ДМФХ, 3 — NH_2); *б* — электронная микрофотография (негативное контрастирование) фракций 15–30. V_k — объем выхода комплекса АпоА1–ДМФХ, Γ : 100

вижности липидной фракции (или увеличению фракции прочно связанных с белком липидов).

Продукты гидролиза АпоА1 трипсином не образуют мицеллярных комплексов с ДМФХ. После инкубации смеси пептидов триптического гидролиза в 50% 2-хлорэтаноле с ДМФХ были обнаружены лишь крупные агрегаты, содержащие практически весь ДМФХ и следовые количества пептидов, в то время как большая часть пептидов выходила во фракциях, не содержащих ДМФХ (рис. 7*a*). По данным электронной микроскопии (рис. 7*б*), в первой зоне имеются крупные ламеллярные структуры и многослойные липосомы. В составе этой фракции найдено несколько гидрофобных, практически нерастворимых в воде пептидов.

В связи с вышеизложенным мы полагаем, что детергентные свойства АпоА1 в комплексах с фосфатидилхолином зависят от стехиометрического состава комплексов и определяются участием неполярной поверхности амфифильных доменов в образовании белок-липидных и белок-белковых контактов.

Экспериментальная часть

Липопротеины высокой плотности выделяли из плазмы здоровых доноров [38], АпоА1 получали по методике [39], ДМФХ, диметилсуберимидат, трис-НСl, трипсин, кумасси ярко-синий С-250 — препараты Sigma, сефароза CL-4В и набор стандартных белков (electrophoresis calibration kit) — Pharmacia, триэтаноламин — Koch-Light, «Toyo pearl HW 50» — Toyo Soda, 5-доксилстеариновая кислота — Syva.

Спектры поглощения сняты на приборе Shimadzu 2000, спектры ЭПР — на приборе Varian E9, спектры флуоресценции — на приборе Aminco 500, спектры кругового дихроизма — на приборе Mark III, Jouan Rousset. Аналитическое ультрацентрифугирование проводили на приборе

Beckman, модель E, как описано ранее [40]. Градиентный гель-электрофорез осуществляли на пластинках полиакриламидного (3–30%) геля по методу [41]; после окрашивания гели сканировали на лазерном денситометре Ultra Scan 2202 (ЛКВ) при 610 нм. Электронные микрофотографии (негативное контрастирование) получены на приборе JEM 100, JEOL при 66 000- и 100 000-кратном увеличении (образцы приготавливали по [42]). Концентрацию белка определяли по работе [43], концентрации ДМФХ — по липидному фосфору [44].

Получение комплексов АпоА1–ДМФХ. Раствор 3 мг АпоА1 в 1,5 мл буфера (0,05 М трис-НСl, 0,001 М ЕДТА, 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.

Получение ковалентно связанного димера АпоА1 ((АпоА1)₂). Комплекс АпоА1–ДМФХ (1:100, моль/моль, 6 мг АпоА1) диализовали против 0,05 М буфера триэтанолламин-НСl, рН 8,3 (3×2 л, 36 ч), доводили концентрацию триэтанолламина до 0,1 М и рН образца до 9,7, добавляли 5 мг хлоридрата диметилсуберимидата, перемешивали 4 ч при 20° С, добавляли 20 мг ацетата аммония и спустя 2 ч диализовали против воды (3×2 л, 36 ч), упаривали в вакууме при 30° С, экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2:1) (3×5 мл), остаток растворяли в 3 мл 5 М мочевины и хроматографировали на колонке (2,3×60 см) с Тоуо pearl НW 50 в 5 М мочевины, содержащей 0,05 М буфер трис-НСl, рН 7,4. Фракции анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле в додецилсульфате натрия [45]. Фракцию, содержащую (АпоА1)₂, диализовали против воды.

Комплекс (АпоА1)₂–ДМФХ получали аналогично получению комплексов АпоА1–ДМФХ.

Обработку АпоА1 (6 мг) трипсином проводили в стандартных условиях [46], после остановки протеолиза добавлением избытка диметилсульфонилфторида к смеси пептидов добавляли равный объем раствора 12 мг ДМФХ в 2-хлорэтаноле и прозрачный раствор наносили на колонку (1,6×90 см) с сефарозой CL-4В, уравновешенной боратным буфером, рН 7,4. Фракции анализировали на содержание липидного фосфора и аминокрупп [47]. Для выделения связанных с ДМФХ пептидов собравшую фракцию концентрировали, 3 раза последовательно экстрагировали 5 мл смеси хлороформ — метанол (2:1), экстракт промывали 2 мл раствора 5 М мочевины, объединяли с остатком и обессоливали на колонке (1,0×90 см) с сефадексом G10, уравновешенным 2 М уксусной кислотой; фракции концентрировали и анализировали методом ВЭЖХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scanu A. M., Edelman C., Shen B. W. // Lipid-Protein Interactions. V. 1/Eds Jost P., Griffith O. H. N. Y.: Wiley, 1982. P. 259.
2. Reynolds J. A. // Lipid-Protein Interactions. V. 2/Eds Jost P., Griffith O. H. N. Y.: Wiley, 1982. P. 193.
3. Jonas A. // Exp. Lung. Res. 1984. V. 6. № 2. P. 255–270.
4. Misharin A. Yu., Antonov I. V. // Soc. Med. Rev. A. Cardiol. V. 1/Eds Chazov E. I., Smirnov V. N. Harwood: Acad. Publ. GmbH. 1987. P. 241–233.
5. Morisset J. D., Jackson R. L., Gotto A. M. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 472. № 2. P. 93–133.
6. Pownall H. J., Pao Q., Hickson D., Sparrow J. T., Kusserow S. K., Massey J. B. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 23. P. 6630–6635.
7. Swaney J. B. // Biol. Chem. 1980. V. 255. № 3. P. 877–883.
8. Segrest J. P. // Chem. Phys. Lipids. 1977. V. 18. № 1. P. 7–22.
9. Sparrow J. T., Gotto A. M. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1980. V. 348. № 2. P. 187–203.
10. Reynolds J. A. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 6. P. 1124–1129.
11. Rothblat G. H., Phillips M. C. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 11. P. 4775–4780.
12. Petrie G. E., Jonas A. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 4. P. 720–725.
13. Phillips M. C., McLean L. R., Stoudt W. G., Rothblat G. H. // Atherosclerosis. 1980. V. 36. № 3. P. 409–422.
14. De Lamatre J., Woljbauer G., Phillips M. C., Rothblat G. H. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 875. № 3. P. 419–428.
15. Mahley R. W., Innerarity T. L. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 713. № 2. P. 197–222.

16. Rall S. C., Weisgraber K. H., Innerarity T. L., Mahley R. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 15. P. 4696-4700.
17. Nichols A. V., Gong E. L., Blanche P. J., Forte T. M. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 617. № 3. P. 480-488.
18. Nichols A. V., Gong E. L., Blanche P. J., Forte T. M. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 750. № 2. P. 353-364.
19. Forte T. M., Ren C. L., Nordhausen R. W., Nichols A. V. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 834. № 3. P. 386-395.
20. Sharoch Z., Nichols A. V. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 878. № 2. P. 152-158.
21. Segrest J. P., Jackson R. L., Gotto A. M. // FEBS Lett. 1974. V. 38. № 2. P. 247-253.
22. Segrest J. P., Feldmann R. J. // Biopolymers. 1977. V. 16. № 7. P. 2052-2071.
23. Segrest J. P. // FEBS Lett. 1979. V. 106. № 2. P. 169-170.
24. Brouillette C., Jones J. L., Ng T. C., Kercret H., Chung B. H., Segrest J. P. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 2. P. 359-367.
25. Boguski M. S., Eichorbagy N. M., Taylor J. M., Gordon J. I. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 17. P. 5021-5025.
26. Phillips M. C. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 754. № 2. P. 227-230.
27. Weinberg R. B. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 918. № 3. P. 299-303.
28. Мишарин А. Ю., Медведева Н. В., Бушмакина Н. Г., Антонов Н. В., Рууге Э. К. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1551-1556.
29. Matz C. E., Jonas A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 8. P. 4535-4540.
30. Zorich N. L., Kezdy K. E., Jonas A. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 919. № 2. P. 181-189.
31. Donovan J. M., Benedek G. B., Carey M. C. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 25. P. 8125-8133.
32. Jonas A., Mc Hugh H. T. // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 794. № 3. P. 361-372.
33. Wetterau J., Jonas A. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 7. P. 2637-2643.
34. Swaney J. B., O'Brien K. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 19. P. 7069-7077.
35. Nichols A. V., Blanche P. J., Gong E. L., Shore V. G., Forte T. M. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 834. № 3. P. 285-300.
36. Andrews A. L., Atkinson D., Barrat M. D., Finer E. G., Hauser H., Henry P., Leslie R. B., Owens N. L., Phillips M. C., Robertson R. N. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 64. № 2. P. 549-563.
37. Медведева Н. В., Морозкин А. Д., Бушмакина Н. Г., Мишарин А. Ю., Рууге Э. К. // Биох. мембраны. 1987. Т. 6. № 7. С. 849-856.
38. Lindgren F. T. // Preparative ultracentrifugation laboratory procedures and suggestion for lipoprotein analysis. / Ed. Perkin E. C. N. Y.: Amer. Oil Chemists Soc. 1975. P. 204-224.
39. Edelstein C., Lim C. T., Scanu A. M. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 18. P. 5842-5849.
40. Antonov I. V., Medvedeva N. V., Misharin A. Yu., Morozkin A. D., Ruuge E. K. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 5. P. 50-57.
41. Blanche P. J., Gong E. L., Forte T. M., Nichols A. V. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 665. № 3. P. 408-419.
42. Forte T. M., Nichols A. V., Glaeser R. M. // Chem. Phys. Lipids. 1968. V. 2. № 3. P. 396-408.
43. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Folbert N. E. // Analyt. Biochem. 1978. V. 87. № 1. P. 206-210.
44. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. V., Vasendin I. M. // J. Chromatogr. 1975. V. 114. № 1. P. 129-141.
45. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 9. P. 680-685.
46. Дзвени Е., Гергей Я. // Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976. С. 165-172.
47. Satake K., Okugata T. // J. Biochem. 1960. V. 7. № 3. P. 680.

Поступила в редакцию
13.VII.1988

После доработки
31.X.1988

DETERGENT-LIKE PROPERTIES OF APOLIPOPROTEIN A1 IN MICELLAR COMPLEXES WITH DIMYRISTOYL PHOSPHATIDYLCHOLINE

MISHARIN A. Yu., ZAMAEVA N. Yu., ANTONOV I. V., BUSHMAKINA N. G.,
MEDVEDEVA N. V., MOROZKIN A. D.

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

Bilayer micellar complexes of the human plasma apolipoprotein A1 with dimyristoyl phosphatidylcholine were prepared under kinetically controlled conditions. Detergent-like properties of Apo A1 in the complexes were expressed in terms of Δs_{A1} parameter (surface area of mixed micelle per an Apo A1 molecule). Analysis of our and earlier published data showed the correlation of the Δs_{A1} parameter with the stoichiometry of complexes. Changes of detergent-like properties were caused by cross-linking or proteolysis of Apo A1.