



УДК 547.915.5.963

ВЛИЯНИЕ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ АГЕНТОВ, ИОННОЙ СИЛЫ И 2-ХЛОРЭТАНОЛА НА СТРУКТУРУ СПИН-МЕЧЕНОГО АПОЛИПОПРОТЕИНА А1 В РАСТВОРЕ

© 1996 г. Н. В. Медведева, А. Ю. Мишарин[#]

Институт экспериментальной кардиологии,
Кардиологический научный центр РАМН,
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., д. 15а

Поступила в редакцию 05.12.95 г.

Аполипопротеин А1 (апоА1) из липопротеинов высокой плотности плазмы крови человека был превращен в спин-меченые препараты действием 4-(2,4-дихлор-1,3,5-триазин-6-ил)амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-оксила при рН 8.3 и 9.8. Препараты содержали 2.3 (± 0.5) и 7.2 (± 1.0) парамагнитных радикалов [СМ(2)А1] и [СМ(7)А1] на молекулу белка соответственно; их спектры ЭПР имели качественные различия. Спектры ЭПР [СМ(7)А1] свидетельствовали о наличии спин-спинового и диполь-дипольного взаимодействия радикалов, локализованных в одной молекуле белка. Изменение ионной силы раствора, присутствие органических растворителей и денатурирующих реагентов влияли на спектры ЭПР, изменяя усредненную степень иммобилизации спиновых меток, а также вклад взаимодействия радикалов. Эти результаты указывают на наличие внутримолекулярных гидрофобных контактов между амфифильными участками полипептидной цепи апоА1 в водных растворах.

Ключевые слова: апоА1, структура апоА1, спин-метка, ЭПР-спектроскопия.

Аполипопротеин А1 (апоА1) – основной белок липопротеинов высокой плотности плазмы крови. АпоА1 способен к самоассоциации в водных растворах, образует мицеллярные комплексы с липидами и детергентами, локализуется на поверхности раздела фаз, активирует лецитин : холестерин-ацилтрансферазу (обзоры [1–4]). Вышеуказанные процессы сопровождаются изменениями вторичной структуры апоА1. Для полипептидной цепи апоА1 характерно наличие повторяющихся α -спиральных 22-членных амфифильных фрагментов. Белок обладает высокой конформационной подвижностью и слабо выраженной третичной структурой [5].

Определенную информацию о структуре апоА1 в различных условиях можно получить из анализа спектров ЭПР апоА1, модифицированного спиновой меткой [6, 7]. Цель настоящей работы – исследование влияния ионной силы, органических растворителей и денатурирующих агентов на спектры ЭПР спин-меченого апоА1; на основании изменений в спектрах, вызываемых присутствием указанных реагентов, нами показана важность внутримолекулярных гидрофобных контактов для поддержания структуры молекулы апоА1 в растворе.

Лизиновые остатки апоА1 были модифицированы спиновым реагентом 4-(2,4-дихлор-1,3,5-триазин-6-ил)амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-оксилом [8] при рН 8.3 и 9.8, как было описано нами ранее [9]. Препарат апоА1, модифицированный спин-меткой при рН 8.3, содержал 2.3 (± 0.5) парамагнитных радикала на молекулу белка [СМ(2)А1], а препарат, модифицированный при рН 9.8, имел 7.2 (± 1.0) парамагнитных радикалов – [СМ(7)А1]. Спектры ЭПР белков [СМ(2)А1] и [СМ(7)А1] качественно различаются (рис. 1). Спектр [СМ(2)А1] представляет собой суперпозицию по крайней мере двух сигналов с различной степенью иммобилизации, в то время как сигнал ЭПР от [СМ(7)А1] искажен взаимодействием радикалов и характерен для полирадикалов [10–12]: статические обменные и диполь-дипольные взаимодействия радикалов приводят к кажущемуся стягиванию крайних компонент спектра к центру. Отношение величины B (рис. 1) к интенсивности центральной компоненты спектра ЭПР (C) для [СМ(2)А1] характеризует форму линии спектра и связано с усредненной степенью иммобилизации метки. О взаимодействии радикалов в препарате [СМ(7)А1] можно судить по параметру E/F (см. рис. 1б), характеризующему асимметрию низкочастотной компоненты спектра.

Вид спектра ЭПР [СМ(7)А1] в буфере не зависел от концентрации белка в интервале 10^{-6} – 10^{-4} М, и

[#] Автор для переписки.

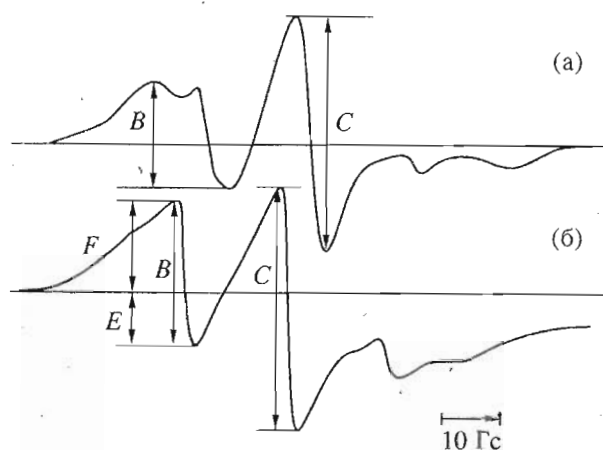


Рис. 1. Спектры ЭПР [SM(2)Al] (а) и [SM(7)Al] (б) в буфере при 26°C. Концентрация белка 10^{-5} М. Показаны параметры B , C , E и F , использованные для характеристики степени иммобилизации и асимметрии спектра ЭПР спин-меток.

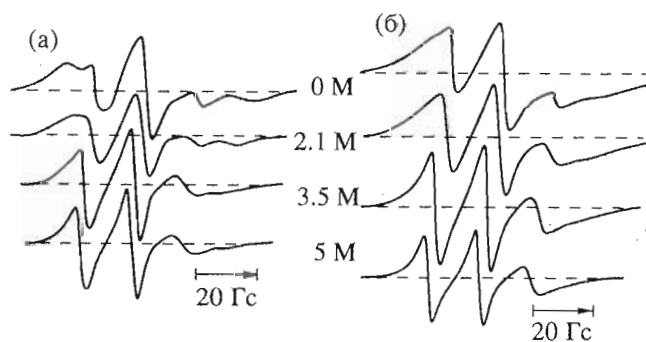


Рис. 2. Спектры ЭПР [SM(2)Al] (а) и [SM(7)Al] (б) в растворах, содержащих 2-хлорэтанол указанной концентрации, при 26°C. Концентрация белка 10^{-5} М.

искажения в спектре, обусловленные взаимодействием радикалов, сохранялись при низких концентрациях спин-меченого апоА1. Очевидно, что ассоциация апоА1, имеющая место в водных рас-

творках в этом интервале концентраций [13–15], не влияет на значение параметров B/C и E/F . Следовательно, за искажения спектра ЭПР в [SM(7)Al] отвечают взаимодействия парамагнитных радикалов, локализованных в одной молекуле модифицированного апоА1.

Спектры ЭПР [SM(2)Al] и [SM(7)Al] чувствительны к присутствию 2-хлорэтанола, увеличивающему долю α -спирали в молекуле апоА1 (по данным КД, доля α -спирали в воде – 50%, а в 85% 2-хлорэтаноле – 70% [16]). Влияние 2-хлорэтанола на спектры ЭПР [SM(2)Al] и [SM(7)Al] показано на рис. 2.

Возрастание концентрации 2-хлорэтанола вызывало увеличение подвижности спин-меток и ослабление их взаимодействия в препарате [SM(7)Al]. Сопоставляя параметры B/C и E/F для [SM(7)Al] при разных концентрациях 2-хлорэтанола (рис. 3а), видим, что асимметрия спектра, характеризуемая величиной E/F (кривая 2), снимается более низкими концентрациями 2-хлорэтанола и стабилизируется раньше, чем значение B/C (кривая 1). Повышение ионной силы раствора, способствующее самоассоциации апоА1 и возрастанию доли α -спирали [15], ведет к увеличению степени иммобилизации меток и усилению взаимодействия радикалов в препарате [SM(7)Al] (рис. 3б).

Денатурация под действием гуанидингидрохлорида приводит к возрастанию параметров B/C и E/F (рис. 3в). При концентрации гуанидингидрохлорида 0–0.5 М (т.е. в условиях, при которых в основном происходит диссоциация олигомеров апоА1 [17, 18]) спектральные изменения незначительны. В интервале концентраций гуанидингидрохлорида 0.5–1.5 М наблюдается резкое изменение параметров B/C и E/F , обусловленное денатурацией мономера апоА1. Спектры ЭПР [SM(7)Al] при 26°C в буфере, 2-хлорэтаноле и 3.5 М NaBr приведены на рис. 4. Видно, что искажения формы линии, обусловленные взаимодействием

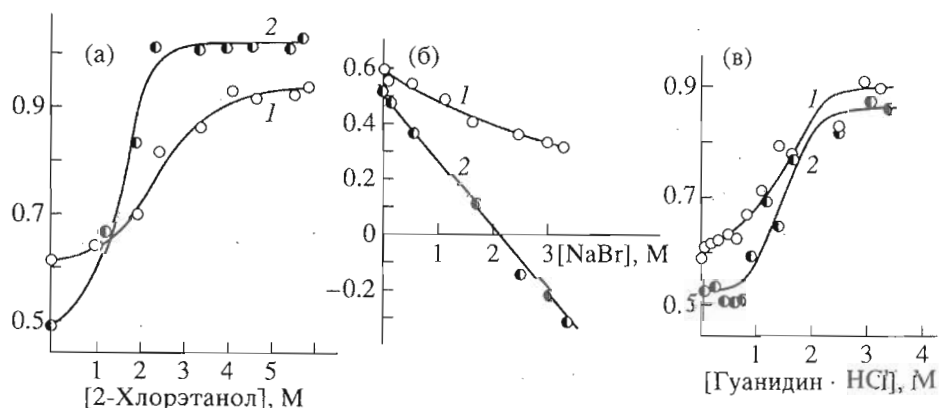


Рис. 3. Влияние 2-хлорэтанола (а), NaBr (б) и гуанидингидрохлорида (в) на параметры B/C (1) и E/F (2) при 26°C для [SM(7)Al].

парамагнитных центров, локализованных в одной молекуле [СМ(7)Al], отчетливо проявляются в буфере (рис. 4а), полностью снимаются в 2-хлорэтаноле (рис. 4б) и значительно усиливаются в присутствии 3.5 М NaBr (рис. 4в).

Спектры ЭПР бирадикалов, записанные при низких температурах (77 К), позволяют оценивать взаимное расположение взаимодействующих парамагнитных центров [11]. В случае полирадикала точная оценка расстояний между отдельными радикалами в пределах одной макромолекулы невозможна, однако значения параметров d_1/d , превышающие 0.5, указывают на наличие диполь-дипольного взаимодействия спин-меток. Спектры ЭПР при 77 К с указанием параметра d_1/d для [СМ(7)Al] в присутствии бромистого натрия, гуанидингидрохлорида и 2-хлорэтанола приведены на рис. 5. Видно, что при высоких концентрациях 2-хлорэтанола диполь-дипольное взаимодействие спин-меток отсутствует.

Сопоставление результатов этой работы с опубликованными данными о влиянии денатурирующих реагентов, ионной силы и органических растворителей на структуру апоА1 (полученных ранее с использованием методов КД, флуоресцентной спектроскопии, гель-хроматографии и аналитического ультрацентрифугирования [13–18]) позволяет высказать некоторые соображения об особенностях вторичной и третичной структуры апоА1.

Характер изменения параметров V/C и E/F под действием гуанидингидрохлорида указывает на ступенчатую денатурацию, показанную ранее методом КД [14]. Диссоциация олигомера апоА1 под действием низких концентраций гуанидингидрохлорида не оказывает значительного влияния на спектры ЭПР.

Присутствие соединений, влияющих на самоассоциацию апоА1 и его вторичную структуру, сильно сказывается на изменении параметров E/F и d_1/d . Однако не существует однозначной корреляции между степенью α -спирализации и параметрами, характеризующими сближенность парамагнитных фрагментов в молекуле [СМ(7)Al]. И 2-хлорэтанол, и высокие концентрации электролитов, как известно, увеличивают α -спирализацию полипептидной цепи апоА1, однако по-разному влияют на параметры E/F и d_1/d . На наш взгляд, наиболее разумным объяснением наблюдаемых изменений является изменение пространственной сближенности амфифильных фрагментов в зависимости от состава растворителя. И в 40% 2-хлорэтанол, и в 3 М растворе бромистого натрия доля спиральных участков молекулы апоА1 высока, однако высокоспирализованный апоА1 "раскрыт" в присутствии 2-хлорэтанола, сольватирующего гидрофобные поверхности амфифильных фрагментов, но "сжат" в растворе с высокой ионной силой.

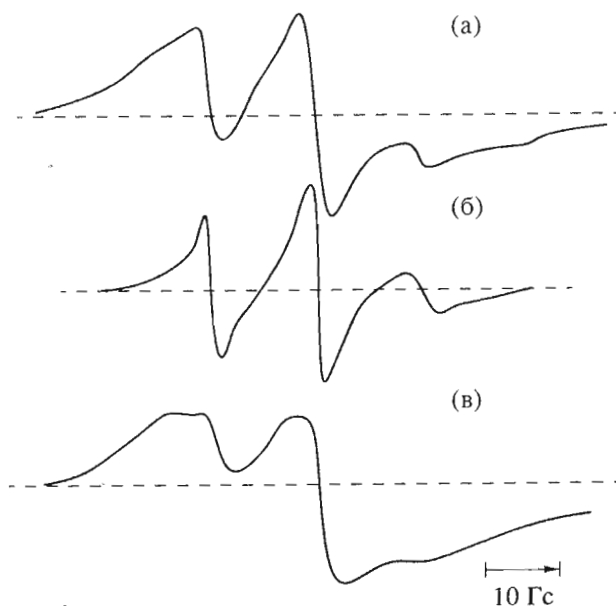


Рис. 4. Спектры ЭПР [СМ(7)Al] в буфере (а), 2-хлорэтаноле (б), 3.5 М растворе NaBr (в) при 26°С.

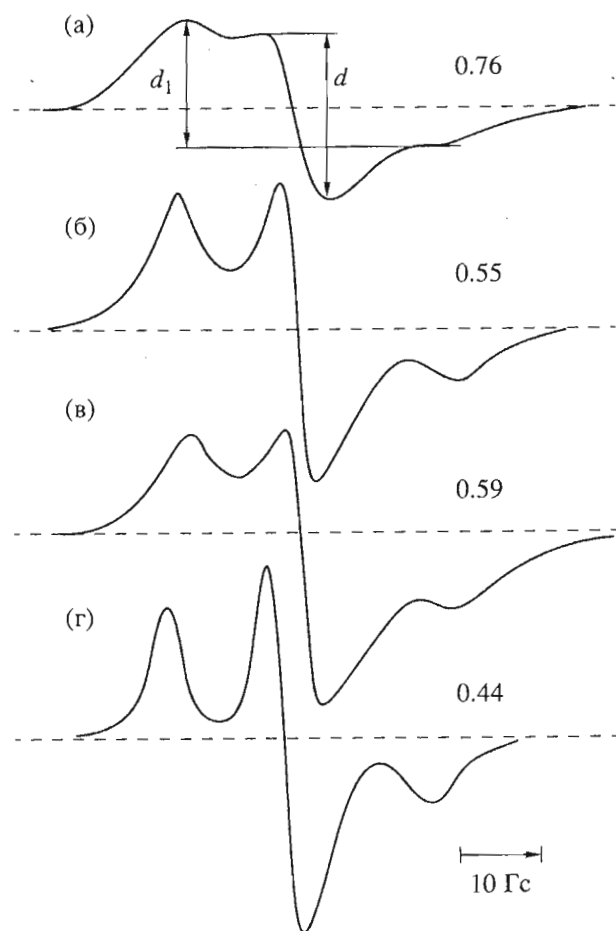


Рис. 5. Спектры ЭПР [СМ(7)Al] в буфере (а), 3 М растворе гуанидингидрохлорида (б), 3 М растворе NaBr (в), 3.5 М растворе 2-хлорэтанола (г) при 77 К. Приведены значения d_1/d .

Ранее нами было показано, что в 40% 2-хлорэтанол не происходит связывания апоА1 с мономерными молекулами фосфатидилхолина [19]. Следовательно, одни и те же гидрофобные домены амфифильных участков полипептидной цепи способны связываться с фосфатидилхолином в составе мицеллярного комплекса или стабилизировать третичную структуру делипидированного апоА1 в водных растворах. Возможность образования подобных гидрофобных белок-белковых контактов в составе мицеллярных комплексов, обсуждавшаяся нами ранее [9, 19, 20], может объяснить устойчивость двухкомпонентных комплексов апоА1-фосфатидилхолин с различной стехиометрией.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стабильный радикал 4-(2,4-дихлор-1,3,5-триазин-6-ил)амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-оксил синтезирован по методике, описанной ранее [8]. Использованы трис-(гидроксиметил)аминометангидрохлорид (трис-НС1), гуанидингидрохлорид, EDTA, кумасси ярко-синий G250, мочевины и 2,4,6-тринитробензолсульфокислота (Sigma); сефакрил S 200, набор стандартных белков "Electrophoresis Calibration Kit" (Pharmacia); гели для хроматографии TSK HW 50 и TSK HW 55 (Toyo Soda); 2-хлорэтанол (Aldrich).

Липопротеины выделяли из плазмы здоровых доноров по модифицированному методу [21]. Препарат апоА1 получали как описано ранее [19, 20].

Спин-меченый апоА1. К раствору 12 мг апоА1 в 6 мл 0.2 М натрий-карбонат-бикарбонатного буфера (рН 8.3 или 9.8) добавляли 100 мкл 0.2 М раствора 4-(2,4-дихлор-1,3,5-триазин-6-ил)амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-оксила в диоксане. Смесь выдерживали 6 ч при 4°C в буфере с рН 8.3 или 20 ч в буфере с рН 9.8, осадок отделяли центрифугированием, к раствору добавляли мочевины до концентрации 2 М, концентрировали при пониженном давлении до 1/3 объема и хроматографировали на колонке (1.6 × 60 см) с TSK HW 50 в буфере, содержащем 5 М мочевины, 10 мМ трис-НС1, 1 мМ EDTA, 1 мМ NaN₃, рН 7.4. Фракцию со спин-меченым белком диализовали против буфера с 10 мМ трис-НС1 и 1 мМ EDTA, рН 7.4, а для определения содержания свободных аминокрупп белка – против 10 мМ боратного буфера, рН 7.5.

Спектры поглощения регистрировали на приборе Упасо УО 2000. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [22], концентрацию свободных аминокрупп белка – по методу [23].

Спектры ЭПР измеряли на приборе Varian E-109, используя микроволновую частоту 9.15 МГц. Прибор оснащен термоприставкой. Образец по-

мещали в плоскую кварцевую кювету объемом 50 мкл (для регистрации спектра при 26°C) или в специальный дьюаровский сосуд (для регистрации спектров при 77 К). При 26°C мощность СВЧ генератора была 20 и 5 мВт, амплитуда модуляции 2.0 и 0.5 Гс для препаратов [СМ(2)А1] и [СМ(7)А1] соответственно; при 77 К 20 мВт и 2.0 Гс.

Концентрацию спин-метки, связанной с белком, определяли с помощью системы обработки данных Varian E-900 (стандарт – 2,2,6,6-тетраметилпиперидинил-1-оксил).

Диполь-дипольные взаимодействия характеризовали отношением d_1/d , определяемым из спектров ЭПР при 77 К, по методу [11]. Значения параметра d_1/d связаны с эффективной концентрацией радикала и расстояниями между взаимодействующими парамагнитными центрами в биорадикале эмпирической зависимостью [11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jonas A. // *J. Lipid Res.* 1986. V. 27. P. 689–698.
- Scanu A.M., Edelstein C., Shen B.W. // *Lipid-Protein Interactions* / Eds P.C. Jost, O.H. Griffith. N.Y.: Wiley, 1982. P. 259–316.
- Atkinson D., Small D.M. // *Annu. Biophys. Biophys. Chem.* 1986. V. 15. P. 403–456.
- Segrest J.P., Jones M.K., De Loof H., Brouillette C.G., Venkatachalapati Y.V., Anantharamaiah G.M. // *J. Lipid Res.* 1992. V. 33. P. 141–166.
- Tall A.R., Shipley G.G., Small D.M. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 3749–3755.
- Gotto A.M., Kon H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969. V. 37. P. 444–450.
- Laggner P., Kostner G.M. // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 84. P. 227–232.
- Sykulev Yu.K., Timofeev V.P., Nezlin R.S., Misharin A.Yu., Franek F. // *FEBS Lett.* 1979. V. 101. P. 27–30.
- Медведева Н.В., Мишарин А.Ю. // *Биоорганическая химия.* 1991. Т. 17. С. 60–65.
- Wyard S.J. // *Proc. Phys. Soc.* 1965. V. 86. P. 587.
- Кокорин А.Н., Замараев К.Н., Григорян Г.Л., Иванов В.И., Розанцев Э.Г. // *Биофизика.* 1972. Т. 17. С. 34–42.
- Bienvenue A., Vidal M., Sainte-Marie J., Phillipot J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 835. P. 557–566.
- Vitelo L.B., Scanu A.M. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 1131–1136.
- Formisano S., Brewer H.B., Osborne J.C. // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. P. 354–360.
- Donovan J.M., Benedek G.B., Carey M.C. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 8116–8125.
- Gwynne J., Brewer H.B., Edelchoch H. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 2411–2416.
- Reynolds J.A. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 6013–6015.

18. *Edelstein C., Scani A.M.* // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 5747–5754.
19. *Мишарин А.Ю., Медведева Н.В., Бушмакина Н.Г., Антонов И.В., Бушуева Т.Л.* // *Биоорганическая химия.* 1988. Т. 14. С. 1551–1556.
20. *Мишарин А.Ю., Замаева Н.Ю., Антонов И.В., Бушмакина Н.Г., Медведева Н.В., Морозкин А.Д.* // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. С. 773–780.
21. *Lindgren F.T.* // *Preparative Ultracentrifugation Labor Procedure and Suggestion for Lipoprotein Analysis* / Ed. E.C. Perkin. Amsterdam: Amer. Oil Chemists Soc., 1975. P. 204–224.
22. *Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L., Folbert N.E.* // *Anal. Biochem.* 1978. V. 87. P. 206–209.
23. *Satake K., Okuyama T.* // *J. Biochem. (Tokyo).* 1960. V. 47. P. 651–654.

Effect of Denaturing Agents, Ionic Strength, and 2-Chloroethanol on the Structure of Spin Labeled Apolipoprotein A-1 in Solution

N. V. Medvedeva and A. Yu. Misharin¹

Institute of Experimental Cardiology, Cardiological Scientific Center, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Tret'ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia

Abstract—Spin labeled derivatives of apolipoprotein A-1 from high density lipoproteins of human plasma were prepared by the action of 4-(2,4-dichloro-1,3,5-triazin-6-yl)amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl at pH 8.3 and 9.8. These preparations contained 2.3 ± 0.5 and 7.2 ± 1.0 of paramagnetic radicals per protein molecule, respectively. Their ESR spectra were essentially different, with the spectra of the second preparation indicating the intramolecular spin-spin and dipole-dipole interactions of radicals. In aqueous solutions of the derivatives, ionic strength, organic solvents, or denaturing agents affected the ESR spectra due to changes in the average degree of spin label immobilization and radical interaction. The existence of intramolecular hydrophobic contacts between the amphiphilic regions of the Apo A-1 polypeptide chain in aqueous solutions was thus suggested.

Key words: Apo A-1, Apo A-1 structure, spin label, ESR spectroscopy.

¹ To whom correspondence should be addressed.