

УДК 577.112.856:612.621/616.31
©Коллектив авторов

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОПРОТЕИНОВ И СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Л.М. Поляков, Д.В. Суменкова, Р.А. Князев, Л.Е. Панин*

Институт биохимии СО РАМН, ул. Академика Тимакова, 2, 630117 Новосибирск;
тел.: 8 (383) 3064257; эл. почта: plm@soramn.ru

Методами гель-фильтрации и тушения флуоресценции показано, что липопротеины плазмы крови связывают стероидные гормоны и могут выполнять роль их активной транспортной формы в организме. Наиболее высокое сродство к стероидам обнаружено для липопротеинов высокой плотности. Установлено, что при комплексообразовании липопротеин-стероид принимают участие белковые компоненты липопротеинов, одним из них является аполипопротеин А-I. Рассчитанные константы комплексообразования липопротеинов со стероидными гормонами свидетельствуют о специфичности связывания. Полученные результаты позволяют считать реальной возможность проникновения стероидных гормонов в клетку путём рецептор-опосредованного эндоцитоза в составе липопротеиновых комплексов.

Ключевые слова: липопротеины, аполипопротеины, стероидные гормоны.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время продолжается поиск и изучение макромолекул, связывающих гормоны и другие биологически активные соединения в надежде выявить специфические метаболические пути их доставки и попадания в клетки. Идентифицировано несколько плазменных белков, которые специфически или неспецифически связывают стероидные гормоны (транскортин, сексстероид-связывающий глобулин, альбумин). Одной из транспортных форм стероидов в организме могут являться липопротеины плазмы крови. Ранее нами было показано взаимодействие липопротеинов различных классов со стероидными гормонами, в частности, с кортизолом и кортикостероном [1, 2]. Имеются данные о связывании липопротеинов с липофильными дериватами эстрадиола, дегидроэпиандростерона и прегненолона [3-5]. Авторы отмечают, что эти гормоны повышают устойчивость липопротеинов к окислению.

Целью настоящей работы явилось изучение связывающей способности липопротеинов плазмы крови по отношению к тестостерону, прогестерону, прегненолону и тетрагидрокортизолу.

МЕТОДИКА. Выделение липопротеинов из плазмы крови человека проводили методом изоплотного ультрацентрифугирования в растворах KBr в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na₂ на центрифуге "Optima L-90K, Beckman-Coulter"

* - адресат для переписки

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОПРОТЕИНОВ И СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

(Австрия) с использованием углового ротора типа 70.1 Ti при 105000 g в течение 24 ч. Плотность плазмы крови довели путем последовательного добавления сухого KBr до необходимой плотности раствора в зависимости от выделяемой фракции липопротеинов [6]. Получали три основные фракции липопротеинов: липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП, $0,94 < d < 1,006$ г/мл), липопротеины низкой плотности (ЛПНП, $1,006 < d < 1,063$ г/мл) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП, $1,063 < d < 1,21$ г/мл).

Делипидирование липопротеинов проводили охлажденной смесью хлороформ-метанол (1:1) из расчета 20 мл смеси на 1 мл липопротеинов с последующей многократной отмывкой эфиром. Для получения аполипопротеина А-I (апоА-I) суммарные белки ЛПВП в растворе 3% Ds-Na и 0,1% меркаптоэтанола наносили на колонку (1,6×100 см) с Сефарозой 6B-CL ("Pharmacia", Швеция) и элюировали 5 мМ Трис-HCl буфером, pH 8,6, содержащим 6 М мочевины, 0,01% азид натрия и 1 мМ фенилметансульфонилфторид. Скорость потока - 10 мл/ч, скорость самописца - 9 мм/ч. Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе 2151 "LKB" (Швеция) при длине волны 280 нм. Проверку чистоты апоА-I осуществляли с помощью электрофореза в 10% ПААГ с Ds-Na [7]. Белковые полосы визуализировали 0,1% Кумасси G-250 в смеси метанола и 10% уксусной кислоты (1:1). В качестве маркеров использовали набор низкомолекулярных белков-стандартов (фосфоорилаза - 94 кДа, альбумин - 67 кДа, овальбумин - 43 кДа, карбоангидраза - 30 кДа и лактальбумин - 14,4 кДа).

Обессоливание апоА-I проводили методом гель-фильтрации (колонка: 40×0,8 см, Сефадекс G-25 ("Pharmacia", Швеция), элюент: 5мМ трис-HCl буфер, pH 7,4, содержащий 0,15 М NaCl, скорость элюции - 30 мл/ч, скорость самописца - 9 см/ч). Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе при длине волны 280 нм. Концентрация обессоленного белка составляла 0,1 мг/мл.

В работе использовали 1мМ растворы стероидных гормонов: тестостерон, прогестерон, прегненолон ("Serva", ФРГ) и тетрагидрокортизол, любезно предоставленный академиком РАМН Ю.А. Панковым (Институт экспериментальной эндокринологии РАМН). Взаимодействие триптофансодержащих белков липопротеиновых фракций со стероидами изучали на спектрофлуориметре MPF-4 "Хитачи" (Япония) при длине волны возбуждения 285 нм и эмиссии в диапазоне от 300 до 600 нм. Титрование проводили в термостатируемой кювете при температуре 20°C с добавлением аликвот стероидных гормонов (по 1 мкл) к 2 мл липопротеинов и к апоА-I. Расчет констант связывания осуществляли по методу Attalah и Lata [8]. Молекулярную массу ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП и апоА-I принимали за 2×10^5 , 1×10^5 , 5×10^5 и 28 кДа, соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Высокая специфичность и чувствительность флуоресцентных методов позволяет широко применять их для анализа взаимодействий типа "белок-лиганд". Из трех флуоресцирующих аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин) только триптофан дает наиболее богатую информацию о структуре макромолекулы. Считается, что триптофан является естественной "меткой-репортером", поэтому исследование параметров его флуоресценции дает представление о характере его микроокружения, его изменениях при определенных воздействиях, в частности, при образовании комплексов белок-стероид.

Изучение спектров флуоресценции разных классов липопротеинов показало, что они различаются по форме и по значениям длин волн максимумов. Класс ЛПВП имел самый короткий максимум - 333 нм, у ЛПНП этот показатель был сдвинут на 2 нм в красную область, а у ЛПОНП максимум флуоресценции составлял 338 нм. Интересно, что сам триптофан в водном растворе имел максимум флуоресценции 354 нм. Характерный коротковолновый сдвиг флуоресценции триптофанилов во фракциях липопротеинов можно объяснить особенностями микроокружения: полярного (водного) для раствора триптофана и неполярного (липидного) в структуре белкового компонента липопротеинов.

Анализ взаимодействия липопротеинов с изучаемыми стероидными гормонами показал, что наибольшее снижение флуоресценции было для частиц ЛПВП (50-65%). Менее выраженным данный эффект был для ЛПОНП (25-35%) и для ЛПНП (15-20%). Снижение флуоресценции можно расценивать как результат образования комплекса аполипопротеин–стероид, сопровождающийся изменением конформации белка в липопротеиновых частицах. При этом форма спектров, их полуширина практически не изменялись. Наблюдался слабый голубой сдвиг на 1-3 нм, что объясняется локальными конформационными перестройками белкового компонента липопротеинов после его взаимодействия с гормонами. Кроме того, выявленные различия позволяют предположить, что в частицах ЛПВП большая часть белка расположена на поверхности липопротеиновой частицы или вблизи неё. В частицах ЛПНП триптофансодержащие участки белковой молекулы погружены в липидный слой и отдалены от заряженных полярных групп фосфолипидов, что подтверждается другими исследованиями [9].

Изучение временной зависимости тушения флуоресценции при одномоментном добавлении насыщающих количеств стероидов показало, что, в целом, кривые для разных гормонов существенно не отличались между собой. Полное насыщение связывающих областей липопротеиновых частиц гормонами наблюдалось уже через 30 мин от начала опыта.

В частицах ЛПВП основным структурно-функциональным белком является апоА-I. В связи с этим мы изучали взаимодействие стероидных гормонов с выделенным из плазмы крови человека и хроматографически очищенным апоА-I. На рисунке 1 показана суммарная фракция белков ЛПВП, а также стадии хроматографической очистки апоА-I. АпоА-I мигрировал в геле одной полосой как гомогенный белок с молекулярной массой 28 кДа. На рисунке 2 приведены кривые тушения триптофановой флуоресценции апоА-I при взаимодействии с тетрагидрокортизолом и прегненолоном в молярном соотношении 1:2. Исследование показало, что добавление гормонов к раствору белка не отражалось на форме спектра и практически не изменяло его полуширины. Снижение флуоресценции составило 20% для прегненолона и 29% - для тетрагидрокортизола.

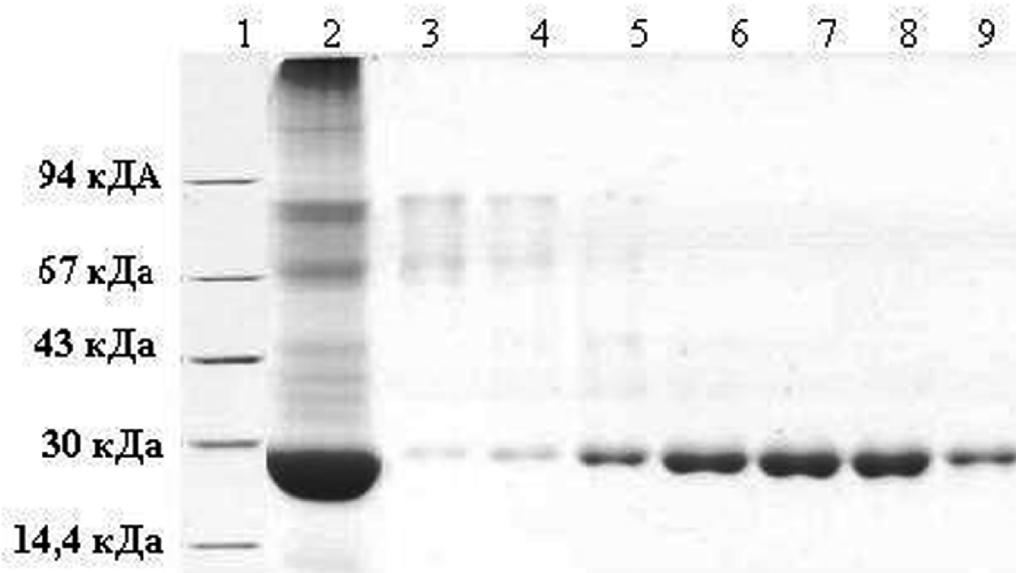


Рисунок 1.

Электрофореграмма хроматографической очистки аполипопротеина А-I.
1 - низкомолекулярные белки-стандарты; 2 - суммарные белки ЛПВП;
3 - 9 - стадии очистки апоА-I.

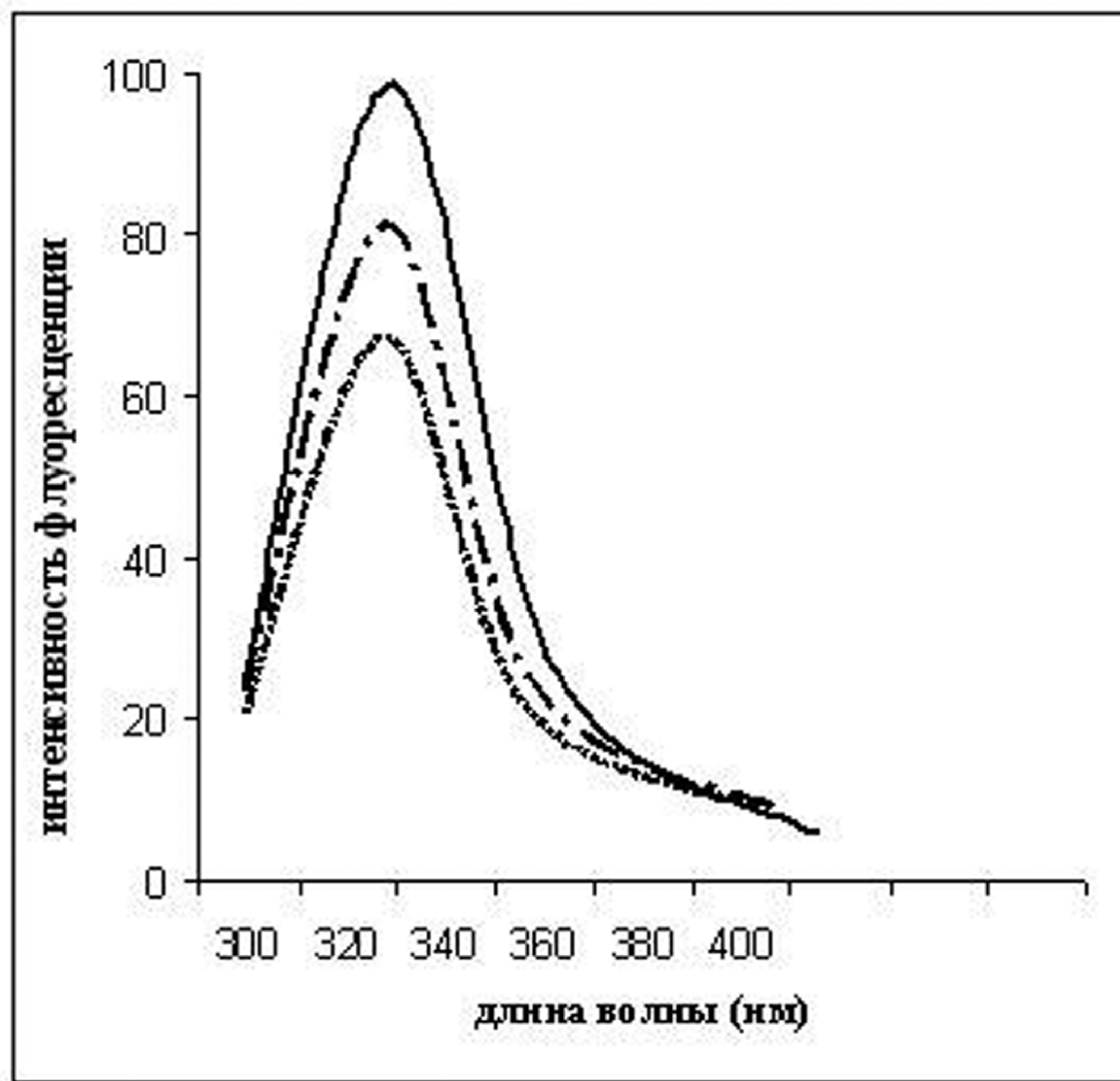


Рисунок 2.

Спектры триптофановой флуоресценции аполипопротеина А-I в комплексе со стероидными гормонами.

(—) - апоА-I (исходный спектр); (---) - апоА-I + тетрагидрокортисол (через 30 мин);
(—•—) - апоА-I + прегненолон (через 30 мин).

На основании кривых тушения флуоресценции при титровании рассчитывали константы ассоциации при взаимодействии стероидных гормонов с липопротеинами различных классов и с изолированным апоА-I (таблица). Связывание характеризуется достаточно высоким сродством, его можно даже назвать специфическим. Для сравнения укажем, что константа ассоциации с транскортином для широкого спектра кортикостероидов составляет $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [10], т.е. является величиной сопоставимой с полученными нами данными. Константа ассоциации комплексов апоА-I-стероид оказалась несколько ниже, чем для комплексов липопротеин-стероид. Это, по всей вероятности, обусловлено удалением липидов, которые необходимы для стабилизации конформационной структуры белка и придания ему свойств поверхностно-активного соединения.

Таблица. Константы ассоциации для комплексов липопротеин-стероид на основании результатов тушения флуоресценции триптофана ($\times 10^6 \text{ M}^{-1}$).

Стероиды	ЛПОНП	ЛПНП	ЛПВП	АпоА-I
Тестостерон	1,24	0,27	4,84	0,72
Прогестерон	0,67	0,64	4,47	0,57
Прегненолон	0,74	0,53	3,82	0,45
Тетрагидрокортизон	0,92	0,28	3,66	0,56

На рисунке 3 приведен график по результатам связывания меченого прегненолона изолированным апоА-I после серии разделений методом гель-фильтрации на сефадексе G-50. Инкубация апоА-I со 100-кратным избытком немеченого прегненолона почти на половину сокращала связывание метки, а в присутствии 1000-кратного избытка немеченого стероида, связывания меченого гормона практически не наблюдалось, что свидетельствует о насыщаемом характере связывания и его специфичности.

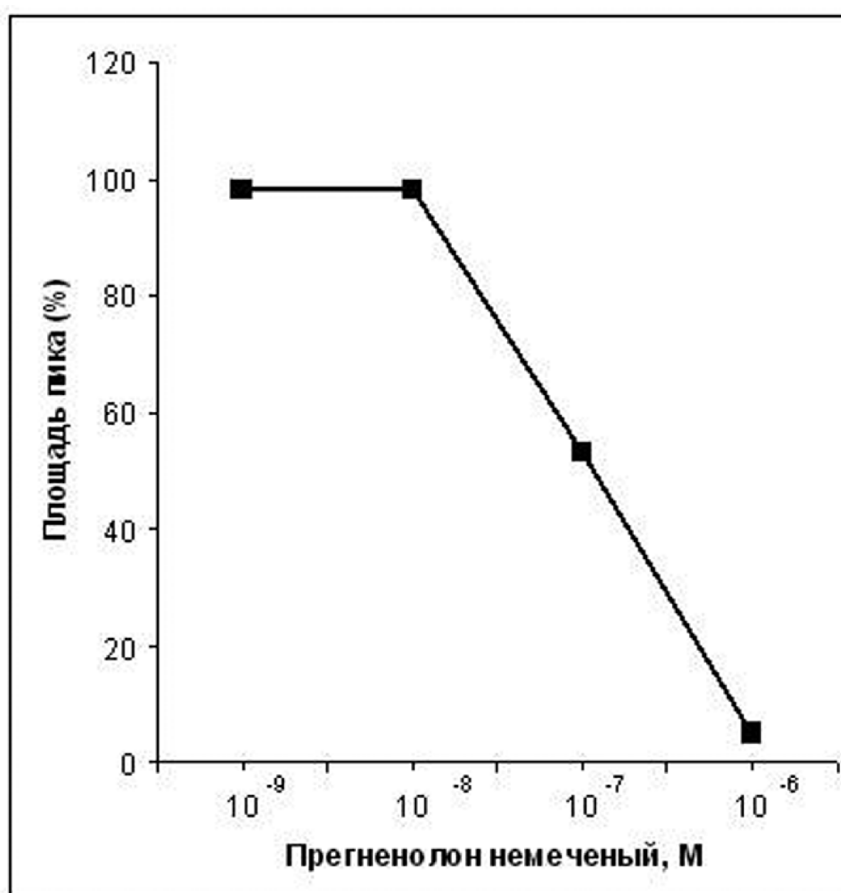


Рисунок 3.

Связывание меченого прегненолона изолированным апоА-I после серии разделений методом гель-фильтрации в присутствии 10-, 100- и 1000-кратного избытка немеченого прегненолона.

ВЫВОДЫ.

1. Методами хроматографии и флуориметрии показано, что липопротеины плазмы крови связывают стероидные гормоны (тестостерон, прогестерон, прегненолон, тетрагидрокортизол) и могут выполнять роль их транспортной формы в организме. Наиболее высокое сродство к стероидам обнаружено для липопротеинов высокой плотности.

2. Установлено, что при комплексообразовании липопротеин-стероид принимают участие белковые компоненты липопротеинов. Одним из основных аполипопротеинов, связывающих стероидные гормоны, является аполипопротеин А-I.

3. Рассчитанные константы комплексообразования липопротеинов и аполипопротеина А-I со стероидными гормонами свидетельствуют о специфичности связывания.

4. Полученные результаты позволяют считать реальной возможность проникновения стероидных гормонов в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза в составе липопротеиновых комплексов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Панин Л.Е., Биушкина Н.Г., Поляков Л.М. (1992) Бюлл. exper. биол. мед., **112**(7), 34–36.
2. Панин Л.Е., Поляков Л.М. (1989) Вопр. мед. химии, **34**(5), 56–58.
3. Khalil A., Fortin J.P., LeHoux J.G., Fulop T. (2000) J. Lipid Res., **41**, 1552–1556.
4. Meng Q.H., Hockerstedt A., Heinonen S., Wahala K., Adlercreutz H., Tikkanen M.J. (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1439**(3), 331–340.
5. Provost P.R., Lavalley B., Belanger A. (1997) Clin. Endocrinol. Metab., **82**(1), 182–187.
6. Hatch F.T., Less R.S. (1968) Adv. Lipid Res., **6**, 2–68.
7. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, 680–685.
8. Attallah N.A., Lata G.F. (1968) Biochim. Biophys. Acta, **168**, 321–333.
9. Dobretsov G.E., Spirin M.M., Chekrygin O.V. (1982) Biochim. Biophys. Acta, **710**, 172–180.
10. Юдаев Н.А., Афиногенова С.А., Крехова М.А. (1976) в: Биохимия гормонов и гормональной регуляции, “Наука”, М., сс.171–227.

Поступила: 24. 06. 2008.

THE ANALYSIS OF INTERACTION BETWEEN LIPOPROTEINS AND STEROID HORMONES

L.M. Polyakov, D.V. Sumenkova, R.A. Knyazev, L.E. Panin

Institute of Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Medical Science, Timakova street, 2, Novosibirsk, 630117 Russia; tel.: 8(383)3064257, e-mail: plm@soramn.ru

Using the methods of ultracentrifugation, gel-filtration and fluorescence quenching, we demonstrated, that plasma lipoproteins bind steroid hormones and can therefore play a role of their active transport form in an organism. High density lipoproteins have revealed the highest affinity to steroids for. It has been found, that protein component of lipoproteins takes part in the formation of lipoprotein-steroid complex. The apolipoprotein A-I, the main protein component of high density lipoproteins, is responsible for binding of steroid hormones. The calculated constants formation of the complexes of lipoproteins with steroid hormones testifies to specificity of linkage. The results obtained allow to considering real opportunity of transfer of steroid hormones into cell by a receptor-mediated endocytosis in structure of lipoproteins complexes.

Key words: lipoproteins, apolipoproteins, steroid hormones.