



УДК 577.112.856:577.175.534:543.422

## ВЛИЯНИЕ КОРТИЗОЛА И ТЕТРАГИДРОКОРТИЗОЛА НА ВТОРИЧНУЮ СТРУКТУРУ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I ПО ДАННЫМ ИНФРАКРАСНОЙ ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2021 г. А. Н. Дударев\*, А. Ю. Городецкая\*, Т. А. Ткаченко\*, И. Ф. Усынин\*.\*

\*Научно-исследовательский институт биохимии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Россия, 630117 Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Поступила в редакцию 20.11.2020 г.

После доработки 05.12.2020 г.

Принята к публикации 10.12.2020 г.

Изучены особенности взаимодействия стероидного гормона кортизола и его метаболита тетрагидрокортизола (ТГК) с двумя сывороточными белками человека – аполипопротеином А-I (апоА-I) и альбумином (ЧСА). С помощью метода тушения флуоресценции триптофана установлено, что константа связывания гормонов с белками возрастает в ряду комплексов: апоА-I–ТГК < ЧСА–ТГК < апоА-I–кортизол < ЧСА–кортизол. Полученные результаты подтверждают существующие представления о важной роли альбумина и апоА-I в транспорте активных форм стероидных гормонов. Однако использование инфракрасной Фурье-спектроскопии выявило наиболее выраженные и разнонаправленные изменения во вторичной структуре белков под влиянием неактивной формы гормона – ТГК. При инкубации апоА-I в присутствии ТГК наблюдалось дозозависимое снижение содержания  $\alpha$ -спиралей и увеличение содержания  $\beta$ -поворотов. В ЧСА под влиянием ТГК, напротив, количество  $\alpha$ -спиралей возрастало, а  $\beta$ -поворотов – снижалось. Подобные изменения обнаружены в структуре апоА-I под влиянием кортизола. Вторичная структура ЧСА в присутствии кортизола не изменялась. Предполагается, что конформационные изменения апоА-I под влиянием стероидных гормонов могут приводить к изменению акцепторных и регуляторных свойств данного белка.

*Ключевые слова:* аполипопротеин А-I, альбумин, кортизол, тетрагидрокортизол, конформация белка, инфракрасная Фурье-спектроскопия

DOI: 10.31857/S0132342321050237

### ВВЕДЕНИЕ

Липопротеины высокой плотности (ЛПВП), помимо участия в липидном обмене, оказывают регуляторное влияние на функции клеток различных органов и тканей организма. Так, митогенное действие ЛПВП продемонстрировано на культуре эндотелиальных [1], гладкомышечных [2] и опухолевых клеток [3]. В культуре гладкомышечных клеток ЛПВП усиливают клеточный рост, индуцированный эпидермальным фактором роста, фактором роста тромбоцитов и фактором роста фибробластов [4].

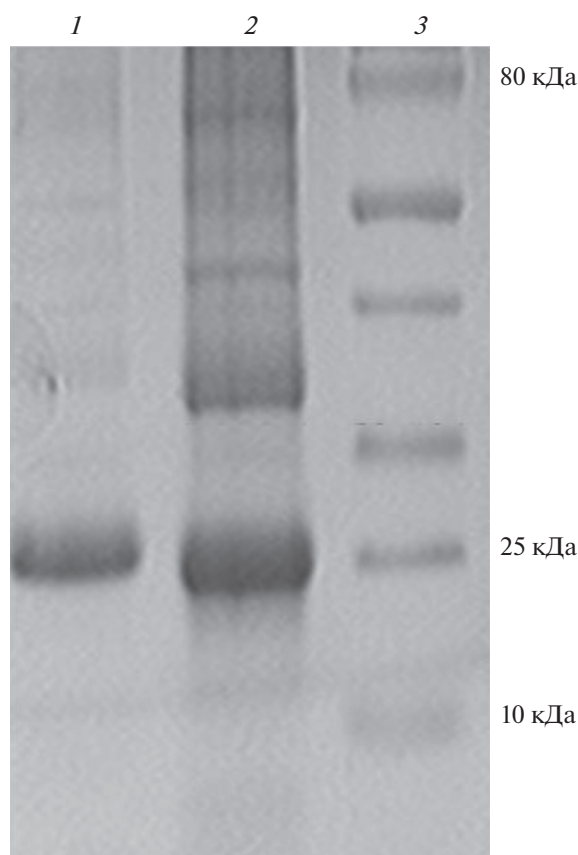
Регуляторные эффекты ЛПВП связывают с наличием на поверхности липопротеиновой частицы белкового компонента – аполипопротеина А-I

(апоА-I) [5]. АпоА-I – высококонсервативный белок, состоящий из амфипатических  $\alpha$ -спиралей [6]. Резкое увеличение уровня экспрессии плацентарного лактогена под влиянием апоА-I показано на клетках трофобластов человека [7]. В макрофагах апоА-I стимулирует синтез и секрецию простагландина E2 [8], а в первичной культуре клеток костного мозга активирует пролиферацию прогениторных клеток гранулоцитарного и моноцитарного ростка [9]. Взаимодействие апоА-I с АТФ-зависимым кассетным транспортером (ABCA1) на плазматической мембране фибробластов приводит к активации внутриклеточных сигнальных путей, включая Cdc42 [10].

Ранее нами было обнаружено, что апоА-I, выделенный из плазмы крови человека, стимулирует биосинтез белка в культуре гепатоцитов. Его стимулирующий эффект изменялся при взаимодействии со стероидными гормонами. Прединкубация апоА-I с кортизолом снижала стимулирующий эффект апоА-I, в то время как восстановленная форма кортизола – тетрагидрокортизол (ТГК) – усиливала эффект апоА-I [11]. Механизм

Сокращения: апоА-I – аполипопротеин А-I; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение; НС – неупорядоченная структура; ТГК – тетрагидрокортизол; ЧСА – сывороточный альбумин человека.

\* Автор для связи: (тел.: +7 (913) 461-43-78; +7 (383) 335-97-35; эл. почта: ivan.usynin@niibch.ru).



**Рис. 1.** Электрофоретический анализ в 10%-ном ПААГ очищенного апоА-I и суммарной фракции ЛПВП, выделенных из плазмы крови человека с помощью изоплотного ультрацентрифугирования в растворе КВг. Дорожки: 1 – апоА-I; 2 – ЛПВП; 3 – маркер масс белков (10–250 кДа).

обнаруженного явления остается неясным. Предполагается, что апоА-I выполняет роль переносчика гормонов в ядро клетки, где восстановленная форма гормона усиливает экспрессию генов с последующей активацией биосинтеза белка [12]. Однако не исключено, что взаимодействие апоА-I со стероидными гормонами, отличающимися по своей структуре, может сопровождаться конформационными перестройками, приводящими к изменению регуляторных свойств данного белка.

Цель данной работы – с помощью ИК-Фурье-спектроскопии изучить особенности изменения вторичной структуры апоА-I и сывороточного альбумина человека (ЧСА) под влиянием кортизола и его метаболита ТГК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ собственной флуоресценции белков широко используется для изучения механизмов связывания различных лигандов с белками [13–16]. Из трех флуоресцирующих аминокислот (трипто-

фан, тирозин, фенилаланин) наиболее выраженной флуоресценцией в ультрафиолетовой области спектра обладает триптофан, который обуславливает ~90% всей белковой флуоресценции. Флуоресцентные свойства триптофана крайне чувствительны к изменению его микроокружения. Поэтому комплексообразование с низкомолекулярными лигандами и макромолекулами сопровождается значительными изменениями спектра флуоресценции белков [13, 14].

С использованием метода тушения (снижения) флуоресценции триптофана [13] нами было исследовано взаимодействие стероидного гормона кортизола и его восстановленной формы ТГК с апоА-I. Для сравнения в аналогичных условиях анализировали взаимодействие стероидных гормонов с ЧСА. Как известно, аминокислотная цепь апоА-I (28 кДа) состоит из 234 остатков, включая четыре триптофановых остатка [17]. ЧСА (66.4 кДа) представляет собой глобулярный белок, состоящий из 585 а.о., включая один остаток триптофана (Trp214) [18]. В работе использовали коммерческий препарат ЧСА (Sigma, США). Для выделения нативного апоА-I применяли метод делипидирования свежесыведенных ЛПВП с помощью смеси бутанола и диизопропилового эфира [19]. Данный способ, в отличие от широко распространенного метода делипидирования плазменных липопротеинов с помощью смеси этанола и диэтилового эфира, позволяет избежать денатурации белка и, следовательно, сохранить в большей степени их исходную (нативную) структуру. Как видно из рис. 1, используемый нами метод позволяет получить гомогенный препарат апоА-I, очищенный от остальных белков, содержащихся в исходной фракции ЛПВП.

Анализ спектральных свойств показал, что исходные спектры флуоресценции апоА-I и ЧСА имеют максимумы при 336 и 333 нм соответственно (рис. 2). При регистрации спектров в присутствии возрастающих концентраций гормонов максимум спектра флуоресценции апоА-I не изменялся, в то время как спектр флуоресценции ЧСА сдвигался в коротковолновую область (рис. 2). Наблюдаемое снижение интенсивности флуоресценции белков в ответ на увеличение концентрации гормонов свидетельствует о формировании комплексов гормон–белок, что сопровождается конформационными изменениями белка [20]. В нашем случае наибольшее снижение флуоресценции триптофана обнаружено у обоих белков под влиянием кортизола.

Расчет констант связывания ( $K_b$ ) гормонов проводили с помощью уравнения Штерна–Фольмера:  $F_0/F = 1 - K_b [Q]$ . Для определения  $K_b$  измеряли интенсивность флуоресценции белка в отсутствие ( $F_0$ ) и в присутствии ( $F$ ) различных концентраций  $[Q]$  кортизола или ТГК, но при по-

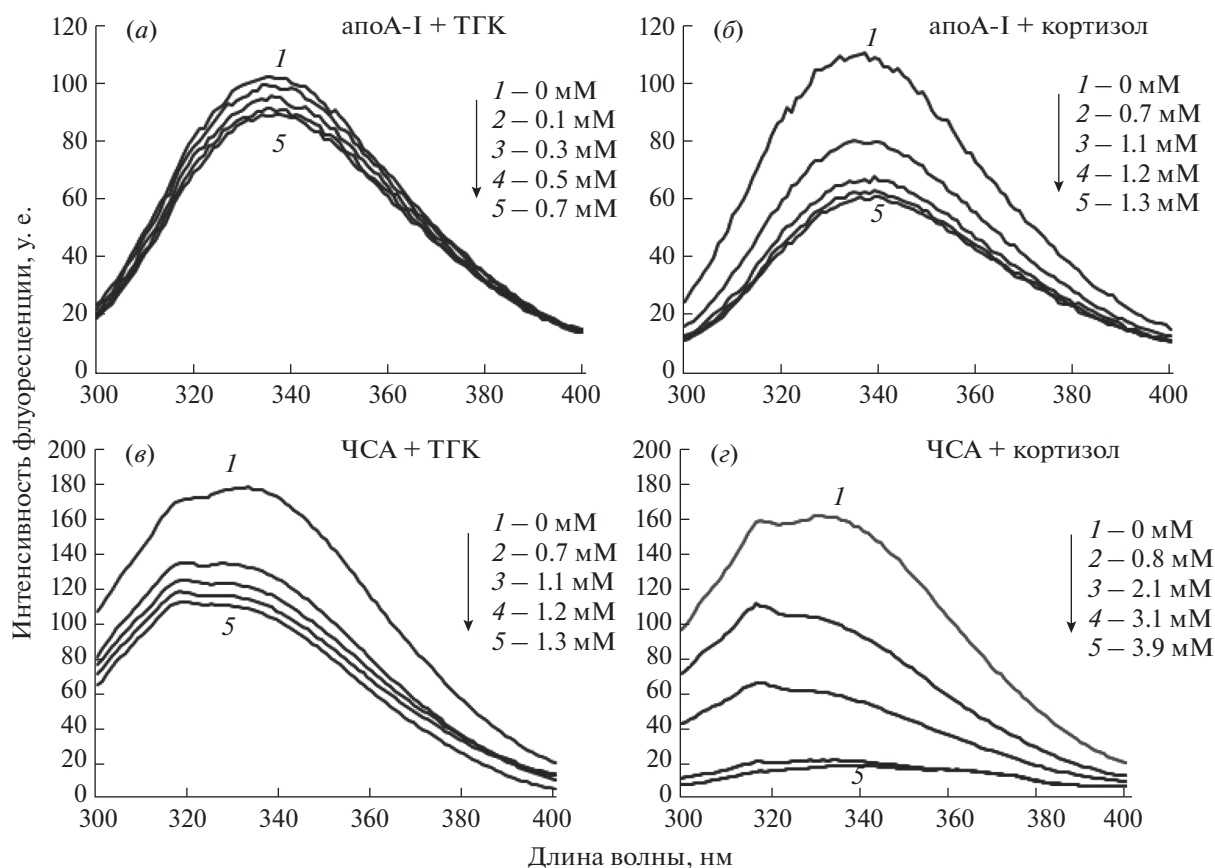


Рис. 2. Влияние ТГК (а, в) и кортизола (б, г) на собственную триптофановую флуоресценцию апоА-I (0.1 мг/мл) и ЧСА (0.1 мг/мл).

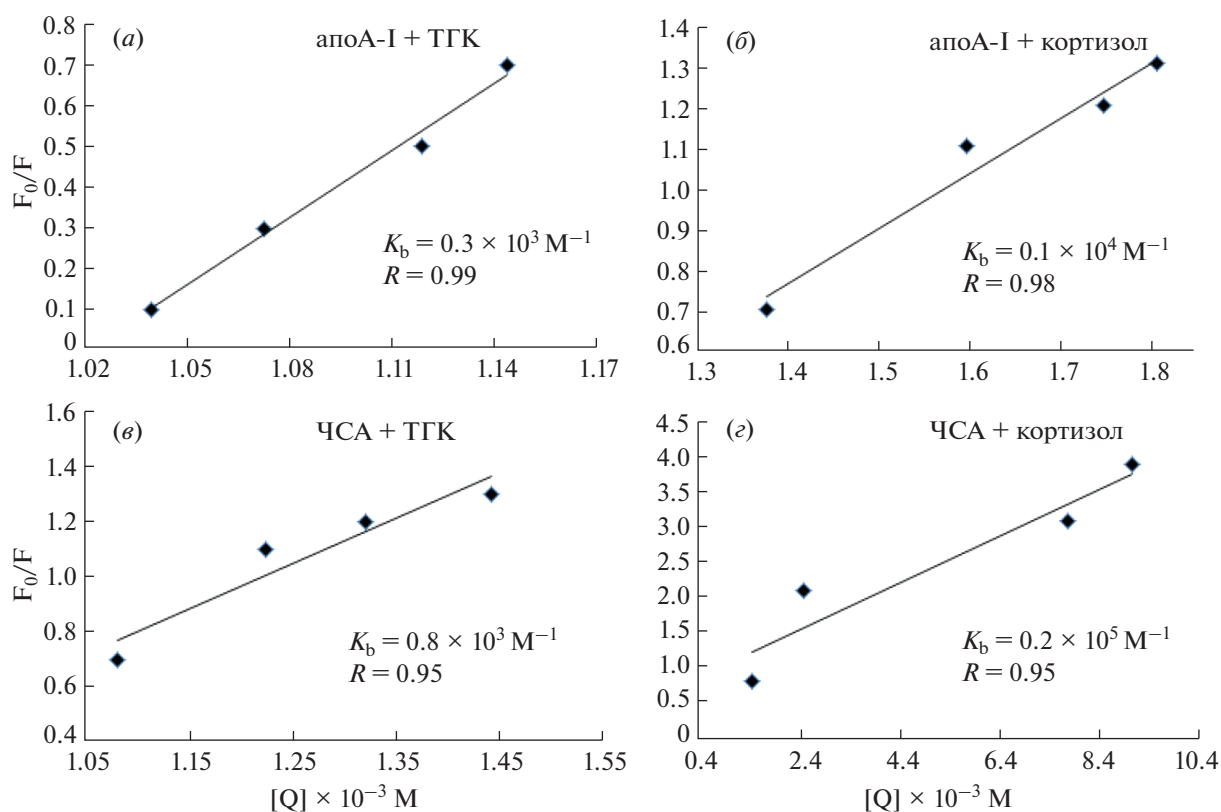
стоянной концентрации белка [13]. Прямолинейная зависимость в координатах Штерна–Фольмера указывает на существование в растворе одного типа флуорофоров, одинаково доступных для тушителя (рис. 3). На основании кривых тушения флуоресценции триптофана были рассчитаны константы связывания кортизола с апоА-I и ЧСА, которые составили  $(1.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  и  $(2.0 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  соответственно. В отличие от кортизола, его восстановленная форма вызывала менее выраженные изменения в спектрах обоих белков. Константа связывания ТГК с апоА-I составила  $(3.1 \pm 0.4) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ , а с ЧСА –  $(8.2 \pm 0.9) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ .

Различия, обнаруженные между влиянием гормонов на спектральные характеристики белков, можно объяснить разной способностью гормонов проникать во внутренние области белков. Незначительное снижение флуоресценции апоА-I под влиянием ТГК, вероятно, связано с тушением остатков триптофана преимущественно на поверхности данного белка и отражает неспособность данной формы гормона проникать во внутренние области белка. В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что констан-

та связывания гормонов с белками возрастает в ряду комплексов: апоА-I–ТГК < ЧСА–ТГК < апоА-I–кортизол < ЧСА–кортизол. Полученные результаты подтверждают существующие в литературе представления о важной роли альбумина [16] в транспорте активной формы стероидного гормона кортизола.

Как известно, взаимодействие лиганда с белком может сопровождаться конформационными изменениями последнего. Например, изменение вторичной структуры ЧСА в сторону снижения доли  $\alpha$ -спиралей зарегистрировано при его взаимодействии с тестостероном [21], дексаметазоном [19], прогестероном [22], тритерпеноидами [23] и противоопухолевым препаратом цисплатином [24]. Противоположные изменения в сторону увеличения доли  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев зарегистрировано при взаимодействии ЧСА с *транс*-ресвератролом [25]. Учитывая тот факт, что апоА-I выполняет не только транспортные [5], но и важные регуляторные функции [9, 10], нами было исследовано влияние кортизола и ТГК на вторичную структуру апоА-I.

Анализ соотношения элементов вторичной структуры белка проводили с помощью метода



**Рис. 3.** Графики Штерна–Фольмера для концентрационного тушения триптофановой флуоресценции апоА-I (а, б) и ЧСА (е, з) добавлением различных концентраций кортизола (б, з) и ТКГ (а, е). По оси ординат – отношение максимальной флуоресценции белка в отсутствие лиганда  $[F_0]$  к интенсивности флуоресценции белка после добавления лиганда  $[F]$ . По оси абсцисс – концентрация лигандов  $[Q]$ .  $R$  – коэффициент корреляции Пирсона.

ИК-Фурье-спектроскопии в области спектра амид I ( $1600\text{--}1700 \text{ см}^{-1}$ ). Данная область спектра – наиболее информативна и чувствительна к изменениям конформации полипептида за счет вклада валентных колебаний связей  $\text{C}=\text{O}$  [26, 27]. При анализе полосы амид I с помощью метода нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) использовали следующие интервалы положения пиков второй производной:  $\alpha$ -спирали – от  $1660$  до  $1649 \text{ см}^{-1}$ ,  $\beta$ -слои – от  $1695$  до  $1680 \text{ см}^{-1}$  и  $1637\text{--}1614 \text{ см}^{-1}$ ,  $\beta$ -повороты – от  $1679$  до  $1675 \text{ см}^{-1}$  и от  $1674$  до  $1664 \text{ см}^{-1}$ , неупорядоченные структуры – от  $1648$  до  $1638 \text{ см}^{-1}$  [25, 28].

Одно из ограничений данного метода – сильное поглощение воды в области спектра амид I. Использование тяжелой воды ( $\text{D}_2\text{O}$ ) вместо  $\text{H}_2\text{O}$  позволяет предотвратить вклад растворителя в спектр белка, однако не решает проблему полностью, поскольку  $\text{D}_2\text{O}$  может оказывать влияние на нативную структуру белка [29]. В последние годы получил широкое распространение метод НПВО, позволяющий снизить до минимума влияние растворителя на измерение спектра белков [30]. Кроме того, современные приборы за счет высокой чувствительности позволяют вычитать

вклад растворителя в спектр белка. Проведенное нами сравнение спектров раствора ЧСА, приготовленного на  $\text{D}_2\text{O}$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , не выявило значительных различий между этими образцами по соотношению элементов вторичной структуры ЧСА (табл. 1). Учитывая данный факт, все дальнейшие исследования были проведены с водными растворами белков, содержащими фосфатный буфер (рН 7.4).

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, вторичная структура ЧСА содержит  $\alpha$ -спирали (68.8%),  $\beta$ -слои (7.3%),  $\beta$ -повороты (2.1%) и неупорядоченные структуры (21.8%) [31]. Однако данные о соотношении элементов вторичной структуры белков, полученные с помощью ИК-спектроскопии, могут существенно отличаться от этих значений. Так, количество  $\alpha$ -спиралей в структуре альбумина, по данным разных авторов, колеблется от 47 до 70% [32]. Эти противоречия, вероятно, связаны с особенностями используемых в разных лабораториях методов регистрации и анализа ИК-спектров. Кроме того, результаты анализа вторичной структуры в значительной степени зависят от исходной конформации ис-

**Таблица 1.** Содержание элементов вторичной структуры ЧСА (7.5 мг/мл) в растворе дейтерия (D<sub>2</sub>O) и воды (H<sub>2</sub>O) по данным ИК-Фурье-спектроскопии

Растворитель	Соотношение элементов вторичной структуры ЧСА, %			
	$\alpha$ -спирали	$\beta$ -слои	$\beta$ -повороты	неупорядоченные структуры
D <sub>2</sub> O	52 ± 3	16 ± 3	15 ± 2	17 ± 3
H <sub>2</sub> O	48 ± 2	20 ± 3	12 ± 2	20 ± 3

**Таблица 2.** Влияние кортизола на содержание элементов вторичной структуры ЧСА и апоА-I по данным ИК-Фурье-спектроскопии

Элементы вторичной структуры белка	Содержание элементов вторичной структуры белка, %							
	ЧСА				апоА-I			
	Концентрация кортизола, М				Концентрация кортизола, М			
	0 (контроль)	5 × 10 <sup>-8</sup>	5 × 10 <sup>-7</sup>	5 × 10 <sup>-6</sup>	0 (контроль)	5 × 10 <sup>-8</sup>	5 × 10 <sup>-7</sup>	5 × 10 <sup>-6</sup>
$\alpha$ -Спираль	47 ± 2	49 ± 3	49 ± 2	50 ± 4	45 ± 2	50 ± 4	49 ± 2	53 ± 3*
$\beta$ -Слой	21 ± 1	22 ± 2	20 ± 2	18 ± 3	14 ± 3	17 ± 2	14 ± 2	13 ± 3
$\beta$ -Повороты	10 ± 2	11 ± 2	8 ± 4	13 ± 2	21 ± 3	21 ± 2	19 ± 3	15 ± 2*
Неупорядоченные структуры	22 ± 2	18 ± 3	23 ± 2	19 ± 2	20 ± 3	12 ± 4	18 ± 1	19 ± 3

\* Статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем ( $p < 0.05$ ).

пользуемых белков, концентрации и способа их подготовки для анализа.

Проведенный нами анализ водного раствора ЧСА (Sigma, США) с помощью ИК-Фурье-спектроскопии выявил следующее соотношение элементов вторичной структуры:  $\alpha$ -спирали – 47 ± 2%,  $\beta$ -слои – 21 ± 1%,  $\beta$ -повороты – 10 ± 2%, неупорядоченные структуры – 22 ± 2% (табл. 2). Подобная доля  $\alpha$ -спиральных участков и неупорядоченных структур обнаружена в структуре апоА-I. Однако у апоА-I, по сравнению с ЧСА, содержание  $\beta$ -слоев было в 1.5 раза меньше, а  $\beta$ -повороты – в 2.1 раза больше (табл. 2).

Для изучения влияния гормонов на структуру белков использовали аликвоты белков, приготовленные на фосфатном буфере (рН 7.4). Раствор белка (7.5 мг/мл) инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в присутствии стероидных гормонов в конечной концентрации 5 × 10<sup>-8</sup>, 5 × 10<sup>-7</sup> и 5 × 10<sup>-6</sup> М. Контрольные пробы инкубировали параллельно в присутствии соответствующей концентрации растворителя. Для количественного определения соотношения элементов вторичной структуры белка на алмазный кристалл ИК-спектрометра наносили 20 мкл полученной смеси и проводили запись ИК-спектра.

При инкубации апоА-I в присутствии 5 × 10<sup>-6</sup> М кортизола наблюдалось увеличение доли  $\alpha$ -спи-

ралей на 8% ( $p < 0.05$ ) и снижение доли  $\beta$ -поворотов на 6% ( $p < 0.05$ ) (табл. 2). ТГК, в отличие от кортизола, вызывал в структуре апоА-I увеличение доли  $\beta$ -поворотов на 7% ( $p < 0.05$ ) за счет уменьшения доли  $\alpha$ -спиральных участков на 9% ( $p < 0.05$ ) (табл. 3). При этом доля  $\beta$ -слоев и неупорядоченных структур в апоА-I практически не изменялась под влиянием как кортизола, так и ТГК. При инкубации ЧСА в присутствии 5 × 10<sup>-6</sup> М ТГК (табл. 3) наблюдалось увеличение доли  $\alpha$ -спиралей на 10% ( $p < 0.05$ ) и снижение доли  $\beta$ -поворотов на 5%. Однако не обнаружено статистически значимых изменений в структуре ЧСА при его инкубации в присутствии всех исследуемых концентраций кортизола, а также в структуре апоА-I в присутствии 5 × 10<sup>-8</sup> и 5 × 10<sup>-7</sup> М кортизола (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленных изменениях в структуре апоА-I под влиянием кортизола и его восстановленной формы – ТГК. Возрастание доли  $\alpha$ -спиральных участков характерно для комплексов апоА-I–кортизол и ЧСА–ТГК, в то время как снижение доли этих структур – только для комплекса апоА-I–ТГК. Учитывая существующие представления о механизмах образования вторичной структуры белка [33], можно предположить, что наблюдаемое увеличение доли  $\beta$ -структур в апоА-I под действием ТГК приводит к функциональной стабилизации белка.

**Таблица 3.** Влияние ТГК на содержание элементов вторичной структуры ЧСА и апоА-I по данным ИК-Фурье-спектроскопии

Элементы вторичной структуры белка	Содержание элементов вторичной структуры белка, %							
	ЧСА				апоА-I			
	Концентрация ТГК, М				Концентрация ТГК, М			
	0 (контроль)	$5 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-6}$	0 (контроль)	$5 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-6}$
$\alpha$ -Спирали	48 ± 2	52 ± 3	51 ± 3	58 ± 3*	46 ± 2	40 ± 3	38 ± 3	37 ± 3*
$\beta$ -Слой	20 ± 2	18 ± 4	21 ± 2	17 ± 3	16 ± 3	22 ± 3	24 ± 3	21 ± 2
$\beta$ -Повороты	12 ± 2	13 ± 3	11 ± 3	7 ± 3*	20 ± 3	23 ± 2	24 ± 3	27 ± 2*
Неупорядоченные структуры	20 ± 3	17 ± 3	17 ± 2	18 ± 2	18 ± 2	15 ± 4	14 ± 2	15 ± 3

\* Статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем ( $p < 0.05$ ).

Механизм взаимодействия исследованных нами гормонов с апоА-I остается неизученным. Предполагается, что связывание стероидных гормонов с белками происходит с участием водородных связей между атомами белка и полярными группами гормона, а также с помощью гидрофобных и гидрофильных связей [21].

Как видно из представленных на рис. 4 данных, наиболее выраженное влияние на область амид I обоих белков оказывает ТГК. При этом его влияние на структуру ЧСА имеет характер компактизации (увеличение доли  $\alpha$ -спиралей), в то время как на апоА-I – характер декомпактизации (увеличение доли  $\beta$ -поворотов). Как известно,  $\beta$ -повороты участвуют в формировании механизмов молекулярного распознавания, белок-белковых и белок-нуклеиновых взаимодействий [34]. Исследования, выполненные на моделях пептидов с точечными аминокислотными заменами, показали, что в процессе фолдинга и рефолдинга  $\beta$ -повороты активно содействуют правильному сворачиванию белка за счет сближения фланкирующих регионов аминокислотных участков белковой глобулы [35]. При удалении центрального  $\beta$ -поворота белки теряют способность взаимодействовать с лигандом [36]. На долю  $\beta$ -поворотов в поверхностном слое глобулярного белка может приходиться до 30% [37]. АпоА-I относится к белкам со средним уровнем глобулярности [38]. По данным ИК-Фурье-спектроскопии, в составе апопротеинов липопротеинов высокой плотности содержится ~32%  $\beta$ -поворотов [28]. АпоА-I, в отличие от альбумина, обладает большей липофильностью и относительно высокой конформационной лабильностью [38].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что апоА-I не вносит существенный вклад в транспорт ТГК, но при его взаимодействии с этим метаболитом внутриклеточно или в биологических жидкостях может происходить измене-

ние конформации апоА-I. Ранее нами было обнаружено, что взаимодействие ТГК с апоА-I усиливает стимулирующий эффект апоА-I на биосинтез белка в культуре гепатоцитов [11]. Можно предположить, что появление гидроксильной группы в кольце А в процессе биотрансформации кортизола в ТГК оказывает значительное влияние на взаимодействие ТГК с аминокислотными остатками, что, в свою очередь, приводит к изменению вторичной структуры и регуляторных свойств апоА-I. Следует заметить, что биотрансформация кортизола в ТГК, а также поглощение и ресекреция апоА-I в окружающую среду наиболее активно протекают в одной и той же клетке – макрофаге. Кроме того, макрофаги способны сами синтезировать [39] и, вероятно, секретируют данный белок, обладающий важными регуляторными свойствами [11].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В работе использовали ЧСА (код А4327; Sigma, США), диизопропиловый эфир (Sigma, США), кортизол (Serva, Германия), ТГК (Research Plus Inc., США), ДМСО (Panreac, Испания). Остальные реактивы имели категорию о.с.ч. или х.ч.

**Выделение апоА-I.** Липопротеины выделяли из плазмы крови человека методом изоплотностного ультрацентрифугирования в растворе КВг в присутствии 3 мМ ЭДТА- $\text{Na}_2$  на центрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США) с использованием углового ротора 70.1 Ti при 105000 g [40]. Полученную фракцию ЛПВП диализовали против фосфатно-солевого буфера (PBS) при 4°C в течение 24 ч. Для получения нативного апоА-I проводили делипидирование ЛПВП в неденатурирующих условиях смесью бутанола и диизопропилового эфира [17]. Очистку апоА-I осуществляли методом высаливания сульфатом ам-

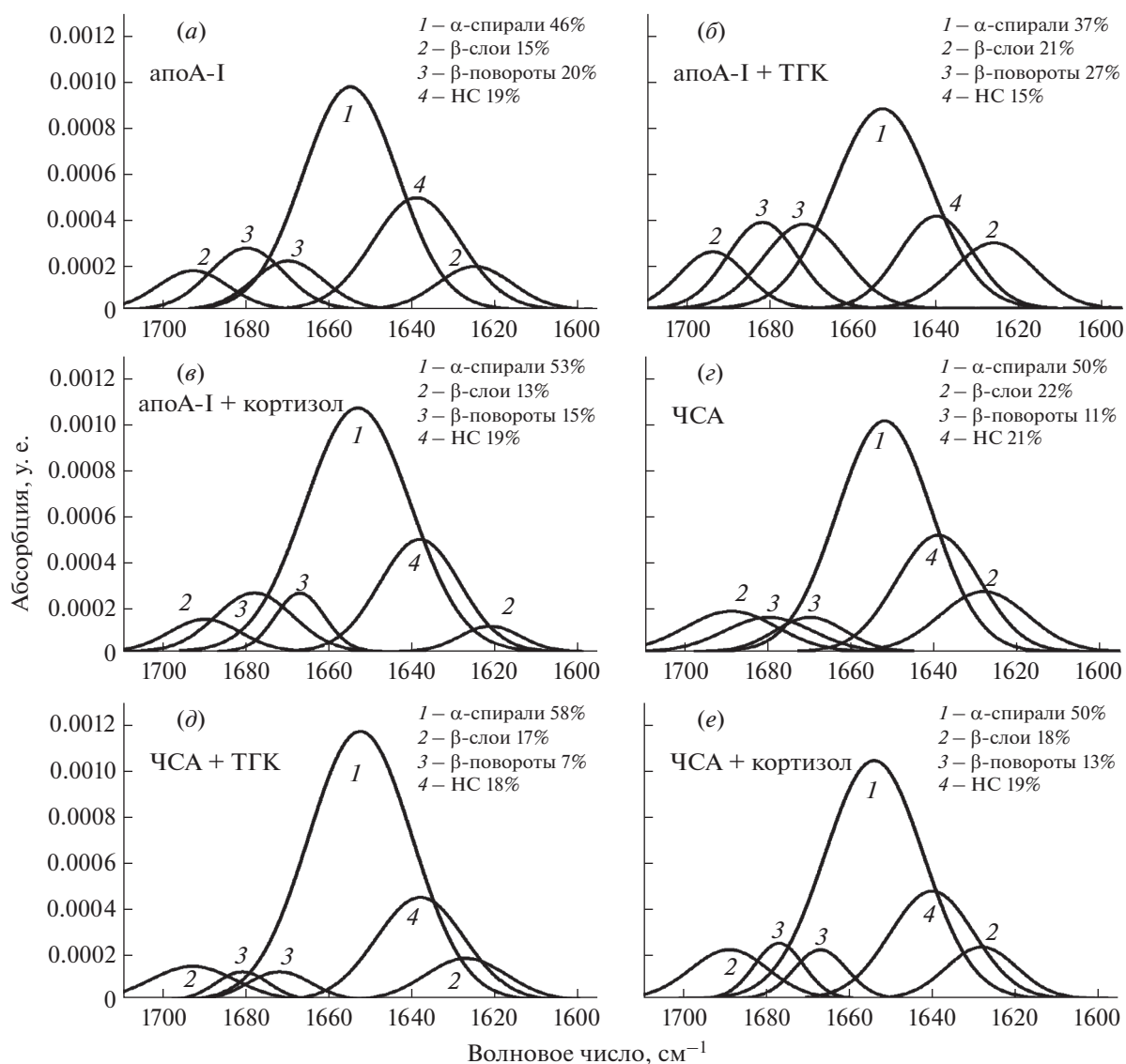


Рис. 4. Разложение полосы амид I по гауссовым компонентам для апоА-I (а), ЧСА (г), а также их комплексов с  $5 \times 10^{-6}$  М ТГК (б, д) и  $5 \times 10^{-6}$  М кортизолом (в, е). НС – неупорядоченные структуры.

мония с последующим растворением белка в 6 М мочеvine и его ренатурацией с помощью диализа против PBS (pH 7.4) в течение 24 ч [41]. Чистоту выделенного апоА-I проверяли с помощью электрофореза в ПААГ, используя набор белковых маркеров, содержащих высокоочищенные рекомбинантные белки с молекулярной массой 10–250 кДа (СибЭнзим, Россия). Концентрацию белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

**Флуоресцентный анализ.** Константы связывания гормонов с апоА-I и ЧСА определяли методом тушения флуоресценции триптофана [13]. Для этой цели измеряли интенсивность флуоресценции раствора белка в отсутствие и в присут-

ствии возрастающих концентраций гормонов, выступающих в качестве тушителей флуоресценции. Титрование проводили в термостатируемой (37°C) кварцевой кювете, содержащей 100 мкг белка в 1 мл PBS (pH 7.4). После добавления каждой аликвоты гормона к раствору белка содержимое кюветы интенсивно перемешивали и проводили измерение в течение 3 мин. Флуоресценцию триптофановых остатков белка регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301 (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 280 нм и испускания (эмиссии) в диапазоне 300–500 нм. Стоковые растворы гормонов готовили в смеси спирта и ДМСО (в соотношении 1 : 1). Максимальная концентрация растворителя в растворах, содержащих белок и гормон, при проведении

флуоресцентного анализа не превышала 5%. Вклад растворителя без гормона в интенсивность флуоресценции составлял не более 1.5% и не изменялся в исследуемом диапазоне волн 300–500 нм.

**Инфракрасная спектроскопия.** Влияние гормонов на вторичную структуру апоА-I и ЧСА исследовали методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) [42] с использованием приставки Smart Orbit на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Scientific, США). Для этого аликвоты белка (7.5 мг/мл) в PBS (рН 7.4) инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в отсутствие или в присутствии стероидных гормонов в конечной концентрации  $5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  и  $5 \times 10^{-6}$  М. Для количественного определения соотношения элементов вторичной структуры белка на алмазный кристалл приставки Smart Orbit наносили 20 мкл смеси. Спектры регистрировали по 7 раз в диапазоне частот 4000–900  $\text{см}^{-1}$ , 250 сканирований с разрешением 4  $\text{см}^{-1}$ . Оптические пути прибора постоянно продували сухим воздухом для удаления паров воды. После вычитания из спектра белка спектра буфера, содержащего соответствующую концентрацию гормона или растворителя, проводили разложение области спектра амид I в диапазоне длин волн 1700–1600  $\text{см}^{-1}$ , используя методы Фурье-деконволюции и второй производной [28]. Обработку спектров проводили с помощью программы OMNIC, поставляемой с прибором. Разложение спектров на индивидуальные полосы по Гауссу выполняли с использованием программного обеспечения Origin 9.0 [43]. Исследования проведены на оборудовании ЦКП “Спектрометрические измерения” НИИ биохимии, ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (Новосибирск, Россия).

**Статистический анализ.** Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых экспериментов, выполненных в трех параллелях. Различия между выборками оценивали с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни и считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время получено много фактов, свидетельствующих об участии апоА-I не только в транспорте холестерина, но и в регуляции внутриклеточных сигнальных путей, с которыми связаны его антиатерогенные, противовоспалительные и антиоксидантные свойства [10]. Ранее нами было показано, что регуляторные эффекты апоА-I зависят от конформационного состояния белка. В данной работе было исследовано влияние биологически активного гормона кортизола и его неактивного метаболита ТГК на вторичную структуру

апоА-I. Для сравнения в аналогичных условиях было исследовано взаимодействие стероидных гормонов с ЧСА. С помощью метода тушения флуоресценции триптофана установлено, что наиболее высокую константу связывания имеют комплексы ЧСА–кортизол и апоА-I–кортизол. Полученные результаты подтверждают существующие представления о важной роли альбумина и апоА-I в транспорте активных форм стероидных гормонов. Однако использование ИК-Фурье-спектроскопии выявило наиболее выраженные и разнонаправленные изменения во вторичной структуре белков под влиянием неактивной формы кортизола – ТГК. При инкубации апоА-I в присутствии ТГК наблюдалось дозозависимое снижение содержания  $\alpha$ -спиралей и увеличение содержания  $\beta$ -поворотов. В ЧСА под влиянием ТГК, напротив, количество  $\alpha$ -спиралей возрастало, а  $\beta$ -поворотов – снижалось. Подобные изменения обнаружены в структуре апоА-I под влиянием кортизола. Механизмы взаимодействия исследованных нами гормонов с апоА-I остаются неизученными. Однако можно предположить, что конформационные изменения апоА-I, возникающие в процессе образования комплексов апоА-I со стероидными гормонами и их метаболитами, могут приводить к изменению акцепторных и регуляторных свойств данного белка.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 0535-2019-0030).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gospodarowicz D., Massoglia S., Cheng J., Fujii D.K.* // J. Cell. Physiol. 1986. V. 127. P. 121–136. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041270116>
2. *Nofer J.R., Junker R., Pulawski E., Fobker M., Levkau B., Von Eckardstein A., Seedorf U., Assmann G., Walter M.* // J. Thromb. Haemost. 2001. V. 85. P. 730–735. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615660>
3. *Favre G., Tazi K.A., Le Gaillard F., Bennis F., Hachem H., Soula G.* // J. Lipid Res. 1993. V. 34. P. 1093–1106. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37696-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37696-3)
4. *Libby P., Miao P., Ordovas J.M., Schaffer E.J.* // J. Cell. Physiol. 1985. V. 124. P. 1–8. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041240102>



5. Gordon S.M., Hofmann S., Askew D.S., Davidson W.S. // Trends Endocrin. Met. 2011. V. 22. P. 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.001>
6. Collet X., Marcel Y.L., Tremblay N., Lazure C., Milne R.W., Perret B., Weech P.K. // J. Lipid Res. 1997, V. 38. P. 634–644. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37231-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37231-X)
7. Handwerger S., Myers S., Richards R., Richardson B., Turzai L., Moeyskins C., Meyer T., Anantharamahiah G.M. // Endocrinology. 1995. V. 136. P. 5555–5560. <https://doi.org/10.1210/en.136.12.5555>
8. Zhou X., Von Eckardstein A. // J. Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. 2002. V. 22. P. 270–272. <https://doi.org/10.1007/BF02896760>
9. Усынин И.Ф., Дударев А.Н., Городецкая А.Ю., Мирошниченко С.М., Ткаченко Т.А., Ткаченко В.И. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2017. Т. 164. № 9. С. 285–288.
10. Nofer J.R. // Handb. Exp. Pharmacol. 2015. V. 224. P. 229–256. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0_6)
11. Усынин И.Ф., Панин Л.Е. // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 453–468.
12. Панин Л.Е., Тузииков Ф.В., Тузикова Н.А., Усынин И.Ф., Гимаутдинова О.И. // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. С. 114–119. [Panin L.E., Tuzikov F.V., Tuzikova N.A., Usynin I.F., Gimautdinova O.I. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2001. V. 27. P. 95–100.] <https://doi.org/10.1023/A:1011381019423>
13. Lakowicz J.R. // Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed. Springer, Boston, MA, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
14. Кудряшова Е.В., Гладилин А.К., Левашов А.В. // Усп. биол. химии. 2002. Т. 42. С. 257–294.
15. Stroupe S.D., Cheng Su-Li, Westphal U. // Arch. Biochem. Biophys. 1975. V. 168. P. 473–482.
16. Поляков Л.М., Суменкова Д.В., Князев Р.А., Панин Л.Е. // Биомед. химия. 2011. Т. 57. С. 308–313. <https://doi.org/10.18097/pbmc20115703308>
17. Gursky O., Atkinson D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 2991–2995. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.2991>
18. Белинская Д.А., Гончаров Н.В. // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 247–260. [Belinskaja D.A., Goncharov N.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 287–298.] <https://doi.org/10.31857/S0132342320030045>
19. Cham B.E., Knowles B.R. // J. Lipid. Res. 1976. V. 17. P. 176–181. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37003-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37003-6)
20. Naik P.N., Chimatar S.A., Nandibewoor S.T. // J. Photochem. Photobiol. B. 2010. V. 100. P. 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.05.014>
21. Chanphai P., Vesper A.R., Bariyanga J., Bérubé G., Tajmir-Riahi H.A. // J. Photochem. Photobiol. B. 2016. V. 161. P. 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.05.015>
22. Abu Teir M.M., Ghithan J.H., Darwish S.M., Abu-Hadi M.M. // J. Appl. Biol. Sci. 2011. V. 5. P. 35–47.
23. Abboud R., Charcosset C., Greige-Gerges H. // Chem. Phys. Lipids. 2017. V. 207. P. 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.05.011>
24. Neault J.F., Tajmir-Riahi H.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1384. P. 153–159. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(98\)00011-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(98)00011-9)
25. Liu X., Shang Y., Ren X., Li H. // J. Chem. 2013. V. 2013. P. 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/494706>
26. Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S. // Nat. Protoc. 2015. V. 10. P. 382–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>
27. Abrosimova K.V., Shulenina O.V., Paston S.V. // J. Phys. Conf. Ser. 2016. V. 769. P. 1–6. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/769/1/012016>
28. Krilov D., Balarin M., Kosovic M., Gamulin O., Brnjas-Kraljevic J. // Spectrochim. Acta A. 2009. V. 73. P. 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.03.015>
29. Cioni P., Strambini G.B. // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 3246–3253. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75666-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75666-X)
30. Поляничко А.М., Романов Н.М., Старкова Т.Ю., Костылева Е.И., Чихиржина Е.В. // Цитология. 2014. Т. 56. № 4. С. 316–322.
31. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. // Protein Eng. Des. Sel. 1999. V. 12. P. 439–444. <https://doi.org/10.1093/protein/12.6.439>
32. Усольцев Д.А., Ситникова В.Е., Носенко Т.Н., Олехнович Р.О., Успенская М.В. // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2019. Т. 19. С. 586–593. <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2019-19-4-586-593>
33. Бычкова В.Е., Семисотнов Г.В., Балобанов В.А., Финкельштейн А.В. // Усп. биол. химии. 2018. Т. 58. С. 67–100.
34. Zhou H.X., Hoess R.H., DeGrado W.F. // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. P. 446–451. <https://doi.org/10.1038/nsb0596-446>
35. Predki P.F., Agrawal V., Brunger A.T., Regan L. // Nat. Struct. Biol. 1996. P. 54–58. <https://doi.org/10.1038/nsb0196-54>
36. Marcelino A.M.C., Gierasch L.M. // Biopolymers. 2008. V. 89. P. 380–391. <https://doi.org/10.1002/bip.20960>
37. Kong J., Shaoning Y.U. // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2007. V. 39. P. 549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
38. Мишаарин А.Ю. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 563–585. [Misharin A.Yu. // Russ. J. Bioorg. Chem. 1998. V. 24. P. 497–517.]
39. Mogilenko D.A., Orlov S.V., Trulioff A.S., Ivanov A.V., Nagumanov V.K., Kudriavtsev I.V., Shavva V.S., Tanyanskiy D.A., Perevozchikov A.P. // FASEB J. 2012. V. 26. P. 2019–2030. <https://doi.org/10.1096/fj.11-193946>
40. Mills G.L., Lane P.A., Weech P.K. // Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. A Guidebook to Lipoprotein Technique. Amsterdam: Elsevier, 1984. P. 18–116.
41. Jiang L., Hea L., Fountoulakis M. // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1023. P. 317–320. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.029>
42. Oberg K.A., Fink A.L. // Anal. Biochem. 1998. V. 256. P. 92–106. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2486>
43. Чихиржина Т.В., Белая И.А., Баранова Ю.Г., Поляничко А.М. // Вестник СПбГУ. Физика и химия. 2017. Т. 4. С. 42–53. <https://doi.org/10.21638/11701/spbu04.2017.106>

## Effects of Cortisol and Tetrahydrocortisol on the Secondary Structure of Apolipoprotein A-I as Measured by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

A. N. Dudarev\*, A. Y. Gorodetskaya\*, T. A. Tkachenko\*, and I. F. Usynin\*,#

#Phone: (383) 335-97-35; e-mail: ivan.usynin@niibch.ru

\*Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Fundamental and Translation Medicine, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia

The interaction of the steroid hormone cortisol and its metabolite tetrahydrocortisol (THC) with two serum proteins – apolipoprotein A-I (apoA-I) and human serum albumin (HSA) was studied in aqueous solutions at physiological pH. Using the tryptophan fluorescence quenching method, it was found that the binding constant of hormones to proteins increases in the order: apoA-I–THC < HSA–THC < apoA-I–cortisol < HSA–cortisol. The results confirm the existing point of view that albumin and apoA-I play the important role in the transport of active forms of steroid hormones. However, the use of Fourier transform infrared spectroscopy revealed the most pronounced and multidirectional changes in the secondary structure of proteins under the influence of an inactive form of the hormone – THC. Upon incubation of apoA-I in the presence of THC, a dose-dependent decrease in the content of  $\alpha$ -helices and an increase in  $\beta$ -turns were observed. On the contrary, in HSA incubated with THC, the number of  $\alpha$ -helices increased, and  $\beta$ -turns decreased. Similar changes were found in the structure of apoA-I incubated with cortisol. The secondary structure of HSA in the presence of cortisol did not change. It is assumed that conformational changes in apoA-I under the influence of steroid hormones can lead to a significant change in the acceptor and regulatory properties of the protein.

*Keywords: apolipoprotein A-I, albumin, cortisol, tetrahydrocortisol, protein conformation, Fourier transform infrared spectroscopy*