

ПРОТЕОМ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ

КУЛИКОВ В.А.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра общей и клинической биохимии

Резюме. В обзоре литературы суммированы результаты недавних научных исследований протеома липопротеинов высокой плотности с помощью масс-спектрометрических методов анализа. В составе этих липопротеинов обнаружено более ста белков. Однако присутствие только пятидесяти одного из них подтверждено двумя и более исследованиями. Обсуждается значение этих исследований для понимания молекулярных основ функции липопротеинов высокой плотности.

Ключевые слова: протеом, липопротеины высокой плотности.

Abstract. In this literature review the results of recent scientific researches of proteome of high-density lipoproteins by means of mass spectrometry methods of analysis are summarized. More than hundred proteins have been found in the composition of these lipoproteins. However, the presence of only fifty one of them has been confirmed by two or more researches. The value of these researches for understanding the molecular bases of high-density lipoproteins function is discussed.

Сегодня, когда геном человека уже секвенирован, перед исследователями стоит задача изучения структуры и функции многих десятков тысяч белков, кодируемых геномом. Более того, предстоит объяснить, как взаимодействуют белки в сложных биологических системах. Эти важные биологические проблемы являются центральной задачей стремительно развивающейся протеомики – науки об экспрессии, структуре и функциях белков [1].

Липопротеины – это сложные надмолекулярные комплексы липидов и белков, которые циркулируют в плазме крови и внеклеточной жидкости и играют главную роль в транспорте экзогенных и эндогенных липидов. Кроме того, липопротеины участвуют и в других процессах, отличных от транспорта липидов, например, являются важными медиаторами иммунного ответа и механизмов защиты организма [2]. Липопротеины давно привлекают внимание клинической медицины, так как их уровень связан с риском развития сердечно-сосудистой патологии. Так, высокий уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и/или низкий уровень холестерина липопротеинов высокой

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра общей и клинической биохимии, тел. 8 (0212) 37-24-52 – Куликов В.А.

плотности (ЛПВП) – важные факторы риска развития атеросклероза [3].

Метаболизм и функции липопротеинов плазмы крови большей частью определяются взаимодействием аполипопротеинов (апо) – белковой части липопротеинов – с рецепторами клеточных мембран, ферментами и липидопереносящими белками. Происхождение термина «аполипопротеин» ведет свое начало от названия белковой части сложных ферментов (апофермент). Греческая приставка «апо» означает «прочь от», или «отделяю от». Таким образом, белки, ассоциированные с липидами и выполняющие структурную функцию в составе липопротеинов, обозначаются термином аполипопротеины. Этим термином сегодня обозначают «классические» аполипопротеины, такие, как апоА, апоВ, апоС и др. Другие белки, такие, как ферменты и липидопереносящие белки, могут существовать в ассоциации с липопротеинами и в несвязанной с липопротеинами форме. Поэтому термин «ассоциированные белки» используется для подобных белков, которые остаются связанными с липопротеинами после их выделения из плазмы крови.

Целью данного обзора является обобщение последних научных исследований протеома липопротеинов высокой плотности сыворотки крови здоровых людей, а также пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС).

Методы изучения протеома липопротеинов

Для идентификации белков в липопротеиновых комплексах сегодня используют несколько общих методических подходов [4].

Первый подход базируется на различиях в изоэлектрической точке и размерах белковых молекул с использованием двумерного гель-электрофореза [5]. Белки визуализируются окрашиванием, экстрагируются из геля и после протеолитического расщепления анализируются масс-спектрометрическими методами. Данный методический подход используется для характеристики относительно несложных протеомов.

Во втором подходе используется матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization) с время-пролетным (TOF, time of flight) масс-анализатором. В этом методе лазерный луч вырывает ионы с поверхности мишени, на которую нанесен образец со специально подобранной матрицей. Метод позволяет идентифицировать отдельные белки и используется, в основном, для идентификации уже известных белков [6].

В третьем подходе применяется время-пролетный масс-спектрометр с усиливаемой поверхностью лазерной десорбцией/ионизацией (SELDI, surface-enhanced laser desorption/ionization). Суть этого метода заключается в использовании в качестве масс-спектрометрической мишени селективных поверхностей, избирательно связывающих белки на основе специфических аффинных взаимодействий [7]. Метод применяется для идентификации белков в сложных смесях, а также отдельных классов белков.

Четвертый подход, называемый shotgun-протеомика, или метод «дробовика», использует высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с электроспрей-ионизацией и тандемной масс-спектрометрией [8]. Исследуемые белки расщепляют трипсином на короткие пептиды, которые разделяются с помощью жидкостной хроматографии, переводятся в газообразное состояние электроспрей-ионизацией и анализируются тандемной масс-спектрометрией. Этот мощный метод может детектировать более 1000 белков в сложных смесях.

Характеристика протеома ЛПВП

ЛПВП – гетерогенные белково-липидные комплексы с гидратированной плотностью 1,063 – 1,21 г/мл. Традиционно методом ультрацентрифугирования ЛПВП разделяют на два главных подкласса: ЛПВП₂ (1,063-1,125 г/мл) и ЛПВП₃ (1,125-1,21 г/мл). Белки составляют около 50% массы ЛПВП. Среди белков 70% приходится на апоА-I и 15-20% на апоА-II. Композиционная гетерогенность ЛПВП обуславливает выполнение ими ряда различ-

ных биологических функций. Наиболее изученной функцией является участие ЛПВП в процессе обратного транспорта холестерина [9]. Кроме этого, ЛПВП предотвращают окислительную модификацию липопротеинов низкой плотности, способствуют репарации эндотелия и образованию оксида азота [10, 11]. Ингибируя экспрессию клеточных молекул адгезии на эндотелии и активность хемотактического фактора макрофагов, ЛПВП препятствуют развитию воспаления [12].

ЛПВП впервые изолировали из сыворотки крови 60 лет назад и сотни биохимических исследований были проведены для выяснения характеристики их белкового состава. До 2005 года в составе ЛПВП выделяли четыре основные функциональные группы белков: 1) белки, ассоциированные с транспортом и метаболизмом липидов и структурой самого липопротеина – аполипопротеины А-I, А-II, А-IV, А-V, С-I, С-II, С-III, С-IV, D, E, F, H, L-I, M; 2) ферменты, такие, как лецитин-холестерин-ацилтрансфераза (ЛХАТ), параоксоназа и гидролаза тромбоцит-активирующего фактора; 3) липидопереносящие белки, включая эфирахолестеринпереносящие белки (ЭХПБ) и фосфолипидопереносящие белки (ФЛПБ); 4) острофазовые белки – сывороточный амилоид А (SAA) и кластерин.

Применение масс-спектрометрических методов анализа привело к неожиданному открытию ряда новых белков, ассоциированных с ЛПВП. Первое подобное исследование, проведенное в 2005 году с использованием двумерного гель-электрофореза в комбинации с MALDI-TOF-спектрометрией, позволило идентифицировать 12 белков в составе ЛПВП, и 13 белков в составе общей фракции ЛПВП [13]. Результаты этого исследования показали, что в ЛПВП, кроме классических аполипопротеинов, присутствуют и другие белки, такие, как SAA, слюнная амилаза и α -1-антитрипсин.

Быстрое развитие и применение shotgun-протеомики за следующие пять лет увеличило число идентифицированных в ЛПВП белков с 13 до 100 и более. Однако присутствие в ЛПВП только пятидесяти одного из них подтверждено двумя и более исследованиями (табл. 1).

Второе исследование протеома ЛПВП, проведенное тоже в 2005 году с использованием двумерного электрофореза и MALDI-масс-спектрометрии, выявило в составе ЛПВП 24 белка, включая большинство белков, найденных в предыдущем исследовании [14]. Сывороточный трансферрин и α -2-макроглобулин были отмечены в качестве новых белков, ассоциированных с ЛПВП.

В 2006 году впервые было показано, что 56 белков, идентифицированных с использованием двумерного электрофореза в сочетании с MALDI-TOF-масс-спектрометрией, могут быть разделены на несколько функциональных кластеров. Таковыми являются белки транспорта и метаболизма липидов, иммунной системы и системы комплемента, белки гемостаза и фибринолиза, а также факторы роста, рецепторы и гормон-связывающие белки [15].

В 2007 году применение метода shotgun-протеомики позволило обнаружить в составе ЛПВП 48 белков [16]. Они включали в себя 22 из 23 известных белков ЛПВП, участвующих в метаболизме липидов. Количество острофазовых белков (23 из 48), концентрация которых заметно меняется при остром воспалении, превышало число белков, вовлеченных в метаболизм липидов. Впервые были обнаружены факторы системы комплемента C4A, C4B, C9, а также витронектин – белок из семейства пексинов, ингибирующий мембраноповреждающий эффект конечного цитолитического комплекса системы комплемента. Обнаружение белков, участвующих в системе комплемента вместе с белками, образующими комплекс, убивающий простейших (апоА-I, L-I и гаптоглобин-родственный белок), предполагает, что ЛПВП могут служить платформой для сборки белковых ансамблей, вовлеченных во врожденный иммунный ответ [17].

Протеолиз структурных белков в атеросклеротических очагах может играть ключевую роль в механизмах разрыва бляшки – главной причине инфаркта миокарда у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) [18]. Ингибиторы сериновых протеаз, называемые серпинами, являются регуляторами ряда биологических путей, вовлеченных в свертывание

Таблица 1

Белки, идентифицированные в составе ЛПВП с помощью масс-спектрометрии^а

Название белка	Функция
АпоА-I	1,5
АпоА-II	1
АпоА-IV	1
АпоВ-100	1
АпоС-I	1
АпоС-II	1
АпоС-III	1
АпоС-IV	1
АпоD	1
АпоЕ	1
АпоF	1
АпоН	1,5
АпоJ (кластерин)	1,3
АпоL-I	1
АпоМ	1
Альбумин	6
Альфа-1-кислый гликопротеин 2	5
Альфа-1-антитрипсин	2,5
Альфа-1В-гликопротеин	6
Альфа-1-микроглобулин/бикунин	2,5
Альфа-2-антиплазмин	2,4
Альфа-2-макроглобулин	2,4,5
Альфа-2HS-гликопротеин	2,5
Ангиотензиноген	2,6
Витамин Д-связывающий глобулин	6
Витронектин	3,5
Гаптоглобин-родственный белок	2,5,6
Гемопексин	5,6
Интер-альфа-трипсин ингибитор цепь Н4	2,5
Калликреин	4
Кининоген 1	2,5
Комплемент С3	3,5
Комплемент С4А	3,5
Комплемент С4В	3,5
Комплемент С9	3,5
Комплемент фактор Н	3
Параоксоназа 1	1,5
Параоксоназа 3	1,6
Протромбин	4
Ретинол-связывающий белок	5,6
Серпин F1	2,6
Сывороточный амилоид А 1	1,5
Сывороточный амилоид А 2	1,5
Сывороточный амилоид А 4	1
Сывороточный амилоид Р	6
Транстиретин	5,6
Трансферрин	5,6
Фибриноген	4,5
ФЛПБ	1
Церулоплазмин	5,6
ЭХПБ	1

Примечание: а – по результатам, подтвержденным двумя и более исследованиями [13-16, 20, 23]. 1 – транспорт и метаболизм липидов; 2 – ингибиторы протеиназ; 3 – система комплемента и ее регуляция; 4 – гемостаз/фибринолиз; 5 – острофазовый ответ; 6 – другие функции.

крови, ремоделирование матрикса и воспаления [19]. Присутствие их в составе ЛПВП указывает на то, что кардиопротективный эффект ЛПВП отчасти связан с ингибированием протеолиза.

Используя для выделения ЛПВП-фракции быструю жидкостную хроматографию белков с последующим анализом белкового состава ЛПВП методом *shotgun*-протеомики, в 2010 году идентифицировано около 80 белков [20]. Примечательно, что было обнаружено около 30 новых белков, ассоциированных с ЛПВП. Среди них – некоторые новые компоненты системы комплемента (C2, C5, C8) и гемостаза/фибринолиза (плазминоген, антитромбин III), гормоно- и витаминсвязывающие белки (сексгормон-связывающий и кортикостероид-связывающий глобулины, афазин), ферменты (аттрактин, биотинидаза), коллагенсвязывающие белки (фибронектин, люмикан), ядерный шаперон – мидазин и другие.

Окисление ЛПНП – значимое событие в атерогенезе, а ЛПВП ингибируют их окисление *in vivo* [21, 22]. В 2010 году методом *shotgun*-протеомики был изучен белковый состав разных подклассов ЛПВП с оценкой способности каждой фракции ЛПВП ингибировать окисление ЛПНП *in vitro* [23]. 28 белков, обнаруженных в составе ЛПВП, были разделены на 5 кластеров с разным преобладанием их в каждом подклассе ЛПВП. Установлена четкая корреляционная связь между уровнем компонентов белковых кластеров и их антиоксидантными свойствами. Обнаружено, что три специфических белка (апо L-I, параоксоназа 1 и 3) находятся почти эксклюзивно в ЛПВП₃. Способность ЛПВП ингибировать окисление ЛПНП связано с содержанием в ЛПВП именно этих белков. ЛПВП₃ являются также уникальными переносчиками апоА-IV, ФЛПБ, апоJ и апоF. Все вышеперечисленные белки и составили кластер А. Предпочтительно локализуются в ЛПВП₃ (кластер В) – апоD, апоM и SAA-1 и 2. Распределяются равномерно среди субклассов ЛПВП (кластер С) – апоА-I, апоА-II, апоС-I, апоС-IV и SAA-4. Находятся предпочтительно в ЛПВП₂ – апоЕ, апоС-II и апоС-III (кластер D). Наконец, кластер Е представлен дву-

мя белками апоВ-100 и апо(а), локализованными почти исключительно во фракции ЛПВП₂.

Протеом ЛПВП у пациентов с ИБС

Анализ протеома ЛПВП₃, полученных из крови мужчин с установленным диагнозом ИБС, обнаружил селективное накопление пяти белков [16]. Эти белки связаны с метаболизмом липидов (апоЕ, апоС-IV и апоА-IV), окислительным стрессом (параоксоназа-1) и системой комплемента (фактор С3). Примечательно, что апоЕ, апоС-IV и фактор С3 экспрессируются макрофагами [24, 25]. Более того, апоЕ и апоС-IV – белки генного кластера, экспрессия которого индуцируется в макрофагах через холестеринчувствительные ядерные рецепторы. АпоА-IV вместе с апоА-I и апоС-III принадлежит другому кластеру генов, который замедляет развитие атеросклероза, если экспрессируется у мышей [26]. ЛПВП₂, обогащенные апоЕ, – эффективные акцепторы холестерина из макрофагов [27], а у пациентов с ИБС обнаружено снижение уровня апоЕ в их составе. Накопление апоЕ в составе ЛПВП₃ у пациентов с ИБС, возможно, связано с перераспределением апоЕ от ЛПВП₂ к ЛПВП₃ с сопутствующим замедлением оттока холестерина из макрофагов [16].

Первое исследование, изучавшее влияние липидоснижающей терапии у пациентов с ИБС на протеом ЛПВП, показало, что ЛПВП₃ у пациентов с ИБС значительно обогащены апоЕ и апоС-II и содержат меньше апоJ и ФЛПБ. Терапия статинами и ниацином снижает уровень апоЕ и одновременно повышает содержание апоJ и ФЛПБ, то есть частично ремоделирует протеомный профиль пациентов с ИБС в профиль здоровых людей [28].

Заключение

Применение методов масс-спектрометрического анализа с высокой разрешающей способностью позволило обнаружить в составе ЛПВП большое количество новых белков. Эти находки не оставляют сомнений, что ЛПВП не только транспортируют липиды, но и вовлечены в процессы ингибирования протеиназ,

регуляцию системы комплемента, острофазовый ответ, а также являются составной частью системы врожденного иммунитета.

Литература

- Anderson, N. G. Adventures in clinical chemistry and proteomics: a personal account / N. G. Anderson // *Clinical Chemistry*. – 2010. – Vol. 56, N 2. – P. 154-160.
- Getz, G. S. Bridging the innate and adaptive immune systems / G. S. Getz // *J. Lipid Res.* – 2005. – Vol. 46. – P. 619-622.
- Stephen, J. N. Relationship between LDL, HDL, blood pressure and atheroma progression in the coronaries / J. N. Stephen // *Curr. Opin. Lipid.* – 2009. – Vol. 20. – P. 491-496.
- Hoofnagle, A.N. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins / A. N. Hoofnagle, J. W. Heinecke // *J. Lipid Res.* – 2009. – Vol. 50. – P. 1967-1975.
- O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins / P. H. O'Farrell // *J. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250. – P. 4007-4021.
- Farwig, Z. N. Analysis of high-density lipoprotein apolipoproteins recovered from specific immobilized pH gradient gel pI domains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / Z. N. Farwig, A. V. Campbell, R. D. Macfarlane // *Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 75. – P. 3823-3830.
- SELDI-TOF mass spectrometry of high-density lipoprotein / J.H.M. Levels [et al.] // *Proteome Science*. – 2007. – Vol. 5. – P.15-23.
- Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry / A. J. Link [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 1999. – Vol. 17. – P. 676-682.
- The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages / M. P. Adorni [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2007. – Vol. 48. – P. 2453-2462.
- Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein. Steps 2 and 3 / M. Navab [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2000. – Vol. 41. – P. 1495-1508.
- High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice / C. Tso [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 1144-1149.
- Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein / M. Navab [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1991. – Vol. 88. – P. 2039-2046.
- Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry / H. Karlsson [et al.] // *Proteomics*. – 2005. – Vol. 5. – P. 1431-1445.
- Mass spectrometry based analytical tools for the molecular protein characterization of human plasma lipoproteins / M. Heller [et al.] // *Proteomics*. – 2005. – Vol. 5. – P. 2619-2630.
- Proteomic analysis of high density lipoprotein / F. Rezaee [et al.] // *Proteomics*. – 2006. – Vol.6. – P.721-730.
- Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL / T. Vaisar [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 746-756.
- Human high density lipoproteins are platforms for assembly of multi-component innate immune complexes / A. M. Shiflett [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 32578-32585.
- The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis / A. M. Shiflett [et al.] // *J. Intern. Med.* – 2008. – Vol.263. – P. 517-527.
- Richardson, J. Serpins, the vasculature, and viral therapeutics / J. Richardson, K. Viswanathanand, A. Lucas // *Front. Biosci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 1042-1056.
- Collins, L. A. Quantitative comparison of lipoprotein fractions derived from human plasma and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / L. A. Collins, M. Olivier // *Proteome Science*. – 2010. – Vol. 8. – P. 42-50.
- Stocker, R. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis / R. Stocker, J.F. Keane // *Physiol. Rev.* – 2004. – V. 84. – P.1381-1478.
- Antiinflammatory properties of HDL / P. J. Barter [et al.] // *Circ. Res.* – 2004. – Vol. 95. – P. 764-772.
- Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function / W. S. Davidson [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P.870-876.
- Strunk, R.C. Human peripheral blood monocyte-derived macrophages produce haemolytically active C3 in vitro / R.C. Strunk, K.S. Kunke, P.C. Giclas // *Immunology*. – 1983. – Vol. 49. – P. 169-174.
- Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta / P. A. Mak [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 31900-31908.
- Expression of human apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in mice induces hyperlipidemia but reduces atherogenesis / L. Vergnes [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 2267-2274.
- HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway / F. J. Matsuura [et al.] // *Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116. – P. 1435-1442.
- Combined statin and niacin therapy remodels the high-density lipoprotein proteome / P. S. Green [et al.] // *Circulation*. – 2008. – Vol. 118. – P. 1259-1267.

Поступила 10.01.2011 г.

Принята в печать 03.06.2011 г.