



УДК 579.84:577.112:314.6+616.097.612.017+547.458.22:118.057

© 1993 Л. И. Федореева, В. И. Горбач

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОРООБРАЗУЮЩЕГО БЕЛКА ВНЕШНЕЙ
МЕМБРАНЫ *Yersinia pseudotuberculosis* С ЛИПИДОМ А
И ЕГО СИНТЕТИЧЕСКИМИ АНАЛОГАМИ

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Методами собственной белковой флуоресценции, КД-спектроскопии и ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия показано, что основной белок внешней мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* взаимодействует с липидом А с образованием комплекса. Найдено, что белок имеет два независимых участка связывания с константой ассоциации, равной $6,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Изучено взаимодействие этого белка с моно- и дисахаридными аналогами липида А. Показано, что для специфического связывания гликолипид должен иметь дисахаридную основу. Также обнаружено, что на аффинность взаимодействия влияет тип гликозидной связи и гидрофильно-гидрофобный баланс в молекуле гликолипида.

Липид-белковые взаимодействия играют важную роль в организации и функционировании биологических мембран. Характерная особенность внешней мембраны грамотрицательных бактерий — наличие в них липополисахарида (ЛПС) [1], который находится в тесной ассоциации с мембранными белками, модифицируя их биологическую активность. Считается, что только в присутствии ЛПС белки проявляют поровую активность [2], рецепторные свойства для ряда бактериофагов и колицинов [3].

В состав ЛПС входят О-специфические полисахариды цепи, олигосахарид кора и ковалентно связанный с ним липид А [4]. ЛПС участвует в образовании наружного монослоя внешней мембраны, его гидрофильные полисахаридные цепи находятся вне мембраны, а гидрофобный липид А погружен в липидный матрикс, являясь «якорем» для всей молекулы. Такое расположение ЛПС в мембране обуславливает особую роль липида А во взаимодействии ЛПС с белками.

Известно, что порообразующий белок внешней мембраны грамотрицательных бактерий — порин тесно ассоциирует с ЛПС, образуя комплексы [5]. Соотношение между компонентами в этих комплексах может быть различно и зависит от метода экстракции [6]. Отделение ЛПС от порина приводит к денатурации белка, что сопровождается потерей порообразующих свойств [5]. Однако некоторые авторы считают, что добавление ЛПС к раствору денатурированного белка вызывает его ренатурацию [7].

Во внешней мембране псевдотуберкулезного микроба, по данным SDS-электрофореза, было обнаружено до 10 белков. На долю белка, являющегося порином, приходится около 40% общего весового содержания мембранных белков. Ранее этот белок, названный иерсинином, был выделен из наружной мембраны и охарактеризован [8].

Данная работа посвящена изучению взаимодействия иерсинина с липидом А и его синтетическими аналогами, моделирующими отдельные элементы структуры природного соединения.

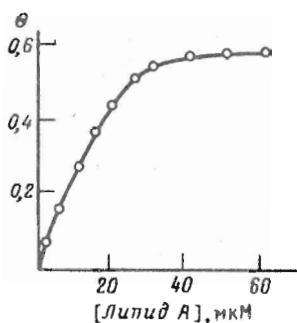


Рис. 1

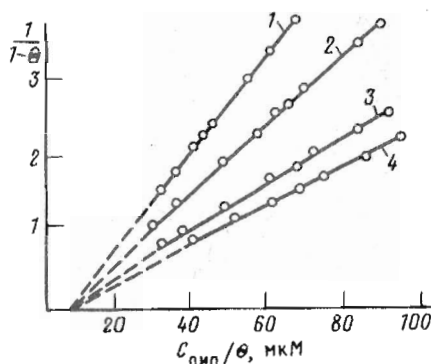


Рис. 3

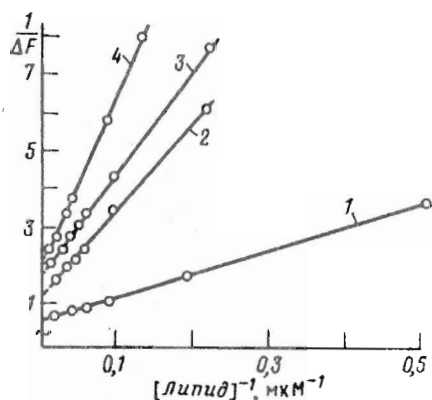


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость степени насыщения (θ) белка-порина липидом А от концентрации липида А. Условия: концентрация белка 2,7 мкМ в 1 мл 0,05 М трис-НСI-буфера, рН 8,4, содержащего 1 мкл триэтиламина. Липид А был растворен в том же буфере

Рис. 2. Зависимость изменения интенсивности флуоресценции белка от концентрации гликофосфолипидов: 1 — липид А, 2 — соединение (V), 3 — (VI), 4 — (VII). Условия см. рис. 1

Рис. 3. Графики Стинсона — Холбрука для расчета параметров связывания белка липидом А (1) и его аналогами: (V) (2), (VI) (3), (VII) (4). График в двойных обратных координатах. Условия как на рис. 1

Основной белок наружной мембраны псевдотуберкулезного микроба был выделен в составе липополисахарид-белкового комплекса экстракцией микробных клеток трихлоруксусной кислотой [9]. Выбор метода обусловлен тем, что в состав белкового компонента эндотоксина входили только два белка, при этом содержание иерсинина составляло около 90%. Иерсинин может быть выделен в индивидуальном состоянии гель-хроматографией на Sephacryl S-300 в присутствии детергентов — SDS и тритона X-100 из комплекса липид А — иерсинин, полученного после кислотного гидролиза эндотоксина [10].

Белок, согласно данным газожидкостной хроматографии, не содержал моносахаридов, характерных для полисахаридного участка молекулы ЛПС из псевдотуберкулезного микроба, и жирных кислот, входящих в состав липида А [11]. Изолированный белок, по данным SDS-электрофореза и N-концевого аминокислотного анализа, был гомогенен.

Ранее было показано, что иерсинин в нативной форме существует в виде тримеров [8]. По данным SDS-электрофореза, после отделения ЛПС изолированный белок представляет собой мономерную форму порина. Молекулярная масса белка, рассчитанная из данных аминокислотного анализа, около 37 кДа [10]. На основании УФ-спектра с использованием метода второй производной [12] было рассчитано, что в белке содержатся 2 остатка триптофана и 15 остатков тирозина.

Для изучения процесса взаимодействия липида А и его синтетических аналогов с иерсинином были использованы методы собственной белковой флуоресценции,

Соединение	$K_{ac} \cdot 10^{-4}, M^{-1}$	Число мест связывания
Липид А	6,1	2,2
(V)	4,2	2,2
(VI)	2,9	2,2
(VII)	2,3	2,2

КД-спектроскопии и ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия.

Было отмечено уменьшение интенсивности флуоресценции при добавлении к раствору изолированного белка липида А. Для этого процесса характерна критическая концентрация липида А, при которой наступает насыщение, что является одним из признаков специфического связывания компонентов (рис. 1).

Для построения изотермы Лэнгмюра, описывающей процесс насыщения белка лигандом, необходимо предварительно определить значение максимального падения интенсивности флуоресценции в случае, когда все участки связывания на белке заняты липидом А. Это значение было определено из графика в двойных обратных координатах зависимости изменения флуоресценции от концентрации липида А путем экстраполяции прямой линии к максимальной концентрации липида А (рис. 2). Необходимость использования такого графика для расчета максимального падения флуоресценции была обусловлена наличием эффекта внутреннего фильтра в растворе мембранного белка.

На основании анализа кривой Лэнгмюра можно предположить, что все участки связывания на белке независимы друг от друга (рис. 1). Для расчета параметров связывания был использован метод Стинсона — Холбрука [13]. Кривая, отражающая процесс связывания, имеет вид прямой с тангенсом угла наклона, равным константе ассоциации (K_{ac}), отсекающей на оси абсцисс отрезок, равный $C_{нл}/\theta = n \cdot C_0$ (рис. 3). Из этого уравнения можно определить стехиометрию связывания (n). В случае липида А число мест связывания с мономером иерсинина равно 2,2 (таблица).

Методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия показано, что взаимодействие изолированного белка и липида А в молярном соотношении 1 : 2 соответственно осуществляется с образованием комплекса (рис. 4). Плавающая плотность изолированного иерсинина равна 1,32 г/см³, плотность свободного липида А — 1,44 г/см³. Обнаружение белка и липида А в одной зоне плотности CsCl (1,38 г/см³) указывает на образование комплекса между ними.

Образование комплекса липид А — белок в соотношении 2 : 1 (моль/моль) сопровождается смещением максимума спектра флуоресценции по сравнению с таковым изолированного белка на 7 нм (рис. 5). Как видно из рис. 5, максимум спектра флуоресценции иерсинина, снятого при возбуждении светом длиной волны 280,4 нм, соответствует 307 нм. Такое положение максимума спектров излучения, вероятно, связано с тушением триптофановой флуоресценции, а также с отсутствием передачи энергии с тирозиновых остатков на триптофановые. Смещение максимума спектра флуоресценции до 314 нм в случае комплекса липид А — белок вызвано увеличением вклада триптофановой флуоресценции в общий спектр излучения.

Спектры флуоресценции были анализированы на основе модели дискретных состояний остатков ароматических аминокислот в белках [14]. Согласно этой модели, основной вклад в спектр излучения изолированного белка вносит флуоресценция остатков тирозина. Слабая триптофановая флуоресценция представлена спектральными классами S, I и III. Появление триптофановых остатков спектрального класса II, находящихся в окружении связанной воды, которые

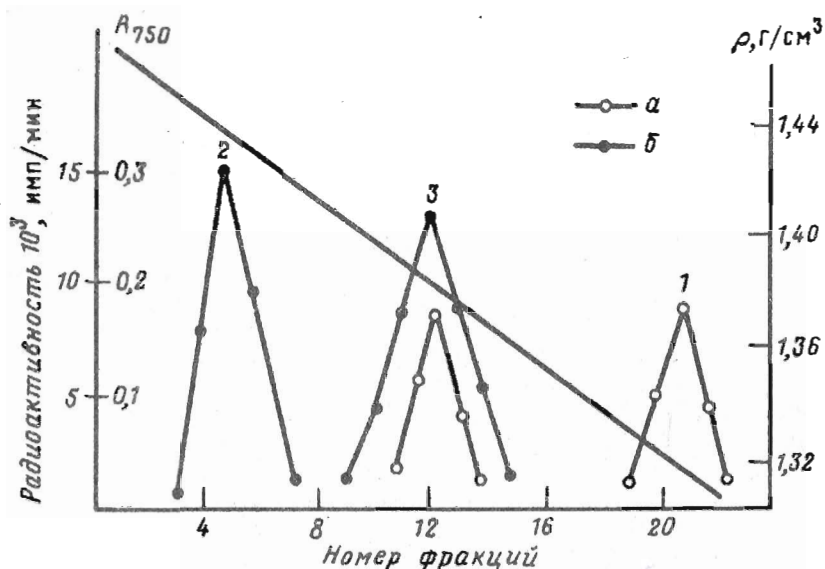


Рис. 4. Ультрацентрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия: 1 — изолированного белка (1 мг), 2 — липида А (0,05 мг), 3 — комплекса липид А — белок (2 : 1, моль/моль, 1,05 мг). Контроль по белку модифицированным методом Лоури [15] (а) и по липиду А по радиоактивной метке (б)

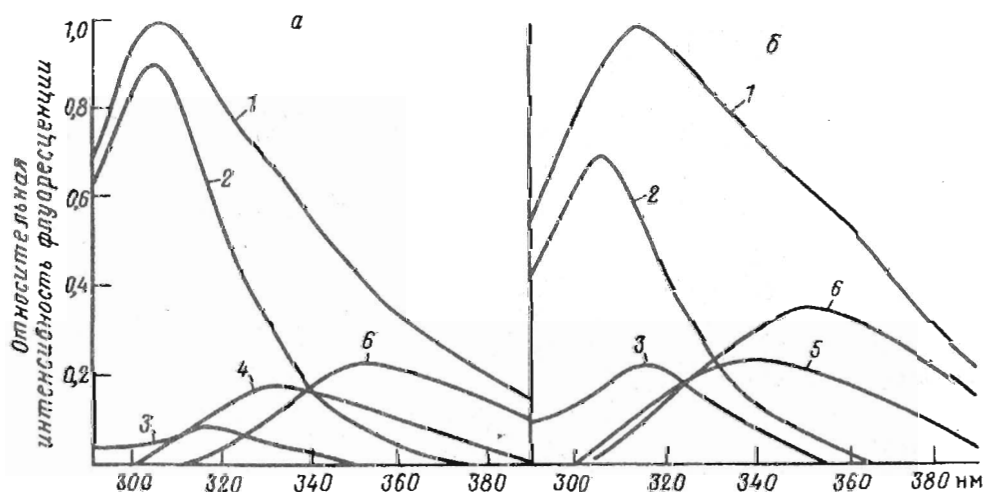


Рис. 5. Анализ спектров собственной флуоресценции на основе дискретных состояний остатков триптофана в белках: а — изолированного белка, б — комплекса липид А — белок (2 : 1, моль/моль). 1 — общий вид спектра, 2 — вклад остатков тирозина, вклад остатков триптофана спектральных классов [14]: S (3), I (4), II (5), III (6). Концентрация соединений 0,1 мг/мл в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8,4

отсутствуют в исходном белке; свидетельствует, что белок специфически взаимодействует с липидом А с образованием комплекса.

Спектр КД мономерной формы белка имеет максимум отрицательной полосы при 202 нм и плечо при 220 нм, для него характерно низкое значение молярной эллиптичности (рис. 6а).

При добавлении липида А к раствору порина было обнаружено увеличение значения молярной эллиптичности и смещение экстремума отрицательной полосы на 6 нм в длинноволновую сторону (208 нм). Изменение параметров спектров КД иерсинина по сравнению с исходными может указывать на его конформационные перестройки при образовании комплекса с липидом А.

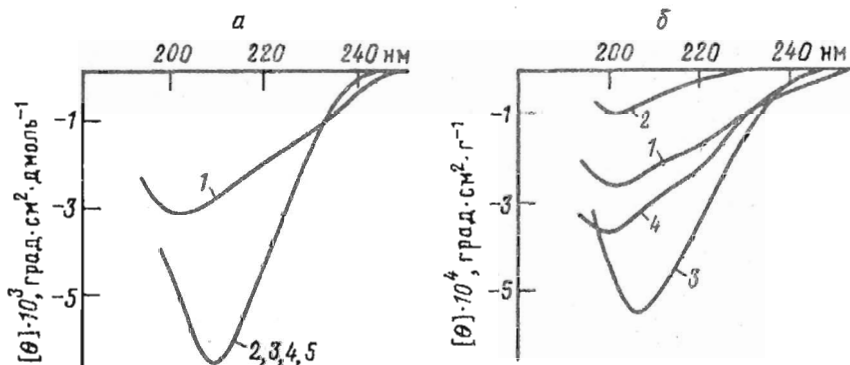


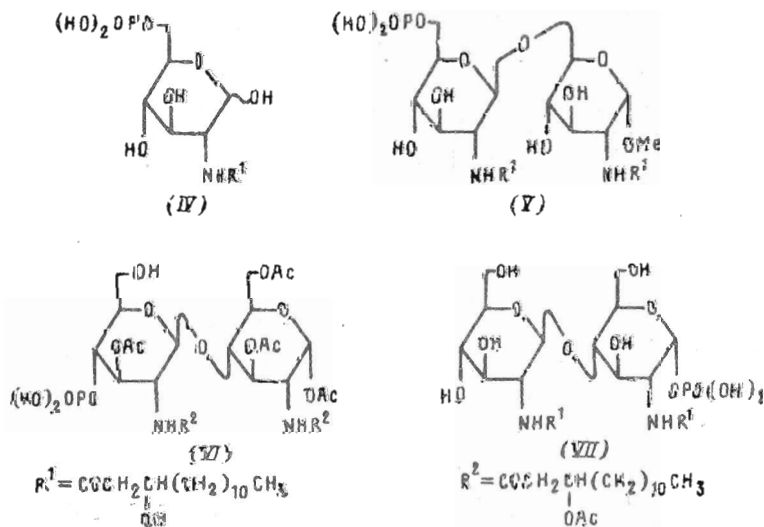
Рис. 6. *а* — спектры КД изолированного белка (1) и комплекса липид А — белок в молярном соотношении 1 : 1 (2), 2 : 1 (3), 3 : 1 (4), 5 : 1 (5). Концентрация соединений 0,2 мг в 1 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 8,4, содержащего 1 мкл триэтиламина. *б* — учет вклада амидных хромофоров липида А в спектр КД комплекса липид А — белок: 1 — изолированный белок (2 мг/мл), 2 — липид А (0,1 мг/мл), 3 — комплекс липид А — белок (2 : 1, моль/моль, 2,1 мг/мл), 4 — спектр, полученный сложением спектров 1 и 2

Оптимальное соотношение липида А и белка определено как 2 : 1 (моль/моль). Увеличение содержания липида А в комплексе не приводит к дальнейшему изменению параметров спектров КД. Спектр КД искусственного комплекса липид А — белок (рис. 6*б*) подобен спектру комплекса липид А — иерсинин, полученного из эндотоксина [9] (рис. 6*а*).

Липид А имеет амидные группы, которые могут вносить вклад в пептидную область спектров КД белка. На рис. 6*б* представлен учет вклада хромофоров липида А в спектр его комплекса с иерсинином. Из полученных данных следует, что сложение значений эллиптичности белка и липида А не приводит к спектру комплекса липид А — белок. Следовательно, вклад липида А неаддитивен, что подтверждает существование комплекса.

Таким образом, эффекты, обнаруженные при сравнении спектров КД исходного белка и белка в присутствии липида А, связаны с конформационными изменениями белка, происходящими при образовании комплекса.

Липид А — необычный гликолипид, представляющий собой дифосфат N,O-ацилированного β-1,6-дисахарид D-глюкозамина [11]. Нами была сделана попытка изучить влияние различных элементов структуры липида А на его взаимодействие с белком.



Для моделирования этого взаимодействия были использованы: N-ацетилглюкозамин (I), N,N'-диацетилхитобиоза (II), Na-соль 3-гидроксимиристиновой кислоты (III), ряд моно- и дисахаридных гликолипидов — аналогов липида А (IV)—(VII), а также сумма бактериальных фосфолипидов. Синтетические гликолипиды (IV)—(VII) различаются между собой структурой углеводного скелета молекулы, положением фосфатной группы и степенью ацилирования.

Было найдено, что при взаимодействии с порином соединения (I)—(III) не влияют на параметры спектров флуоресценции белка, бактериальные фосфолипиды увеличивают интенсивность флуоресценции, а соединения (IV)—(VII) снижают ее подобно липиду А. Однако если для соединения (IV) насыщения системы не достигается даже при соотношении белок — липид А 1 : 400, то при переходе к гликолипидам на основе β -1,6- и β -1,4-дисахаридов (V)—(VII) наблюдается насыщение, т. е. процесс взаимодействия становится специфичным (данные не приведены).

Таким образом, для взаимодействия с белком соединения должны иметь гликофосфолипидную структуру и определенное соотношение полярных и гидрофобных заместителей в молекуле.

Для синтетических аналогов липида А были построены графики Стинсона — Холбрука (рис. 4). Зависимость θ от $C_{\text{лип}}/\theta$ ($C_{\text{лип}}$ — концентрация синтетических гликолипидов) имеет вид прямой, как и в случае липида А. На основании этого можно предположить, что все центры связывания в молекуле белка независимы друг от друга и одинакового типа действия. Для всех дисахаридных аналогов, так же как для липида А, число мест связывания равно ~ 2 (таблица). Этот факт позволяет предположить, что связывание с липидом А и его синтетическими аналогами осуществляется по одним и тем же участкам в молекуле белка.

При сравнении разных дисахаридных гликолипидов видно, что образец (V) имеет более высокую константу связывания, чем гликолипиды (VI) и (VII) (таблица). Принципиальным отличием в структуре этих соединений является тип гликозидной связи (β -1,6 или β -1,4) между углеводными звеньями. Следовательно, пространственное расположение углеводных остатков существенно при связывании с белком.

Соединения (VI) и (VII) отличаются друг от друга положением фосфатной группы и степенью ацилирования. Близкие параметры связывания их с белком указывают на то, что эти элементы структуры менее важны для взаимодействия с иерсинином.

Таким образом, нами показано, что синтетические препараты дисахаридной природы, моделирующие некоторые элементы строения липида А, взаимодействуют с белком внешней мембраны подобно природному соединению. Близкие параметры связывания (число мест связывания и K_{ac}) синтетического дисахарида (V) и липида А свидетельствуют о достаточности такой структуры для специфического взаимодействия. Изменение типа гликозидной связи в соединениях (VI) и (VII) уменьшают K_{ac} , отражая роль β -1,6-гликозидной связи в функциональной активности липида А. Переход к моносахаридному аналогу (IV), а также к соединениям, не имеющим гликофосфолипидной природы, приводит к потере этими соединениями способности специфического связывания с белком.

Дальнейшее исследование позволит выявить более тонкие структурные аспекты этого взаимодействия и поможет понять некоторые вопросы функционирования внешней мембраны грамотрицательных бактерий.

Экспериментальная часть

Аналитические методы. Анализ аминокислот, метиловых эфиров жирных кислот, моносахаридов проводили как описано в работе [11]. Содержание триптофана определяли по второй производной УФ-спектров по методу [12]. Для определения концентрации белка использовали модифицированный метод Лоури

в присутствии 2% SDS [15]. Липид А обнаруживали по радиоактивной метке, введенной биосинтетическим путем [10]. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS проводили в трис-глициновом буфере, согласно работе [16]. Для измерения радиоактивности использовали толуольный сцинтиллятор (4 г 2,5-дифенилоксазола и 0,1 г 1,4-ди(5-фенил-2-оксазол)бензола в 1 л толуола). Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Magk-II (США).

Микроорганизм. Микробную массу *Y. pseudotuberculosis*, меченную по углероду, получали согласно работе [17].

Выделение белка. Высушенную ацетоном микробную массу (50 г) экстрагировали 5% трихлоруксусной кислотой (500 мл). Полученный ЛПС-белковый комплекс подвергали гель-фильтрации на сефарозе 2В. Очищенный комплекс (200 мг) гидролизовали 1% уксусной кислотой (20 мл) при 90° С в течение 6 ч. Полученный фрагмент липид-А-нерсинин (20 мг) фракционировали на компоненты как описано [13]. Выход белка 7,9 мг.

Выделение липида А. Липид А из псевдотуберкулезного микроба был получен по методу, предложенному в работе [11].

Получение синтетических аналогов липида А. Соединение (IV) — 2-((R, S)-3-гидроксимиростоиламино)-2-дезоксид-6-фосфоно-D-глюкоза, динатриевая соль; соединение (V) — метил-2-дезоксид-2-((R, S)-3-гидроксимиростоиламино)-6-О-[2-дезоксид-2-((R, S)-3-гидроксимиростоиламино)-6-фосфоно-β-D-глюкопиранозил]-α-D-глюкопиранозид, аммониевая соль; соединение (VI) — 1,3,6-три-О-ацетил-2-((R, S)-3-ацетоксимиростоиламино)-4-О-[3-О-ацетил-2-((R, S)-3-ацетоксимиростоиламино)-2-дезоксид-4-фосфоно-α-D-глюкопиранозил]-2-дезоксид-α-D-глюкопираноза и соединение (VII) — 2-дезоксид-2-((R, S)-3-гидроксимиростоиламино)-4-О-[2-((R, S)-3-гидроксимиростоиламино)-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил]-1-фосфоно-α-D-глюкопираноза, динатриевая соль, были синтезированы, как описано ранее [18—20].

Реконструкция липид-белковых комплексов. Белок растворяли в 1 мл 0,05 М трис-НСI-буфера (рН 8,4), содержащего 1 мкл триэтиламина. Гликолипиды растворяли в 1 мл того же буфера. Растворы смешивали и выдерживали 2 сут при 37° С. За образованием комплекса следили методами ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия и оптической спектроскопии.

Методы оптической спектроскопии. Спектры кругового дихроизма регистрировали на автоматическом спектрополяриметре (Jasco J-500 А, Япония) в диапазоне 200—250 нм в кювете с длиной оптического пути 0,1 мм. Кювета с образцами помещалась на максимальном расстоянии перед детектором. Молярная эллиптичность рассчитана на средний аминокислотный остаток с молекулярной массой 110 Да.

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре (Cary 219, США). Коэффициент поглощения белка (1 мг/мл, 0,05 М трис-НСI-буфер, рН 8,8) A_{278} 1,22.

Спектры собственной белковой флуоресценции препаратов снимали на установке лабораторного типа, описанной в работе [21]. Спектры излучения регистрировали с передней стенки кюветы. Флуоресценцию белка возбуждали светом ртутной лампы при 280,4 нм. Спектры собственной флуоресценции снимали также на спектрофлуориметре (Hitachi 850, Япония).

Параметры процесса комплексообразования были рассчитаны в условиях равновесия, которое достигалось через 30 мин при 37° С при интенсивном перемешивании. Степень насыщения (θ) определяли по изменению интенсивности флуоресценции белка: $\theta = F_0 - F/F_0 - F_{\max}$, где F_0 — исходная интенсивность флуоресценции при 307 нм, F — после добавления липидных образцов, F_{\max} — максимальное падение флуоресценции. Все значения (F) были откорректированы с учетом внутреннего фильтра, определенного по формуле [22]: $F_{\text{корр}} = F_{\text{набл}} \cdot \text{antilog}(A_{307} + A_{280})/2$, где A — оптическое поглощение, определенное из УФ-спектров.

Авторы выражают благодарность д-ру биол. наук Е. А. Пермякову за помощь в обсуждении спектров собственной белковой флуоресценции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nowotny A. // *Bacteriol. Rev.* 1969. V. 33. № 1. P. 72—98.
2. Chai T., Wu V., Foulds J. // *J. Bacteriol.* 1982. V. 151. № 2. P. 983—988.
3. Nakae T. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1975. V. 64. № 4. P. 1224—1230.
4. Luderitz O., Westphal O., Staub A. M., Nikaido H. // *Microbial Toxins. Bacterial Endotoxins.* V. 4 / Eds Weinbaum G., Kadis S. N. Y.: Acad. Press, 1971. P. 145—233.
5. Rogue W. J., Soughlin R. T., McGroarty E. J. // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. № 9. P. 4003—4010.
6. Morrison D. C., Leive L. // *J. Biol. Chem.* 1975. V. 250. № 8. P. 2911—2919.
7. Hancock R. E. W., Sarey A. M. // *J. Bacteriol.* 1979. V. 149. № 2. P. 902—910.
8. Новикова О. Д., Зыкова Т. А., Ядыкина Г. М., Глазунов В. П., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // *Биол. мембраны.* 1985. Т. 2. № 7. С. 714—723.
9. Соловьева Т. Ф., Бахолдина С. И., Ермак И. М., Хоменко В. А., Федорева Л. И., Новикова О. Д., Фролова Г. М., Лихацкая Г. Н., Оводов Ю. С. // *Биоорганич. химия.* 1990. Т. 16. № 10. С. 1301—1309.
10. Федорева Л. И., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // *Биоорганич. химия.* 1984. Т. 10. № 1. С. 93—99.
11. Krasikova I. N., Gorbach V. I., Solov'eva T. F., Ovodov Yu. S. // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 89. № 1. P. 287—289.
12. Ichikawa Y., Terada H. // *Chem. and Pharm. Bull.* 1981. V. 39. № 2. P. 438—444.
13. Stinson R. A., Holbrook J. J. // *Biochem. J.* 1973. V. 131. № 3. P. 719—725.
14. Burstein E. A., Vedenkina N. S., Gokova M. N. // *Photochem. and Photobiol.* 1973. V. 18. № 3. P. 263—279.
15. Kashyp M. L., Hynd B. A., Robinson K. // *J. Lipid Res.* 1980. V. 21. № 4. P. 431—484.
16. Ogita Z., Market C. L. // *Analyt. Biochem.* 1979. V. 99. № 2. P. 233—241.
17. Соловьева Т. Ф., Федорева Л. И., Шулятьев А. Е., Оводов Ю. С. // *Микробиол. журн.* 1981. Т. 43. № 5. С. 645—649.
18. Gorbach V. I., Krasikova I. N., Lukyanov P. A., Razmakhnina O. Yu., Solov'eva T. F., Ovodov Yu. S. // *Eur. J. Biochem.* 1979. V. 98. № 12. P. 1670—1676.
19. Горбач В. И., Иванчина Е. В., Исаков В. В., Лукьянов П. А., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // *Биоорганич. химия.* 1982. Т. 8. № 12. С. 1670—1676.
20. Горбач В. И., Лукьянов П. А., Красикова И. Н., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // *Биоорганич. химия.* 1987. Т. 13. № 10. С. 1409—1415.
21. Permyakov E. A., Burstein E. A., Sawada Y., Jamazahi J. // *Biochem. et biophys. acta.* 1977. V. 491. № 1. P. 149—154.
22. Oberfelder R. W., Lee J. C. // *Meth. Enzymol.* 1985. V. 117. P. 385—388.

Поступила в редакцию
29.I.1993

После доработки
6.IV.1993

L. I. Fedoreyeva, V. I. Gorbach

**INTERACTION OF OUTER MEMBRANE PROTEIN FROM
Yersinia pseudotuberculosis WITH LIPID A AND
ITS SYNTHETIC ANALOGS**

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok*

Interaction of the major outer membrane protein form *Yersinia pseudotuberculosis* with lipid A was investigated by intrinsic fluorescence, CD spectroscopy and CsCl gradient centrifugation methods. The protein was shown to have two independent binding sites with an association constant $6,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. The interaction depends on both the type of the glycoside bond and hydrophylic — hydrophobic balance of the glycolipid molecule.