



УДК 579.84:577.112.314.6+616.097.612.017+547.458.22:118.057

КООПЕРАТИВНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ БЕЛКОМ-ПОРИНОМ И ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ

© 1996 г. Г. А. Набережных[#], В. А. Хоменко, И. Н. Красикова, Н. Ю. Ким, Т. Ф. Соловьева

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 15.12.95 г.

Изучено взаимодействие порообразующего белка (порина) из наружной мембраны бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* с S- и R-формами липополисахарида этой бактерии. Из анализа результатов равновесного связывания ¹²⁵I-меченых S- и R-ЛПС, а также конкурентного ингибирования данной реакции липидом А, олигосахаридом кора и O-специфическим полисахаридом следует, что на молекуле порина имеются места связывания, специфичные для названных выше фрагментов молекулы ЛПС. Связывание R-ЛПС происходит на независимых участках двух типов с K_a , равными 1.7×10^5 и $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. S-ЛПС взаимодействует с порином с положительной кооперативностью (h 1.6) и K_a $0.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Количество мест связывания определено равным 9 и 4 соответственно для R- и S-ЛПС. Обсуждаются молекулярные механизмы взаимодействия.

Ключевые слова: порин, липополисахарид, связывание, кооперативность.

Отличительной особенностью грамотрицательных бактерий является наличие у них кроме внутренней, цитоплазматической, еще и наружной мембраны (НМ). В состав НМ входят фосфолипиды, липополисахариды (ЛПС) и белки. ЛПС – амфифильные биополимеры, сочетающие в пределах одной молекулы гидрофобный (липид А) и гидрофильные (O-специфические полисахаридные цепи и олигосахарид кора) фрагменты. R-ЛПС отличается от S-формы отсутствием в нем O-специфического полисахарида. Олигосахарид кора, который соединяет липид А и O-полисахарид, концентрирует на себе отрицательный заряд за счет присутствия фосфатных групп и остатков 2-кето-3-дезоксооктоновой кислоты. Одними из основных белков НМ являются так называемые порины – белки, которые состоят из трех идентичных субъединиц и образуют в мембране диффузные поры [1].

В НМ между поринами и ЛПС существует специфическое взаимодействие, которое играет важную роль в молекулярной организации мембраны, в поддержании ее стабильности [1]. Комплексы порин-ЛПС выполняют важные функции в клетке: они являются рецепторами фагов, колицинов, участвуют в процессе конъюгации клеток и образовании пор в мембране [2]. Связывание

порина с ЛПС обеспечивает олигомеризацию и встраивание белка в мембрану [3].

Несмотря на то что важность комплексообразования порина с ЛПС для жизнедеятельности бактериальной клетки доказана во многих работах, этот процесс практически не исследован. Неизвестен механизм взаимодействия, силы, в нем участвующие; требуют уточнения и определения количественные характеристики этой реакции.

В литературе имеются лишь ограниченные данные о стехиометрии комплексов порин-ЛПС, о влиянии строения ЛПС на эффективность комплексообразования [4–6]. Надо отметить, что они получены главным образом при изучении строения НМ мутантных штаммов бактерий и при анализе выделенных из них функционально активных комплексов.

В настоящее время нашей группой проводится систематическое изучение взаимодействия между порином и ЛПС. Используя метод собственной белковой флуоресценции, мы показали, что частично денатурированный мономер порина из *Yersinia pseudotuberculosis* специфически связывается с липидом А, и определили характеристики связывания [7], а также исследовали взаимодействие этого белка с ЛПС [8].

Данная работа посвящена изучению взаимодействия тримера порина из *Y. pseudotuberculosis* с эндогенными S- и R-ЛПС с применением радиоактивно меченых лигандов.

Сокращения: ЛПС – липополисахарид, НМ – наружные мембраны.

[#] Автор для переписки.

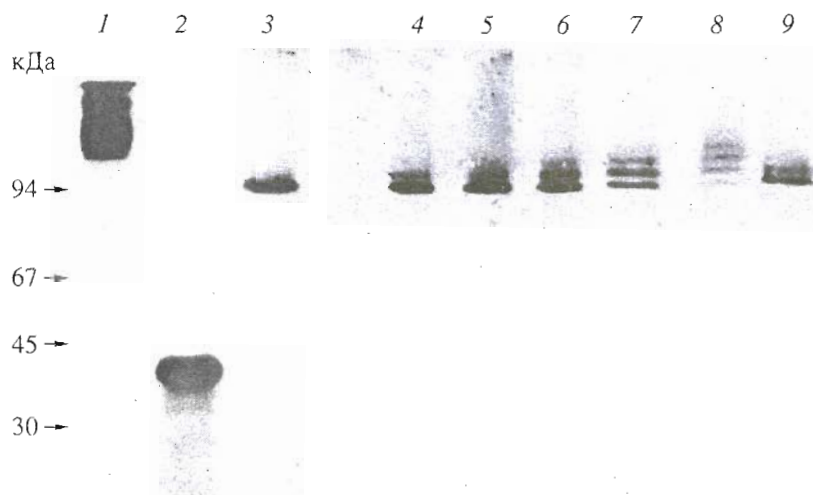


Рис. 1. Электрофореграмма иерсинина (1, 2), очищенного от ЛПС иерсинина (3), комплексов очищенного иерсинина (40 мкг) с 2,5; 5; 10 мкг S-ЛПС (4–6) и с 2,5; 5; 10 мкг R-ЛПС (7–9). Образец 2 получен нагреванием образца 1 в 1% растворе SDS при 100°C в течение 5 мин. Образцы 1, 3–9 выдерживали в 1% растворе SDS 30 мин при 20°C. Слева дано положение белков-маркеров с указанием молекулярной массы.

Иерсинин, основной порообразующий белок НМ псевдотуберкулезного микроба [9], был выделен из клеток в олигомерной форме по методу Нюрминена [10]. Подобно поринам из других бактерий, выделенный из клеток и очищенный стандартными методами препарат иерсинина содержит до 5% ЛПС. Мономер иерсинина, по данным SDS-ПААГ-электрофореза, имеет кажущуюся молекулярную массу 40 кДа (рис. 1, дорожка 2). При SDS-ПААГ-электрофорезе без предварительного кипячения образца белка олигомер иерсинина обнаруживается в виде мультиплета в области, соответствующей 105–120 кДа (рис. 1, дорожка 1). Наблюдаемая множественность полос, как считается [6], вызвана присутствием в белке связанного ЛПС. Для отделения ЛПС от белков-поринов требуются достаточно жесткие условия обработки [11]. Мы выдерживали образец белка в 30% SDS с последующим фракционированием на сефадексе G-200 в 0,5% SDS. Полученный в результате белок, свободный от ЛПС, на электрофореграмме обнаруживался в виде одной полосы, отвечающей молекулярной массе около 90 кДа (рис. 1, 3), несколько меньшей, чем у исходного иерсинина). Ранее для тримерного порина из *Escherichia coli* было также отмечено уменьшение кажущейся молекулярной массы по сравнению с его массой в комплексе с ЛПС [4]. У исходного и очищенного от ЛПС образцов иерсинина с помощью флуоресцентной спектроскопии были обнаружены некоторые различия в окружении ароматических аминокислот (данные не приведены).

При добавлении S- и R-ЛПС к очищенному порину на электрофореграмме вновь появляется мультиплетный набор полос, а подвижность белка несколько уменьшается (рис. 1, дорожки 4–9). Таким образом, из полученных данных видно, что

после очистки иерсинин сохранил способность взаимодействовать с ЛПС и этот процесс обратим.

Для дальнейшего изучения процесса связывания и определения его количественных характеристик было предпринято титрование иерсинина радиоактивно меченым ЛПС ($[^{125}\text{I}]\text{ЛПС}$). Чтобы оценить влияние структуры ЛПС на связывание, в качестве лиганда были использованы два ЛПС: S-ЛПС, имеющий полную структуру, и R-ЛПС, в молекуле которого отсутствуют O-цепи. Для того чтобы обеспечить отделение комплекса от свободного лиганда, порин был иммобилизован на сефарозе 4В.

Связывание иерсинина с ЛПС носит специфический характер, поскольку, как видно из рис. 2, может быть достигнуто полное насыщение мест связывания на белке лигандом. Кроме того, было показано, что немеченый лиганд способен вытеснить меченый из его комплекса с белком.

Изучение процесса связывания порина с ЛПС осложняется методическими трудностями, связанными с тем, что взаимодействующие компоненты являются мембранными соединениями и в водных средах не дают истинных растворов. Как известно, порины подобно другим мембранным белкам растворяются в водных буферах только в присутствии детергентов [1]. При этом они сохраняют вторичную и третичную структуры, даже если в качестве детергента используется 0,25% SDS [12]. Это позволяет надеяться, что в выбранных нами условиях (0,025% SDS) порины будут взаимодействовать с ЛПС так, как это осуществляется в мембране.

Экспериментальные данные, представленные в виде графиков Скэтчарда (рис. 3), свидетельствуют о сложном характере взаимодействия

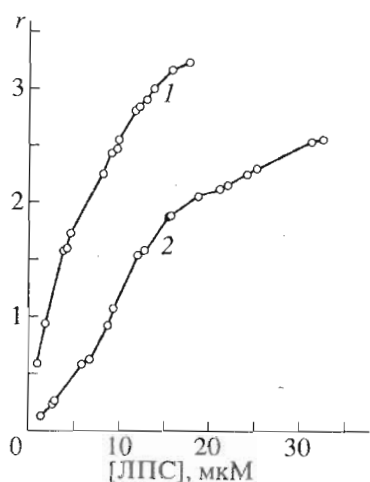


Рис. 2. Зависимость насыщения иерсинина липидным лигандом от концентрации для R-ЛПС (1) и S-ЛПС (2). Условия: белок (конечная концентрация 2 мкМ), связанный с 0.05 мл сефарозы 4 В, в 0.4 мл 0.02 М трис-НСl-буфера, рН 7.2, содержащего 0.025% SDS. S- и R-ЛПС растворяли в том же буфере, r – отношение концентраций связанного ЛПС и белка.

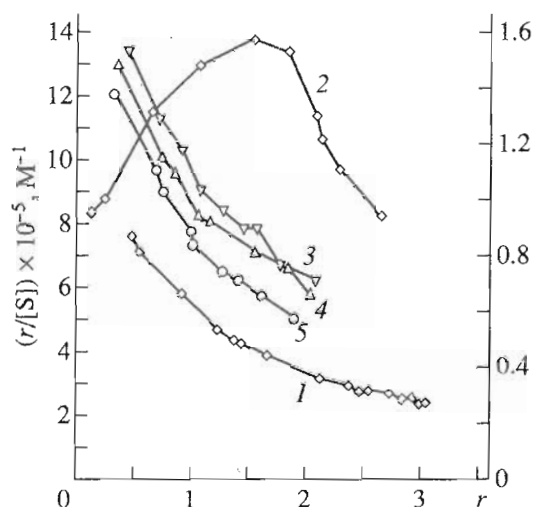


Рис. 3. Графики Скэтчарда для связывания порина с R-ЛПС (1), S-ЛПС (2–5) без ингибиторов (2), в присутствии O-полисахарида (3), кора (4), липида А (5). Условия и значение r см. рис. 2, [S] – концентрация свободного ЛПС. Левая ось ординат – значения для R-ЛПС (1), правая – для S-ЛПС (2–5).

тримеров порина с ЛПС. Как показывает сравнительный анализ результатов связывания S- и R-ЛПС, характер взаимодействия в значительной степени определяется особенностями строения молекулы ЛПС.

Методом конкурентного ингибирования было установлено, что все три основные структурные области молекулы ЛПС (липид А, олигосахарид кора и O-специфические полисахаридные цепи) частично тормозят связывание порина с лигандом. При этом каждый из фрагментов молекулы ЛПС ингибирует реакцию взаимодействия примерно в одинаковой степени (рис. 4), за исключением ингибирования O-полисахаридом связывания R-ЛПС, в котором O-цепи отсутствуют (рис. 4а, кривая 4). Эти результаты позволяют предположить наличие на белке-порине мест связывания, специфичных к разным участкам молекулы ЛПС.

Литературные данные не противоречат этому выводу. Существуют, хотя и не прямые, но достаточно веские доказательства того, что и липид А, и внутренняя область олигосахаридного кора принимают участие во взаимодействии ЛПС с порином [13]. В то же время такие данные отсутствуют относительно O-полисахаридных цепей, в силу чего показанная нами для S-ЛПС способность ингибировать реакцию связывания O-специфическим полисахаридом оказалась весьма неожиданной. Можно было предположить, что O-цепи загрязнены ЛПС или олигосахаридом кора и эти примеси обуславливают их ингибирующую активность. Но, с другой стороны, тот же самый образец O-цепей не ингибирует связывание R-ЛПС с порином. И это позволяет считать, что наблюдаемая инги-

бирующая активность O-специфического полисахарида не является артефактом.

Несколько более крутой подъем кривой ингибирования липидом А среди других кривых (рис. 4а, 4б, кривые 2), видимо, свидетельствует о более высокой аффинности участков порина, специфичных для липида А, по сравнению с другими местами связывания. Ранее для ряда ЛПС-связывающих белков также было показано, что липид А играет доминантную роль в их взаимодействии с ЛПС [14].

Участки связывания, специфичные к липиду А, вероятно, расположены на той части поверхности белка-порина, которая погружена в мембрану. Подходящим кандидатом на область связывания с углеводным фрагментом ЛПС может быть участок полипептидной цепи порина, соответствующий участку молекулы порина из *E. coli*, расположенному между Ala-108 и Val-133, который экспонирован на поверхности мембраны, участвует во взаимодействии с другими компонентами мембраны и коренным образом влияет на ее проницаемость для гидрофобных антибиотиков и детергентов [15].

График Скэтчарда, описывающий равновесное связывание порина с R-ЛПС (рис. 3, кривая 1), имеет вид вогнутой кривой, что позволяет предполагать существование нескольких классов мест связывания на белке, гетерогенность компонентов или отрицательную кооперативность [16]. Учитывая молекулярную структуру лиганда и результаты опытов по ингибированию, наиболее подходящей представляется модель, согласно которой связывание ЛПС с белком происходит на

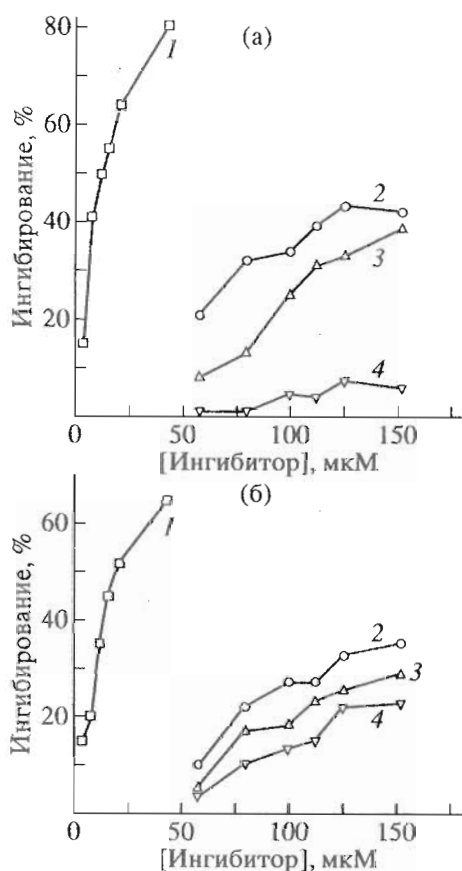


Рис. 4. Ингибирование связывания нерсинина с R-ЛПС (а) и S-ЛПС (б). Ингибиторы: R-ЛПС (а, 1), S-ЛПС (б, 1), липид А (2), кора (3), O-полисахарид (4).

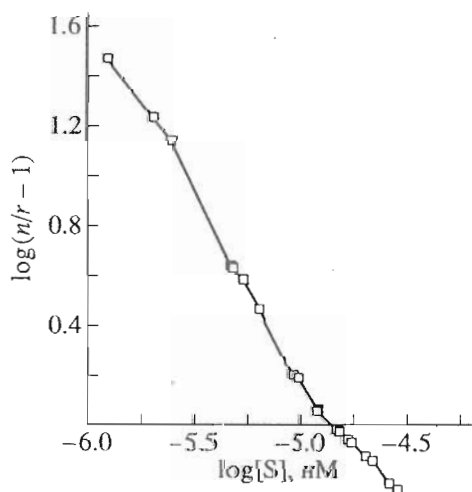


Рис. 5. График Хилла для связывания S-ЛПС с нерсинином. Обозначения см. на рис. 2 и 3; n – число участков связывания на белке.

независимых сайтах двух типов с K_a 1.7×10^5 и $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, которые специфичны для двух областей молекулы ЛПС: липида А и олигосахарида кора. Связывание R-ЛПС, вероятно, происходит вначале по более аффинным центрам (как выше

предполагалось, специфичных для липида А), а затем по менее аффинным. Нельзя исключить и другой механизм: при низкой концентрации R-ЛПС происходит его высокоаффинное бивалентное связывание, а при повышении концентрации лиганда имеет место низкоаффинное моновалентное связывание.

Усложнение молекулы R-ЛПС за счет присоединения O-специфических цепей (S-ЛПС) приводит к изменению характера взаимодействия ее с порином. График Скэтчарда для этого случая имеет восходящую ветвь в области низких концентраций связанного лиганда (рис. 3, кривая 2), что позволяет предполагать положительную кооперативность при связывании. Константа связывания для взаимодействия порин–S-ЛПС и степень кооперативности (коэффициент Хилла, рис. 5), которые были рассчитаны как описано в “Экспериментальной части”, составили $0.75 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ и 1.6.

Было исследовано также взаимодействие порина с S-ЛПС в присутствии липида А, олигосахарида кора и O-полисахарида. Соответствующие графики Скэтчарда при концентрации каждого лиганда 10^{-6} M приведены на рис. 3 (кривые 3–5). При этой концентрации лигандов не наблюдается положительной кооперативности при связывании порина с ЛПС, но форма кривых свидетельствует о наличии нескольких классов связывающих мест. Полученные результаты показывают, что имеет место перекрывание участков связывания на белке для S-ЛПС и всех вышеназванных лигандов, имеющих структуру фрагментов молекулы ЛПС.

Можно предположить, что O-полисахарид – тот фрагмент молекулы ЛПС, который отвечает за кооперативное связывание. Кооперативность, возможно, является результатом взаимодействия между молекулами S-ЛПС, связанными с белком, через O-полисахаридные цепи. Этот тип углеводного взаимодействия был описан для молекул ЛПС, образующих агрегат [17]. Взаимодействию может способствовать то, что связывание на соседних центрах создает относительно высокую локальную концентрацию ЛПС и обеспечивает время контакта, необходимое для создания комплекса. Однако для того, чтобы окончательно решить вопрос о механизме кооперативности, необходимы дальнейшие исследования. Нельзя исключить и тот вариант, что мы имеем случай кажущейся положительной кооперативности из-за гетерогенности образца ЛПС. В литературе описан пример, когда выпуклая форма графика Скэтчарда была вызвана только гетерогенностью лиганда [16]. В настоящее время проводится фракционирование ЛПС, чтобы получить более гомогенный образец и исследовать его связывание с порином.

Обращает на себя внимание тот факт, что, как показывает сравнение данных, полученных в этой работе и опубликованных недавно [7, 8], изменение конформации порина (переход от тримера к мономеру с частично нарушенной третичной структурой) не влияет на характер ЛПС-белкового взаимодействия. Следовательно, в формировании мест связывания на белке третичная и четвертичная структуры не играют существенной роли. В связи с этим вклад конформационных превращений в порине при связывании с ЛПС в механизм кооперативности маловероятен.

О влиянии О-полисахаридных цепей на взаимодействие порина с ЛПС сообщалось ранее. Было показано более высокое сродство S-ЛПС к белку в сравнении с R-ЛПС [5] (K_a 1.1×10^6 и 0.7×10^6 M^{-1} соответственно). Ранее также сообщалось [4], что в НМ *E. coli* порин предпочтительно связывается с S-ЛПС, несмотря на присутствие достаточного количества R-ЛПС. Высказывалось предположение, что наблюдаемое различие во взаимодействии порина с S- и R-ЛПС обусловлено различиями в их пространственной организации в водных средах [4]. Однако различие между данными для S- и R-ЛПС в наших экспериментах нельзя объяснить подобным образом, поскольку 0.025% SDS, в присутствии которого проводится связывание, вызывает диссоциацию агрегатов ЛПС [18].

Полученное в данной работе значение K_a для S-ЛПС было ниже, чем для R-ЛПС. Кроме того, величины константа для обеих форм ЛПС представляются слишком низкими, если принять во внимание высокую стабильность комплексов порин-ЛПС, выделяемых из мембраны, и значения K_a для комплексообразования мембранных белков с ЛПС, определенные методом аффинного электрофореза [5] (см. выше).

Такие результаты могут быть следствием того, что мы не учитываем влияния SDS на связывание. Присутствие детергента в реакционной среде приводит к тому, что ЛПС взаимодействует с ним и, вероятно, распределяется между двумя фазами: водной и мицеллярной. Можно предположить, что белок, который, как известно [19], образует смешанные мицеллы с SDS, будет связываться с ЛПС, включенным в эти мицеллы. Если эта модель справедлива, то концентрация ЛПС, взаимодействующего с порином, будет зависеть от его коэффициента распределения мицелла-вода и не будет совпадать с концентрацией ЛПС, введенного в реакцию. Следовательно, K_a , рассчитанные без учета этого обстоятельства, будут занижены. Поскольку коэффициент распределения для S-ЛПС будет ниже, чем для более гидрофобного R-ЛПС, K_a для него будет занижена в большей степени.

Общее число мест связывания R-ЛПС на тримере порина было определено равным девяти,

т.е. по три на каждую из трех идентичных субъединиц белка. Количество S-ЛПС, связанного в комплексе, составляет 4 моль на 1 моль белка. Наблюдаемое уменьшение количества мест связывания на белке для S-ЛПС по сравнению с R-ЛПС может быть результатом экранирования части мест О-полисахаридными цепями S-ЛПС. К такому же результату может привести экранирование О-цепями участков олигосахарида кора, взаимодействующих с белком [20].

По литературным данным [6], стехиометрия функционально активных комплексов может колебаться от 1 до 10 моль ЛПС на 1 моль тримера порина. Недавно из *E. coli* были получены устойчивые в условиях электрофореза в присутствии детергента комплексы, в которых на 1 моль тримера приходится 9 моль ЛПС, из них 1 моль ЛПС связан с белком особенно прочно [21]. Тот факт, что в наших экспериментах в точке насыщения белок связывает меньше ЛПС, чем в комплексах, выделенных из клеток, может быть вызван несколькими причинами. В частности, возможно, что в комплексах из *E. coli* часть ЛПС не связана непосредственно с белком, а ассоциирована с другими молекулами ЛПС. Кроме того, параметры взаимодействия могут зависеть от структуры ЛПС и от условий проведения реакции связывания, например от присутствия двухвалентных катионов. Это составляет предмет наших дальнейших исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные культуры *Y. pseudotuberculosis* (IV подсеровар, штамм 3260) выделены от больного. Культуры выращивали как описано в работе [9].

Выделение и очистка иерсинина. Олигомер порина (иерсинин) получали по методу, описанному в работе [10], включающему расщепление пептидогликанового слоя НМ лизоцимом. Очистку порина от сопутствующих белков проводили с помощью гель-хроматографии на ультрагеле AcA 34 в 0.02 М трис-НСl-буфере, рН 7.2 (буфер А), содержащем 0.25% SDS. Степень очистки образцов порина определяли с помощью SDS-ПААГ-электрофореза по Лэммли [22]. Белки, разделенные в геле, окрашивали раствором кумасси ярко-голубого G-250 в 3.5% хлорной кислоте. Для определения молекулярной массы полипептидов по методу, описанному в работе [23], использовали белки-маркеры (M , кДа): карбогидразу (30), яичный альбумин (45), бычий сывороточный альбумин (67), фосфорилазу В (94). Содержание белка определяли по модифицированному методу Лоури в присутствии 2% SDS [24], моносахариды — стандартным методом [25].

ЛПС отделяли от порина по методу, описанному в работе [11], с некоторыми модификациями.

Образец белка выдерживали 2 ч при 20°C в буфере А, содержащем 30% SDS, и фракционировали на колонке (60 × 2 см) с сефадексом G 200 в буфере А, содержащем 0.2 М NaCl, 1 мМ EDTA и 0.5% SDS. Содержание ЛПС во фракциях контролировали тестом с тиобарбитуровой кислотой [26] и SDS-ПААГ-электрофорезом, окрашивая гелионами серебра по методу [27].

Выделение и очистка ЛПС. S-Форму ЛПС выделяли из бактерий *Y. pseudotuberculosis*, выращенных на холоду, экстракцией клеток смесью фенол-хлороформ-петролейный эфир (5 : 5 : 8) по модифицированному методу Галаноса [28]. В эксперименте использовали фракцию, полученную из фенольного слоя осаждением ацетоном после предварительного отделения короткоцепочечных ЛПС. Средняя длина цепи O-специфического полисахарида этой популяции молекул равна 9.8, средняя молекулярная масса ЛПС – 12 кДа.

ЛПС R-формы получали экстракцией бактериальных клеток, выращенных при 37°C, горячим водным фенолом по методу Вестфаля [29]. По данным SDS-ПААГ-электрофореза [22] и ГЖХ [29], ЛПС не содержит O-специфического полисахарида, его средняя молекулярная масса равна 3.5 кДа. Липид А получали по методу [30], O-специфический полисахарид – как описано в работе [31]. Кроме того, в работе использовали R-ЛПС и олигосахарид кора, любезно предоставленные С.В. Томшич (ТИБОХ ДВО РАН). Анализ углеводной части ЛПС проводили методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов как описано [29], используя ксилозу в качестве внутреннего стандарта.

Введение подной метки в ЛПС и иерсинии. ЛПС (2 мг) растворяли в 0.2 мл воды, добавляли 4 мг бромциана и смесь перемешивали 8 мин при 0°C и pH 10, после чего добавляли 1 мг тирамина, устанавливали pH 8, добавляя 0.2 М NaHCO₃, смесь перемешивали 16 ч при 20°C. Тираминированный ЛПС выделяли гель-хроматографией на сефадексе G-50 в буфере А.

¹²⁵I-иодирование тираминированного ЛПС и иерсинина проводили с помощью хлорамина Т согласно работе [32]. Удельная радиоактивность [¹²⁵I]ЛПС составила 2 × 10⁴ имп/мин на 1 мкг, для белка – 1.7 × 10⁵ имп/мин на 1 мкг.

Получение иерсинин-сефарозы. Порин (10 мг), очищенный от ЛПС, диализовали против сменяемого 0.2 М NaHCO₃, содержащего 0.25% SDS. Раствор диализованного белка смешивали с 10 мл сефарозы 4В, активированной бромцианом, смесь перемешивали 16 ч при 20°C. Сорбент промывали буфером А и для блокирования остаточных активных групп суспензию перемешивали с 20 мл 1 М моноэтаноламина (pH 8) в течение 2 ч, после чего сорбент промывали буфером А, содержа-

щим 0.25% SDS, 0.02% азид натрия, и хранили в этом буфере.

Количество иммобилизованного белка (15.2 нмоль на 1 мл сефарозы) определяли с помощью [¹²⁵I]иерсинина, который добавляли в реакционную смесь при связывании порина с сефарозой 4В.

Определение равновесных параметров взаимодействия [¹²⁵I]ЛПС с иммобилизованным иерсинином. Иерсинин-сефарозу отмывали 0.02 М трис-HCl (pH 7.2), содержащим 0.025% SDS (буфер Б), и суспендировали в равном объеме этого буфера. По 0.05 мл иерсинин-сефарозы (конечная концентрация белка в реакционной смеси 1.9 мкМ) смешивали с разными объемами 40 мкМ раствора [¹²⁵I]ЛПС (конечные концентрации 2–32 мкМ), объем среды доводили до 0.4 мл буфером Б и смесь встряхивали в течение 24 ч при 20°C, после чего центрифугировали. Осажденные сорбенты промывали и определяли радиоактивность связанного ЛПС на гамма-счетчике RIA-GAMMA (LRB, Швеция), вычитая радиоактивность меченого белка, привязанного к сефарозе.

Связывание [¹²⁵I]ЛПС с порином в присутствии ингибиторов: O-специфического полисахарида, кора и липида А – проводили аналогично описанному выше методу, добавляя в реакционную смесь ингибиторы в концентрации 4–160 мкМ.

Для определения неспецифической сорбции [¹²⁵I]ЛПС на иерсинин-сефарозе связывание проводили в присутствии 100-кратного избытка немеченого гомологичного ЛПС. Неспецифическое связывание составило 8–10%.

По данным связывания строили график в координатах Скэтчарда. При расчете параметров связывания R- и S-ЛПС применяли аналитический метод, предложенный в работе [33], и компьютерную программу, разработанную на основе этого метода А.В. Кукарских. Для описания взаимодействия R-ЛПС с порином использовали модель связывания с двумя типами независимых центров на молекуле белка:

$$r/[S] = n_1 K_1 / (1 + K_1 [S]) + n_2 K_2 / (1 + K_2 [S]).$$

Параметры связывания S-ЛПС с белком рассчитывали исходя из модели кооперативного взаимодействия:

$$r/[S] = n K^h [S]^{h-1} / (1 + K^h [S]^h).$$

Степень кооперативности определяли из уравнения Хилла в логарифмической форме [34]:

$$\log(n - r/r) = -h \log K - h \log [S],$$

где r – отношение концентрации связанного ЛПС к концентрации внесенного белка, $[S]$ – концентрация свободного ЛПС, n – число участков связывания на молекуле порина, K – константа ассоциации, h – коэффициент Хилла.

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук С.В. Томшич (ТИБОХ ДВО РАН) за консультативную помощь при выполнении работы, а также А.В. Кукарских за составление расчетной программы.

Работа выполнена при поддержке Международного научного фонда (грант NYZ000) и совместного гранта Международного научного фонда, Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства России (NYZ300).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hitchcock P.J., Morrison D.C. // Handbook of Endotoxin: Chemistry of Endotoxin. V. 1 / Ed. E.T. Rietschel. N.Y.: Elsevier Inc., 1984. P. 339–375.
- Lugtenberg B., van Alphen L. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 737. P. 51–115.
- Sen K., Nikaido H. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 926–928.
- Diedrich D.L., Stein M.A., Schnaitman C. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 5307–5311.
- Bornelit P., Bleschmidt D., Kleber H.-P. // Electrophoresis. 1990. V. 10. P. 848–852.
- Roque W.J., Coughlin R.T., McGroarty E.J. // J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 4003–4010.
- Федореева Л.И., Горбач В.И. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 933–940.
- Федореева Л.И., Соловьева Т.Ф. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 17–23.
- Новикова О.Д., Лихацкая Г.Н., Фролова Г.М., Восстрикова О.П., Хоменко В.А., Тимченко Н.Ф., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 7. С. 453–461.
- Nurminen M., Lounatmaa K., Sarvas M., Makela P.H., Nakaе T. // J. Bacteriol. 1976. V. 127. P. 941–995.
- Todt J.C., Rocque W.J., McGroarty E.J. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 10471–10478.
- Новикова О.Д., Федореева Л.И., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Ермак И.М., Лихацкая Г.Н., Мороз С.И., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 536–547.
- Yamada H., Mizushima S. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 103. P. 209–218.
- Kielian T.L., Blecha F. // Immunopharmacology. 1995. V. 29. P. 187–205.
- Benson S.A., Occi J.L.L., Sampson B.A. // J. Mol. Biol. 1988. V. 203. P. 961–970.
- Mendel C.M., Licko V., Kane J.P. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 3451–3455.
- Peterson A.A., Haug A., McGroarty E.J.H. // J. Bacteriol. 1986. V. 165. P. 116–122.
- Jann B., Reske K., Jann K. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 60. P. 239–244.
- Le Maire M.K., Andersen J.P., Moller J.V. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 129. P. 525–532.
- Rana F.R., Masias E.A., Sultany C.M., Modzakowski M.C., Blazyk J. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 5858–5866.
- Holzenburg A., Engel A., Kessler R., Manz U.J., Lustig A., Aebi U. // Biochemistry. 1989. P. 4187–4193.
- Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 2. P. 680–685.
- Rosenbusch J.P. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 8019–8029.
- Kashyar M.L., Hynd B.A., Robinson K.J. // J. Lipid Res. 1980. V. 21. P. 481–484.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
- Burtseva T.I., Glebko L.I., Ovodov Yu.S. // Anal. Biochem. 1975. V. 64. P. 1–4.
- Hitchcock P.J., Brown T.M. // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
- Galanos C., Luderitz O. // Eur. J. Biochem. 1969. V. 9. P. 245–249.
- Westphal O., Luderitz O., Bister F.I. // Z. Naturforsch. 1952. V. 7b. P. 148–155.
- Krasikova I.N., Gorbach V.I., Solov'eva T.F., Ovodov Yu.S. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 89. P. 287–289.
- Набережных Г.А., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 1089–1095.
- Такач Б., Штеелин Т. Иммунология: Методы исследования. М.: Мир, 1983. С. 39–71.
- Thakur A.K., Jaffe M.L., Rodhard D. // Anal. Biochem. 1980. V. 107. P. 279–295.
- Ward L.D., Timasheff S.N. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 11891–11899.

Cooperative Porin-Lipopolysaccharide Interaction

G. A. Naberezhnykh, V. A. Khomenko, I. N. Krasikova, N. Yu. Kim, and T. F. Solov'eva

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

Abstract—The interaction of the pore-forming protein (porin) from the outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis* with the S- and R-forms of lipopolysaccharide (LPS) from this bacterium was studied. Analysis of the equilibrium binding of ¹²⁵I-labeled S- and R-LPS, as well as the competitive inhibition of this reaction by lipid A, core oligosaccharide, and O-specific polysaccharide, suggests that there are binding sites on the porin molecule specific to these fragments of the LPS molecule. The binding of R-LPS occurs at independent sites of two classes with K_a 1.7×10^5 and 1.1×10^5 M⁻¹. S-LPS interacts with porin with positive cooperation (h 1.6) and K_a 0.8×10^5 M⁻¹. The number of binding sites was found to be nine and four for R- and S-LPS, respectively. Molecular mechanisms of the interaction are discussed.

Key words: porin, lipopolysaccharide, binding, cooperativity.