



УДК 577.112' 314.6.083+616.097.612.017

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПОРИНА ИЗ *Yersinia pseudotuberculosis*

© 1999 г. О. Д. Новикова[#], Н. Ю. Ким, В. П. Глазунов, Т. И. Вакорина, Г. А. Набережных, Г. Н. Лихацкая, В. А. Хоменко, Т. Ф. Соловьева

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

Поступила в редакцию 23.03.98 г. Принята к печати 20.05.98 г.

Исследованы изменения в структуре и функциональной активности белка-порина из *Yersinia pseudotuberculosis*, происходящие в результате отделения связанного липополисахарида (ЛПС). Обработка порина, содержащего ЛПС, 30% раствором SDS приводит к получению свободного от ЛПС белка, который, по данным SDS-ПААГ-электрофореза, сохраняет тримерную форму. Методами спектроскопии КД, УФ и собственной белковой флуоресценции показано, что отделение ЛПС вызывает изменение конформации порина на уровне вторичной и третичной структуры белка. Очищенный от ЛПС порин представляет собой полностью β -структурированный агрегат белка. С помощью техники бислойных липидных мембран показано, что порообразующая активность порина при удалении связанного ЛПС снижается, действующая концентрация белка при этом увеличивается на два порядка. Инкубация очищенного белка с ЛПС приводит к образованию комплекса ПОР+ЛПС и влияет на характер функциональной активности белка. Обработка очищенного порина неионным детергентом октилглюкозидом приводит к восстановлению его порообразующей активности. Высказано предположение о том, что роль ЛПС или детергента состоит в создании определенной конформации белка, необходимой для проявления порином функциональной активности.

Ключевые слова: порины наружной мембраны грамотрицательных бактерий; взаимодействие с липополисахаридом; порообразующие свойства; конформационные переходы; методы оптической спектроскопии; липополисахариды.

В состав наружной мембраны грамотрицательных бактерий входят фосфолипиды, специфический амфифильный биополимер – ЛПС и ограниченное число белков. Среди последних в количественном отношении доминируют белки-порины, которые, занимая трансмембранное положение, образуют водонаполненные поры. Через них в клетку поступают гидрофильные вещества с молекулярной массой не более 600–700 Да. Взаимодействие поринов и ЛПС в нативной мембране играет определяющую роль в образовании пространственной структуры этих белков [1] и в процессе встраивания тримера порина в бактериальную мембрану [2]. По поводу значения ЛПС для функциональной активности белков-поринов среди исследователей не существует единого мнения. Большинство авторов считает, что наличие прочно связанного ЛПС имеет решающее значе-

ние для проявления порообразующих свойств белка [3]; отделение ЛПС приводит к потере функциональной активности порина [4]. Однако встречаются отдельные сообщения о сохранении способности поринов к образованию пор в модельной мембране также и в отсутствие ЛПС [5].

Выделение и очистку поринов проводят обычно в присутствии детергентов [6] и, как правило, полученные образцы этих мембранных белков содержат некоторое количество ЛПС – от 1 [7] до 9 моль [8] на моль тримера порина. Это объясняется высокой прочностью связи ЛПС-белок, обусловленной одновременно гидрофобными, водородными и электростатическими взаимодействиями [6]. По этой причине получение образцов поринов, не содержащих ЛПС, представляет определенную методическую проблему. Кроме того, разные группы авторов используют разные методы анализа связанного ЛПС в полученных образцах поринов и различные подходы при реконструкции белка в БЛМ. Перечисленные обстоятельства порождают упомянутую выше противоречивость сведений, имеющих в литературе по поводу функциональной значимости ЛПС, ассоциированного с порином.

Сокращения: ЛПС – липополисахарид; ПОР_{ЛПС} – исходный порин, содержащий ЛПС; ПОР – порин, очищенный от ЛПС; БЛМ – бислойная липидная мембрана; SDS-ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS; OG – *n*-октил- β -D-глюкопиранозид.

[#] Автор для переписки (тел.: (4232) 311-430; e-mail: novikova@piboc.marine.su).

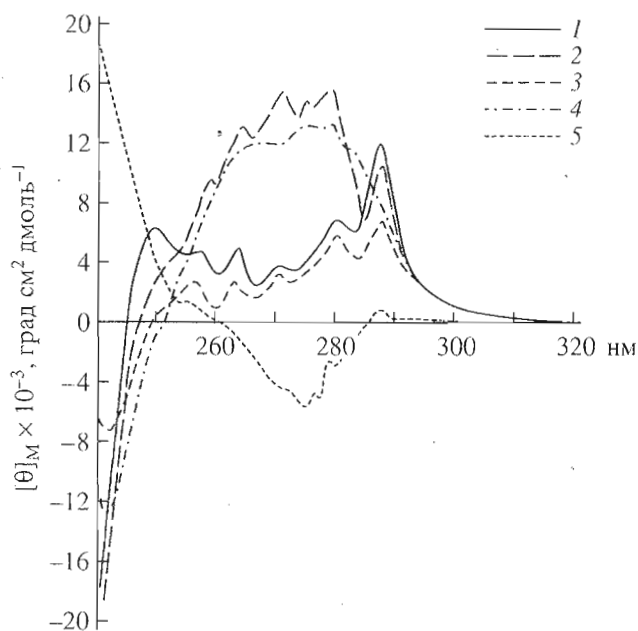


Рис. 1. Спектры КД образцов порина из псевдотуберкулезного микроба в ароматической области: ПОР_{ЛПС} в 0.25% SDS (1) и в 0.1% SDS (2); ПОР в 0.25% SDS (3) и в 0.25% OG (4); ПОР+ЛПС (1 : 30 моль/моль) в 0.25% SDS (5).

К настоящему времени получены экспериментальные данные о том, что в процессе сборки поринов в мембране, происходящей в присутствии ЛПС, белок претерпевает ряд конформационных изменений [9]. Однако структурные особенности образующихся при этом промежуточных состояний порина, так называемых конформационных интермедиатов, изучены недостаточно. Особый интерес представляет исследование физико-химических свойств последних во взаимосвязи с функциональной активностью белка.

Настоящая работа посвящена исследованию изменений в структуре и функциональной активности порина из *Yersinia pseudotuberculosis*, происходящих в результате отделения связанного ЛПС. Методами кругового дихроизма, УФ-спектроскопии и собственной белковой флуоресценции охарактеризована пространственная организация ЛПС-содержащего порина (ПОР_{ЛПС}) и порина, очищенного от ЛПС (ПОР). Методом реконструкции белка в БЛМ проведено сравнительное изучение порообразующей активности этих препаратов порина. Показано, что удаление ЛПС приводит к новому конформационному состоянию молекулы порина. Установление особенностей пространственной структуры и порообразующей активности вышеуказанных конформеров порина важно для понимания молекулярных механизмов функциональной активности поринов и роли связанного ЛПС в этом процессе.

Получение образцов порина из *Y. pseudotuberculosis*. Для сравнительного физико-химического исследования в настоящей работе были использованы два образца порина из *Y. pseudotuberculosis*. Первый образец, ПОР_{ЛПС}, получали при расщеплении пептидогликанового слоя лизоцимом по методу [10]. Подобно поринам других бактерий [6], выделенным и очищенным по стандартным методикам, образец ПОР_{ЛПС} содержал не более 5% ЛПС, что составляет не более двух моль на моль тримера порина. Второй образец порина получали при обработке ПОР_{ЛПС} 30% раствором SDS с последующей гель-хроматографией по методу, описанному в работе [11]. Этот образец (ПОР) давал отрицательную реакцию на ЛПС в тесте с тиобарбитуровой кислотой [12].

Ранее нами было показано [13], что порин в образце ПОР_{ЛПС} находится в виде тримера, электрофоретическая подвижность данной формы белка соответствует кажущейся молекулярной массе 110 кДа. По данным SDS-ПААГ-электрофореза и в образце ПОР порин сохранял тримерную форму, однако электрофоретическая подвижность белка в этом случае несколько увеличивалась. Это может быть следствием изменения количества связанного с белком SDS [14], что, в свою очередь, вызвано структурной перестройкой порина. Окрашивание соответствующей полипептидной зоны ионами серебра не выявило присутствия ЛПС в образце ПОР. В соответствии с данными по чувствительности используемого метода [11] белок в образце ПОР содержит, по-видимому, менее 0.01 моль ЛПС на моль тримера порина.

Порины как мембранные белки могут быть переведены в водорастворимое состояние только с помощью детергентов. В связи с этим для получения спектральных характеристик исследуемых образцов порина использовали растворы белка в 0.25% растворе SDS. Как было показано ранее [13], в этих условиях не происходит денатурации порина из псевдотуберкулезного микроба.

Спектроскопия КД. Сравнительный анализ спектров КД полученных образцов порина показал, что в результате удаления ЛПС конформация белка на уровне вторичной и третичной структуры претерпевает определенные изменения. Спектр КД ПОР_{ЛПС} в ароматической области (рис. 1) имеет положительную полосу при 288 нм, которая, вероятно, относится к остаткам триптофана, фиксированным во внутренней части молекулы, и ряд более слабых положительных полос в области 280–250 нм, относящихся к остаткам тирозина и фенилаланина.

Удаление ЛПС приводит к уменьшению эллиптичностей указанных полос приблизительно вдвое (рис. 1), что свидетельствует о "разрыхлении" структуры порина в участках, где находятся остатки ароматических аминокислот.

Таблица 1. Содержание элементов вторичной структуры образцов порина из псевдотуберкулезного микроба, рассчитанное по спектрам КД

| Образец в 20 мМ Трис-НСI (рН 7.6) | α -Спираль | β -Структура | β -Изгиб | Неупорядоченная структура |
|--|-------------------|--------------------|----------------|---------------------------|
| ПОР _{ЛПС} в 0.25% SDS | 0.00 | 0.61 | 0.15 | 0.24 |
| ПОР _{ЛПС} в 0.1% SDS | 0.00 | 0.68 | 0.25 | 0.07 |
| ПОР в 0.25% SDS | 0.00 | 0.70 | 0.30 | 0.00 |
| ПОР в 0.25% OG | 0.00 | 0.65 | 0.30 | 0.05 |
| (ПОР + ЛПС) 1 : 30 (моль/моль) в 0.25% SDS | 0.00 | 0.74 | 0.26 | 0.00 |

В пептидной области спектра КД ПОР_{ЛПС} (рис. 2) присутствуют отрицательная широкая полоса с максимумом при 217 нм и плечом при 225 нм, а также интенсивная положительная полоса при 194 нм. В спектре образца ПОР по сравнению со спектром ПОР_{ЛПС} эллиптичности как отрицательной, так и в большей степени положительной полос уменьшаются.

Результаты расчета элементов вторичной структуры по спектрам КД исследуемых образцов порина методом Провинчера [15] (табл. 1) свидетельствуют о том, что ПОР_{ЛПС} содержит свыше 70% β -структурных участков и около 25% участков неупорядоченной структуры. В образце ПОР суммарная доля β -структуры возрастает от 76 до 100%, вероятно, за счет образования межмолекулярных β -связей. Это предположение подтверждается данными УФ-спектроскопии. Так, в УФ-спектре образца ПОР в максимуме поглощения белка отмечено увеличение светорассеяния на 3% по сравнению со спектром ПОР_{ЛПС}.

Обращает на себя внимание тот факт, что в случае ПОР_{ЛПС} уменьшение концентрации SDS в растворе до 0.1% приводит также к увеличению суммарной доли β -структуры в порине (табл. 1) и к увеличению светорассеяния растворов белка (на 5%). Однако в отличие от образца ПОР в этом случае в ароматической области спектра КД наблюдается значительное увеличение эллиптичности полос в области 280–250 нм (рис. 1), что говорит о более жесткой фиксации остатков тирозина и фенилаланина.

Уменьшение концентрации SDS в растворе образца ПОР до 0.1% приводит к появлению осадка белка, что может свидетельствовать об увеличении выраженности гидрофобных участков в белке ПОР по сравнению с ПОР_{ЛПС}.

Собственная белковая флуоресценция. Коротковолновое положение максимумов в спектрах флуоресценции ПОР_{ЛПС} при обеих длинах волн возбуждения (табл. 2) указывает на то, что большинство остатков триптофана локализовано во внутренних участках белковой молекулы. Вклад флуоресценции остатков тирозина в общий спектр белка проявляется в несовпадении

положений максимумов полос спектров при $\lambda_{\text{возб}}$ 280 и 296 нм, а также в больших значениях полуширины спектра ($\Delta\lambda_{1/2}$) и отношения интенсивностей флуоресценции при 320 и 350 нм в случае $\lambda_{\text{возб}}$ 280, нежели в случае $\lambda_{\text{возб}}$ 296 нм (табл. 2). Это вызвано тем, что в спектре суммарной флуоресценции в области ниже 330 нм величина эмиссии белка больше, чем в спектре флуоресценции остатков триптофана. Как видно из табл. 2, интенсивность суммарной флуоресценции порина почти в 3 раза больше интенсивности эмиссии остатков триптофана. Это может быть связано с невысокой эффективностью передачи энергии возбуждения от остатков тирозина к остаткам триптофана вследствие особенностей пространственной организации порина в растворе как представителя мембранных белков по сравнению с водорастворимыми белками [16].

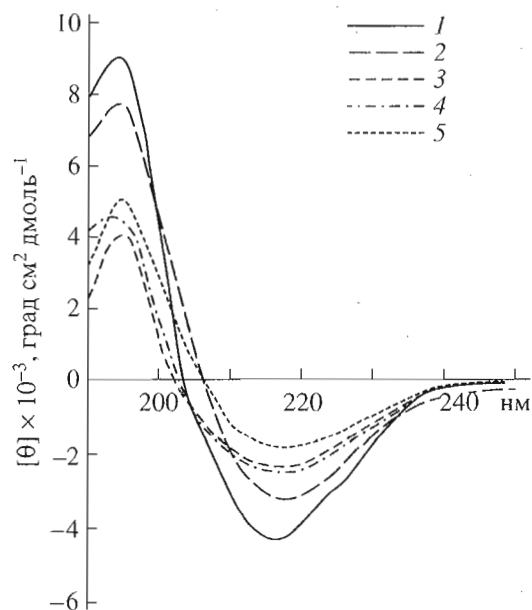


Рис. 2. Спектры КД образцов порина из псевдотуберкулезного микроба в пептидной области: ПОР_{ЛПС} в 0.25% SDS (1) и в 0.1% SDS (2); ПОР в 0.25% SDS (3) и в 0.25% OG (4); ПОР+ЛПС (1 : 30 моль/моль) в 0.25% SDS (5).

Таблица 2. Параметры спектров флуоресценции образцов порина из псевдотуберкулезного микроба в присутствии различных детергентов

| Образец в 20 мМ Трис-НСI (рН 7.6) | $\lambda_{\text{возб}}$, нм | $\lambda_{\text{макс}}$, нм | $I_{\text{фл}}$, отн. ед. | $\Delta\lambda_{1/2}$, нм | $R (I_{320}/I_{350})$ |
|---|------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| ПОР _{ЛПС} в 0.25% SDS | 280 | 326 ± 2 | 6.5 | 57 | 1.5 |
| | 296 | 329 ± 1 | 2.5 | 55 | 1.3 |
| ПОР в 0.25% SDS | 280 | 315 ± 3 | 8.0 | 50 | 2.1 |
| | 296 | 330 ± 1 | 3.1 | 50 | 1.6 |
| ПОР в 0.25% OG | 280 | 313 ± 2 | 7.48 | 68 | 1.93 |
| | 296 | 328 ± 1 | 1.89 | 58 | 1.35 |
| (ПОР + ЛПС) 1 : 30 (моль/моль) в 0.25% SDS | 280 | 305 ± 2 | 8.12 | 60 | 2.8 |
| | 296 | 330 ± 1 | 0.76 | 56 | 1.2 |
| (ПОР + ЛПС) 1 : 200 (моль/моль) в 0.25% SDS | 280 | 324 ± 1 | 3.86 | 70 | 1.45 |
| | 296 | 328 ± 1 | 1.49 | 60 | 0.92 |

Сравнение спектров собственной белковой флуоресценции образцов ПОР_{ЛПС} и ПОР показало, что отделение ЛПС приводит к изменению конформации на уровне третичной структуры белка. В спектре суммарной флуоресценции белка ПОР по сравнению со спектром исходного белка наблюдаются сдвиг максимума полосы на 10 нм в коротковолновую область, уменьшение величины $\Delta\lambda_{1/2}$ и увеличение значения R (табл. 2). Таким образом, удаление ЛПС под действием 30% раствора SDS увеличивает вклад остатков тирозина в суммарный спектр излучения белка.

Как известно, смещение положения максимума суммарной флуоресценции белка в сторону эмиссии тирозина может происходить за счет уменьшения тушения остатков тирозина и увеличения тушения остатков триптофана и/или из-за уменьшения передачи энергии возбуждения от тирозина к триптофану вследствие изменения конформации белка [17]. Количественные расчеты, выполненные нами на основе графиков зависимости квантового выхода флуоресценции ПОР_{ЛПС} и ПОР от длины волны возбуждения по методу [18], показали, что эффективности переноса энергии от тирозина к триптофану для ЛПС-содержащего и очищенного порина равны 0.5 и 0.4 соответственно.

Положение максимума спектра флуоресценции остатков триптофана не изменяется при уда-

Таблица 3. Параметры тушения флуоресценции образцов порина из псевдотуберкулезного микроба

| Образец в 20 мМ Трис-НСI (рН 7.6) | f | K |
|--|------|-----|
| ПОР _{ЛПС} в 0.25% SDS | 0.77 | 7.1 |
| ПОР _{ЛПС} в 0.1% SDS | 0.75 | 4.6 |
| ПОР в 0.25% SDS | 0.73 | 8.1 |
| ПОР в 0.25% OG | 0.78 | 5.0 |
| (ПОР + ЛПС) 1 : 30 (моль/моль) в 0.25% SDS | 0.78 | 7.2 |

лении ЛПС (табл. 2), однако уменьшается полуширина спектральной полосы и увеличивается значение R , что свидетельствует об увеличении доли остатков триптофана, погруженных во внутреннюю часть молекулы.

Результаты тушения собственной флуоресценции остатков триптофана в исследуемых образцах нейтральным тушителем акриламидом (табл. 3) показывают, что для образца ПОР по сравнению с ПОР_{ЛПС} действительно характерно уменьшение доли доступных тушителю остатков триптофана, но эффективность тушения части триптофановых остатков, находящихся на поверхности белка, возрастает (значение K тушения увеличивается). При уменьшении же концентрации детергента в растворе (ПОР_{ЛПС} в 0.1% растворе SDS) наблюдается одновременное снижение доступности остатков триптофана и уменьшение значения K тушения. Следовательно, изменения в локальной третичной структуре белка, происходящие в порине в результате отделения связанного ЛПС, не могут быть связаны только с увеличением агрегации белка, о которой упоминалось выше.

Взаимодействие порина с ЛПС. Обратимость описанных выше изменений в пространственной организации порина из псевдотуберкулезного микроба после отделения связанного ЛПС была изучена при взаимодействии образца ПОР с ЛПС. Ранее при исследовании связывания порина из *Y. pseudotuberculosis* с ЛПС [19] мы показали, что при титровании образца ПОР раствором ЛПС кривая связывания достигает насыщения при мольном соотношении белка и ЛПС 1 : 200. В спектре суммарной эмиссии белка комплекса (ПОР+ЛПС), образующегося в этих условиях, не наблюдается "голубого" сдвига – характерного признака денатурации, отмеченного для образца ПОР. Максимум суммарной флуоресценции в спектре комплекса находится в области 325–328 нм

(табл. 2), что совпадает с таковым для исходного ПОР_{ЛПС}. По-видимому, локальная третичная структура белка в составе данного комплекса (ПОР+ЛПС) имеет некоторое сходство с таковой в исходном ПОР_{ЛПС}.

К сожалению, дополнить и подтвердить эти выводы данными КД не удалось, поскольку съемка спектров при таком содержании ЛПС в образце оказалась невозможной. Максимальный избыток ЛПС по отношению к белку, при котором удалось получить качественный спектр КД исследуемого образца, составил 30 моль на 1 моль порина. Спектр КД образца (ПОР+ЛПС) в ближней УФ-области (320–240 нм) указывает на образование комплекса между компонентами. Как видно из рис. 1, в присутствии ЛПС вместо ряда полос положительного знака в области 280–250 нм, характерных для ПОР, в спектре (ПОР+ЛПС) наблюдается полоса отрицательного знака при 275 нм со слабыми субмаксимумами, а вместо интенсивной полосы отрицательного знака в спектре ПОР при 242 нм в спектре комплекса присутствует интенсивная полоса положительного знака при 238 нм. Следует отметить, что сам ЛПС в ближней УФ-области спектра КД не имеет полос.

В дальней УФ-области спектра КД комплекса (ПОР+ЛПС), области поглощения пептидных связей, присутствует полоса положительного знака при 195 нм и широкая полоса отрицательного знака с максимумом около 216–218 нм, как и в спектре КД образца ПОР (рис. 2). Эллиптичность положительной полосы в спектре комплекса на 20–25% больше, а отрицательной – на 20–25% меньше, чем в спектре белка ПОР. Вместе с тем эллиптичность обеих полос в спектре комплекса приблизительно вдвое меньше, чем в спектре КД образца ПОР_{ЛПС}. Расчет элементов вторичной структуры (табл. 1) из данных спектров КД показал, что при образовании комплекса порина с ЛПС по сравнению с образцом ПОР происходит лишь небольшое перераспределение между различными видами β -структуры: примерно на 4% уменьшается количество β -изгибов.

Параметры спектров флуоресценции комплекса (ПОР+ЛПС) (1 : 30 моль/моль) (табл. 2) свидетельствуют о том, что локальная третичная структура порина в составе этого комплекса существенно отличается от таковой как исходного белка ПОР_{ЛПС}, так и белка ПОР. Однако результаты по тушению флуоресценции остатков триптофана акриламидом, представленные в координатах модифицированного уравнения Штерна–Фольмера, показали, что величины f и K для данного комплекса близки по значению к таковым для исходного белка ПОР_{ЛПС}. Следовательно, в присутствии 30 молярного избытка ЛПС конформационные изменения происходят только на уровне третичной структуры белка. Различия во

вторичной структуре ПОР и данного комплекса минимальны.

Таким образом, при взаимодействии очищенного порина ПОР с ЛПС наблюдается образование комплексов. Конформация белка в составе этих комплексов зависит от молярного соотношения компонентов и может как отличаться, так и иметь сходные черты со структурой порина в образце ПОР_{ЛПС} (табл. 1–3).

Порообразующие свойства. Для выяснения роли ЛПС в проявлении порином функциональной активности мы провели сравнительное изучение порообразующих свойств трех исследуемых образцов белка: ПОР_{ЛПС}, ПОР и комплекса (ПОР+ЛПС), полученного при молярном соотношении белок/ЛПС 1 : 200.

Анализ флуктуаций тока показал, что исследуемые образцы порина различаются по эффективности и характеру функционирования в БЛМ (рис. 3, 4). Активность ПОР_{ЛПС} достаточно высока: реконструкция его происходит при концентрациях белка порядка 10–100 нг/мл. Наиболее вероятная проводимость пор составляет 140 ± 20 , 240 ± 20 и 480 ± 20 пСм (рис. 4).

Удаление ЛПС приводит к увеличению действующей концентрации на два порядка: до 2 мкг/мл. Характер распределения пор по размерам указывает на увеличение кооперативности их работы (рис. 4), что согласуется с данными УФ-спектроскопии об агрегации белка. Наиболее вероятные уровни проводимости изменяются при этом незначительно, но наблюдаются “скачки” большой проводимости (рис. 3, 4).

Образование комплекса ПОР с ЛПС не влияет на величину действующей концентрации белка. Но в отличие от образца ПОР реконструкция комплекса (ПОР+ЛПС) в БЛМ вызывает образование пор преимущественно малого диаметра и почти не наблюдается флуктуаций тока, характерных для кооперативно работающих пор, которые свойственны агрегированному состоянию белка в образце ПОР (рис. 3, 4).

Ранее нами было показано [20] ренатурирующее действие ОГ на структуру тримера порина из псевдотуберкулезного микроба, в связи с чем была проверена порообразующая активность образца ПОР после экспозиции в 2% растворе ОГ. Оказалось, что белок ПОР в присутствии ОГ проявляет порообразующую активность, сравнимую с активностью ПОР_{ЛПС}. Встраивание порина в модельную мембрану наблюдается при концентрации белка порядка 10 нг/мл. Наиболее вероятные поры образца (ПОР+ОГ) находились в том же интервале проводимостей, что и для исходного ПОР_{ЛПС} (рис. 3, 4).

Следует отметить, что порообразующая активность образца ПОР может быть обусловлена

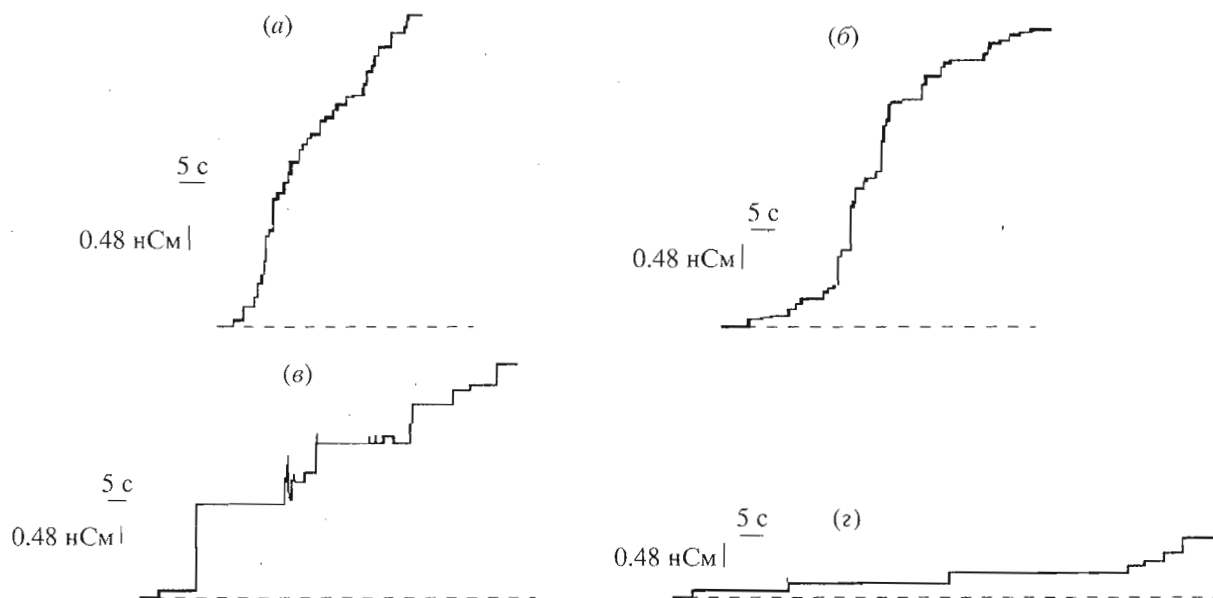


Рис. 3. Запись флуктуаций тока через БЛМ в присутствии: 0.1 мкг/мл ПОР_{ЛПС} (а); 0.01 мкг/мл (ПОР+ОГ) (б); 2 мкг/мл ПОР (в); 2 мкг/мл (ПОР+ЛПС) (г). Водная фаза: 0.1 М NaCl, 20 мМ Трис-НСl-буфер (рН 7.6). Потенциал на мембране 50 мВ.

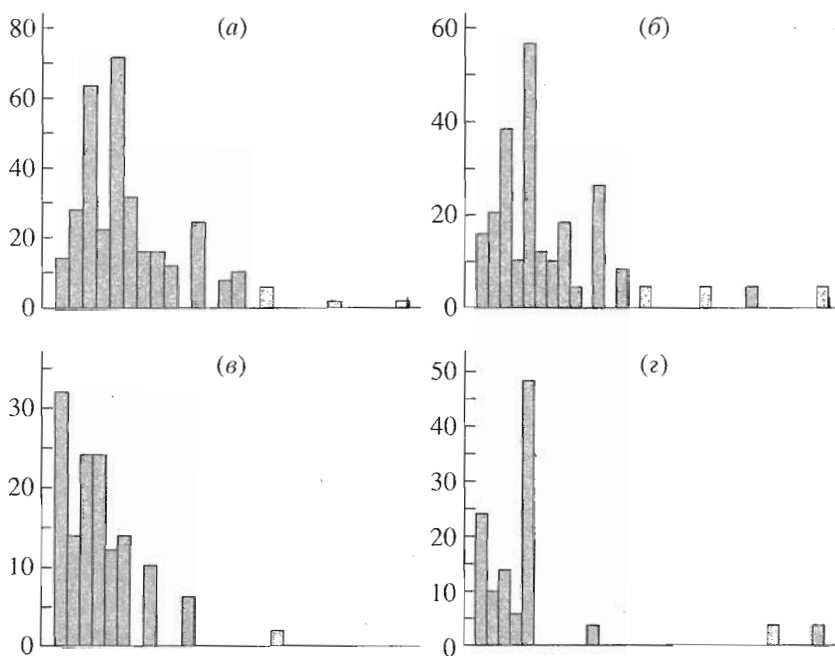


Рис. 4. Гистограммы уровней проводимости пор, индуцированных различными образцами порина: (а) – 0.1 мкг/мл ПОР_{ЛПС}; (б) – 2 мкг/мл ПОР; (в) – 2 мкг/мл (ПОР+ЛПС); (г) – 0.01 мкг/мл (ПОР+ОГ). Водная фаза: 0.1 М NaCl, 20 мМ Трис-НСl-буфер (рН 7.6). Потенциал на мембране 50 мВ. По оси ординат приведено число пор, по оси абсцисс – проводимость БЛМ (величина одного уровня проводимости 48 пСм).

сохранением следовых количеств высокоактивного образца ПОР_{ЛПС}, которые не обнаруживаются применяемыми аналитическими методами. Однако различный характер порообразующей активности образца ПОР в присутствии двух разных по природе детергентов, SDS и ОГ, свиде-

тельствует в пользу того, что это свойство присуще самому белку.

Таким образом, порин *HM Y. pseudotuberculosis*, очищенный от связанного ЛПС, обладает способностью образовывать каналы в модельной мембране.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ данных, полученных с помощью оптической спектроскопии, показал, что удаление связанного ЛПС с помощью 30% раствора SDS приводит к конформационным изменениям в порине на уровне вторичной и третичной структуры белка. Следует отметить, что наблюдаемые изменения в структуре порина могут быть связаны не только с удалением прочно связанного ЛПС, но и с денатурирующим действием детергента в высокой концентрации. В настоящее время разграничить влияние этих двух факторов не представляется возможным. Примечательно, что, несмотря на жесткость обработки, не происходит полного разворачивания полипептидной цепи порина с образованием статистического клубка. Напротив, денатурированный порин имеет высокоорганизованную β -структуру. Можно предположить, что образование этой структуры происходит через ассоциацию молекул, которая сопровождается трансформацией неупорядоченной вторичной структуры в β -структуру и образованием межмолекулярных β -связей. Поскольку выраженность гидрофобных участков на поверхности белка в процессе денатурации увеличивается, можно предположить, что его самоассоциацию инициируют гидрофобные взаимодействия. Сравнительно небольшое по сравнению с исходным увеличение светорассеяния растворов денатурированного белка предполагает небольшой размер агрегатов последнего, что может определяться присутствием в растворе детергента, тормозящего ассоциацию за счет экранирования участвующих во взаимодействии гидрофобных областей.

Вышеописанный тип денатурации порина напоминает конформационные превращения, которые имеют место при образовании полностью β -структурированных высокомолекулярных агрегатов амилоидных белков, включая белки-прионы [21]. При определенных условиях, природа которых не совсем ясна на сегодняшний день, эти белки агрегируют и в виде нерастворимых фибрилл накапливаются в нервных клетках, что является причиной тяжелых нейродегенеративных расстройств [21]. Как и в случае поринов, полипептидная цепь предшественника амилоидных белков (изоформы, присущей нормальной клетке) содержит значительное количество неупорядоченных фрагментов. Ассоциация белка, обусловленная гидрофобными взаимодействиями, приводит к образованию межмолекулярных β -структур и, в конечном счете, к формированию полностью β -структурированных агрегатов белка [21].

Важным моментом является то, что образование амилоидных белков из предшественников идет через конформационный интермедиат с внутренне нестабильной третичной структурой [22], которая в зависимости от условий может стабилизироваться за счет описанной выше самоассоци-

ции либо другим путем. Конформационную пластичность, которая выражается в существовании различных конформеров белка и обусловлена, вероятно, конформационной гибкостью на уровне третичной структуры молекулы, мы наблюдали ранее для порина из *Y. pseudotuberculosis* в растворах различных детергентов [13, 20]. Можно предположить, что образование β -структурированного самоассоциата порина протекает по механизму, описанному для образования амилоидных фибрилл из транстиретина – белка человеческой плазмы, состоящего из четырех идентичных субъединиц, богатых β -структурой [23]. По-видимому, при отделении связанного ЛПС в присутствии высоких концентраций SDS происходит диссоциация тримеров порина на мономерные интермедиаты с частичным нарушением на уровне третичной структуры белка, что открывает возможность для самосборки не интактных тримеров, а новых высокоорганизованных β -структур.

Изучение функциональных свойств различных образцов поринов с помощью техники БЛМ показало, что порин из псевдотуберкулезного микроба сохраняет каналобразующую активность и в отсутствие связанного ЛПС. Этот факт, на наш взгляд, вовсе не отрицает важную роль ЛПС в проявлении порином *in vivo* функциональной активности. В то же время проведенные эксперименты продемонстрировали, что существуют определенные требования к конформации порина, причем, если *in vivo* роль “промотора” в процессе “обретения” белком этой функционально активной конформации выполняет ЛПС, *in vitro* он может быть с успехом заменен неионным детергентом, например *n*-октил- β -D-глюкопиранозидом. Так, недавно появились сообщения о том, что Тритон X-100 [24] и октилглюкозид [25] способствуют сборке *in vitro* [24] и реконструкции в липидный бислой [25] порина Pho E и Omp A белка из наружной мембраны *Escherichia coli*. Сделанные нами выводы согласуются также с имеющимися в литературе сведениями о восстановлении функциональной активности порина из *E. coli* в присутствии гликолипида – тетрациклированного производного глюкозамина [26].

Данные о пространственной структуре исследуемых образцов порина, полученные с помощью флуоресценции и спектроскопии КД, позволили нам проследить определенную взаимосвязь между структурой белка и его функциональной активностью. Полностью β -структурированный агрегированный порин (ПОР в SDS) по сравнению с ПОР_{ЛПС} обнаруживает низкую функциональную активность. Этот же образец ПОР в октилглюкозиде, содержащий до 5% неупорядоченной структуры, проявляет уже высокую порообразующую активность, подобную активности исходного образца белка ПОР_{ЛПС} и по характеру, и по эффективности встраивания в бислой. Следует отметить, однако, что светорассеяние растворов высокоак-

тивных образцов ПОР в октилглюкозиде было выше (данные не приведены), чем светорассеяние малоактивных образцов ПОР в SDS. Следовательно, агрегация белка в этом случае не оказывает заметного влияния на активность порина.

Расчет содержания элементов вторичной структуры (табл. 1) свидетельствует о том, что при обмене SDS на октилглюкозид полностью β -структурированный конформер порина ПОР претерпевает изменения, связанные с восстановлением некоторой доли неупорядоченной структуры за счет потери части межмолекулярной β -структуры, т.е. можно говорить о ренатурирующем действии октилглюкозида. Как известно, спектроскопия КД дает усредненные данные о количестве вторичной структуры определенного типа в белке и не может выявить конформационную гетерогенность образца. В то же время недавно было показано, что многие частично денатурированные белки не имеют стабильной конформации и существуют в двух или более конформационных состояниях, переходящих друг в друга [27]. Можно предположить, что белок ПОР в октилглюкозиде гетерогенен, при этом в образце имеются конформеры с содержанием неупорядоченной структуры более 5%, в том числе достаточно близкие по вторичной структуре порину ПОР_{ЛПС}. Возможно, в присутствии БЛМ равновесие сдвигается в сторону этих изомеров (потому, например, что они лучше встраиваются в бислои). В таком случае стало бы понятным восстановление активности образца ПОР до уровня активности исходного белка ПОР_{ЛПС}. В пользу этого предположения свидетельствует и тот факт, что вторичная структура белка ПОР_{ЛПС} в определенных условиях, например в 0.1% SDS, может приближаться к таковой образца ПОР в октилглюкозиде (табл. 1).

В то же время не наблюдалось прямой корреляции между функциональной активностью порина и его пространственной организацией на уровне третичной структуры белка. Так, параметры спектров флуоресценции образца ПОР в октилглюкозиде не совпадают с таковыми для образца ПОР_{ЛПС} в 0.25% SDS (табл. 2). С другой стороны, судя по данным спектров КД в ароматической области (рис. 1) и значениям констант тушения флуоресценции остатков триптофана акриламидом (табл. 3), образцы ПОР в октилглюкозиде и ПОР_{ЛПС} в 0.1% SDS имеют очень близкие локальные структуры в области ароматических хромофоров. Образец (ПОР+ЛПС) (1 : 200, моль/моль), обнаруживающий низкую порообразующую активность, имеет спектр флуоресценции, подобный таковому высоко активного исходного белка ПОР_{ЛПС} в 0.25% SDS (табл. 2). Очевидно, наблюдаемые различия в локальной третичной структуре белка в рассматриваемых образцах порина не существенны для проявления функциональной активности.

Таким образом, присутствие в полипептидной цепи порина участков с неупорядоченной структурой, которые совпадают с расположенными над мембраной "петлями", соединяющими β -тяжи [28], – важно для проявления порообразующей активности. Это заключение не противоречит существующим представлениям об участии "петель" в формировании и функционировании пор [29]. Что касается третичной структуры, то, вероятно, ее отклонения от нативной структуры допускаются в определенных границах без существенных изменений активности порина.

Конечно, нельзя не учитывать, что пориновые каналы имеют векторные свойства и на функциональную активность поринов может оказывать влияние их ориентация в мембране. Ранее было показано, что особенности строения поринов сами по себе обеспечивают направленное встраивание белка или его комплекса с детергентом в искусственную мембрану [30]. Однако частичная денатурация порина может повлиять на это свойство, и, следовательно, на ориентацию порина в мембране и его активность. В настоящее время мы не располагаем данными, с помощью которых можно было бы однозначно определить влияние этого фактора в наших экспериментах.

Исследование функциональных свойств поринов с одновременным получением информации об их структуре обеспечивает основу для дальнейшего проникновения в механизмы работы каналов, образованных этими белками в наружной мембране грамотрицательных бактерий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка порина. Тример порина из *Y. pseudotuberculosis* получали по методу, включающему в себя расщепление пептидогликанового (ПГ) слоя лизоцимом [10]. Очистку белка проводили с помощью гель-хроматографии на Toyoprel HW-60F (TSK-гель, Тою Soda, Япония), как описано ранее [13]. Степень очистки полученных образцов порина анализировали с помощью SDS-ЛААГ-электрофореза [31]. Белки, разделенные в геле, окрашивали кумасси ярко-голубым G-250 в 3.5% растворе хлорной кислоты [32]. Содержание моносахаридов в препаратах белка определяли стандартным методом [33], для определения белка использовали модифицированный метод Лоури в присутствии 2% SDS [34]. Полученный препарат порина (ПОР_{ЛПС}) содержал 75–80% белка и не более 5% моносахаридов.

Следующий этап очистки порина от ЛПС (для получения образца ПОР) осуществляли согласно процедуре, описанной в работе [11]. Для удаления ЛПС образец белка суспендировали в 30% растворе SDS, наносили на колонку (1.9 × 60 см) с сефадексом G-200, уравновешенным 20 мМ Трис-HCl-буфером (pH 7.6), содержащим 0.2 М NaCl,

1 mM EDTA и 0.5% SDS (буфер А). Элюирование проводили тем же буфером, полученные фракции анализировали на присутствие белка с помощью SDS-ПААГ-электрофореза и на присутствие ЛПС с помощью теста с тиобарбитуровой кислотой (ч.д.а., Реахим, Россия) [12]. Наличие ЛПС во фракциях контролировали также, окрашивая гели ионами серебра по методу [35]. Полученный образец порина, не содержащий ЛПС (ПОР), хранили в буфере А.

Для получения образца ПОР в 20 mM Трис-НСI-буфере (pH 7.6), содержащем 0.25% *n*-октил- β -D-глюкопиранозид (Sigma, США) (буфер Б), к образцу ПОР в буфере А добавляли октилглюкозид до конечной концентрации 2%. Смесь выдерживали 24 ч при 20°C. Избыток октилглюкозида и SDS удаляли ультрафильтрацией, разбавляя исходный раствор буфером Б.

Взаимодействие порина с ЛПС. Образец ЛПС для опытов по реконструкции получали так же, как в работе [19]. Для получения реконструированного комплекса порина с ЛПС (ПОР+ЛПС) к раствору образца ПОР (30 мкг/мл) в буфере А добавляли раствор ЛПС до молярного соотношения 1 : 30 (1 : 2 в весовом соотношении) и 1 : 200 (1 : 14 в весовом соотношении). Смесь выдерживали 24 ч при 20°C.

Физико-химические методы. Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Hitachi 850 (Япония) при 25°C в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. Возбуждение флуоресценции проводили при 280 и 296 нм. Спектры флуоресценции, скорректированные по роданину В (Wako Pure Chemical Industries, Япония), регистрировали, вычитая рамановскую полосу буфера. Ширина щели на монохроматорах возбуждения и излучения 5 нм.

Растворы белка разной концентрации готовили в 20 mM Трис-НСI-буфере (pH 7.6), содержащем 0.25% SDS, разбавляя исходный концентрированный раствор белка. Концентрацию белка в растворе определяли по УФ-спектрам в максимуме поглощения при 280 нм, принимая $A_{1\text{ см}}^{0.1\%}$ равной 1.0. УФ-спектры регистрировали при 25°C на спектрофотометре Cary 219 (Varian, США) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см.

Эффективность передачи энергии от тирозина к триптофану рассчитывали по методике, описанной в работе [18]; квантовый выход флуоресценции считали по формуле, описанной в работе [36], в качестве стандарта использовали этиловый эфир *N*-ацетилтриптофана с квантовым выходом 0.2 [37].

Для обработки данных тушения собственной флуоресценции остатков триптофана в растворах исследуемых образцов порина использовали модифицированное уравнение Штерна-Фольмера, которое позволяет наряду с определением кон-

станты тушения (K) оценить также долю остатков триптофана, доступных для тушения (f):

$$F_0/\Delta F = 1/f(1 + 1/K[\theta]).$$

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-500A (Япония) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 0.1 см для пептидной области спектра и 1 см – для ароматической. В пептидной области спектра КД (190–230 нм) эллиптичность $[\theta]$ считали как эллиптичность среднего остатка, принимая молекулярную массу последнего равной 110 Да и содержание белка, равным 100%, по формуле

$$[\theta] = [\theta]_{\text{набл}} S \times 110 / (10Cl) \quad (\text{град см}^2/\text{дмоль}),$$

где S – чувствительность шкалы прибора, C – концентрация белка в мг/мл, l – толщина кюветы (см). В ароматической области спектра КД (240–320 нм) эллиптичность $[\theta_m]$ считали как молярную, принимая молекулярную массу белка равной 110 кДа (молекулярная масса тримера порина из *Y. pseudotuberculosis* [13]). Калибровку шкалы спектрополяриметра проводили по 0.06% водному раствору аммониевой соли 10-сульфоната-*D*-камфорной кислоты (Katayama Chemical, Япония). Отношение эллиптичностей полос при 192 и 290 нм составляло 2.09. Содержание элементов вторичной структуры белка рассчитывали по методу Провинчера [15].

Оценку рассеивания излучения в максимуме поглощения растворов образцов порина проводили по методу [38] с использованием логарифмической зависимости $\log ABS$ от $\log l$ в области 400–300 нм.

Получение БЛМ и методы измерения электропроводности были аналогичны описанным в работе [39].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hitchcock P.J., Morrison D.C. // Handbook of Endotoxin. V. 1 / Ed. E.T. Rietschel. N.Y.: Elsevier Science Publ. Inc., 1984. P. 339–375.
2. Sen K., Nikaido H. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 926–928.
3. Hoenger A., Gross A., Aebi U., Engel A. // J. Struct. Biol. 1990. V. 103. P. 185–195.
4. Roque W.J., Coughlin R.T., McGroarty E.J. // J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 4003–4010.
5. Parr T.R.Jr., Poole K., Crockford G.W.K., Hancock R.E.W. // J. Bacteriol. 1986. V. 165. P. 523–526.
6. Rosenbusch J.P. // Experientia. 1990. V. 46. P. 167–173.
7. Overbeeke N., van Scharrenburg G., Lugtenberg B. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 110. P. 247–254.
8. Schindler H., Rosenbusch J.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 3751–3755.
9. Freudl R., Schwarz H., Stierhof J.-D., Gamon K., Hindennach I., Henning U. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 11355–11361.

10. Nurminen M. // Enterobacterial Surface Antigens: Methods for Molecular Characterization / Eds Korhonen T.K. et al. N.Y.: Elsevier Science Publ. Inc., 1985. P. 293–300.
11. Todt J.C., Rocque W.J., McGroarty E.J. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 10471–10478.
12. Burtseva T.I., Glebko L.I., Ovodov Yu.S. // Anal. Biochem. 1975. V. 64. P. 1–4.
13. Новикова О.Д., Федореева Л.И., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Ермак И.М., Лухацкая Г.Н., Мороз С.В., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 536–547.
14. Nakamura K., Mizushima S. // J. Biochem. 1976. V. 80. P. 1411–1422.
15. Provencher C.W., Glocker J. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 33–37.
16. Kleffel B., Garavito R.M., Baumeister W., Rosenbusch J.P. // EMBO J. 1985. V. 4. P. 1589–1592.
17. Brand J.G., Cagan R.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 493. P. 178–187.
18. Saito J., Tachibana H., Hayashi H., Wada A. // Photochem. Photobiol. 1981. V. 33. P. 289–295.
19. Набережных Г.А., Хоменко В.А., Красикова И.Н., Ким Н.Ю., Соловьева Т.Ф. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 671–677.
20. Новикова О.Д., Фролова Г.М., Вакорина Т.И., Таранкова З.А., Глазунов В.П., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. С. 763–772.
21. Safar J., Roller P.P., Gajdusek D.C., Gibbs Jr. C.J. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 8375–8383.
22. Zhang H., Stockel J., Mehlhorn I., Groth D., Baldwin M.A., Prusiner S.B., James T.L., Cohen F.E. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 3543–3553.
23. Miroy G.J., Lai Z., Lashuel H.A., Peterson S.A., Strang C., Kelly J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 15051–15056.
24. De Cock H., van Blocklands S., Tomassen J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 12885–12890.
25. Surrey T., Jahng F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 7457–7461.
26. Buehler L.K., Kusumoto S., Zhang H., Rosenbusch J.P. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 24446–24450.
27. Wang F., Xue-jun Tang // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 4069–4078.
28. Jap B.K., Walian P.J. // Phys. Rev. 1996. V. 76. P. 1073–1088.
29. Bjorksten J., Soares C.M., Nilsson O., Tapia O. // Prot. Eng. 1994. V. 7. P. 487–493.
30. Brunen M., Engelhardt H. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 212. P. 129–135.
31. Ogita Z., Markert C.L. // Anal. Biochem. 1979. V. 79. P. 233–241.
32. Гааль Э., Медьешин Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. С. 157.
33. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.R., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
34. Kashyar M.L., Hynd B.A., Robinson K.J. // J. Lipid Res. 1980. V. 21. P. 481–484.
35. Hitchcock P.I., Brown T.M. // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
36. Parker C.A., Rees W.F. // Analyst. 1960. V. 85. P. 587–600.
37. Teale F.W.J., Weber G. // Biochem. J. 1957. V. 85. P. 476–482.
38. Winder A.F., Gent W.L.G. // Biopolymers. 1971. V. 10. P. 1243–1251.
39. Лухацкая Г.Н., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 1219–1224.

The Effect of Lipopolysaccharide upon the Conformational State and Functional Activity of Porin from *Yersinia pseudotuberculosis*

O. D. Novikova[#], N. Yu. Kim, V. P. Glazunov, T. I. Vakorina,
G. A. Naberezhnykh, G. N. Likhatskaya, V. A. Khomenko, 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*

Changes in the structure and functional activity of porin, a protein from *Yersinia pseudotuberculosis*, resulting from the removal of lipopolysaccharide (LPS) normally bound with the protein were studied. The treatment of LPS-containing porin with a 30% SDS solution led to an LPS-free protein that, according to the SDS-PAGE, remained to be a trimer. It was shown by CD and UV spectroscopies and intrinsic protein fluorescence that the removal of LPS caused only conformational changes in the porin secondary and tertiary structures. The LPS-free porin folded into a completely β -structured protein aggregate. The bilayer lipid membrane technique showed that the pore-forming activity of the LPS-free porin decreased, and its concentration should be increased by two orders of magnitude to achieve the same effect. Incubation of the LPS-free porin with LPS led to a porin–LPS complex and affected the character of the protein functional activity. The treatment of the LPS-free porin by octyl glucoside, a nonionic detergent, resulted in the restoration of the protein pore-forming activity. It was suggested that the LPS and detergent provide a definite protein conformation necessary for its functioning.

Key words: Gram-negative bacteria, outer membrane porins; interaction with lipopolysaccharide; pore-forming properties; conformational transitions; optical spectroscopy; lipopolysaccharides

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7(4232) 31-1430; e-mail: novikova@piboc.marine.su.