



УДК 577.112'314.6.083 + 616.097.612.017

© 1993 О. Д. Новикова, Л. И. Федорева,  
В. А. Хоменко, О. Ю. Портнягина, И. М. Ермак, Г. Н. Лихацкая,  
С. В. Мороз, Т. Ф. Соловьева, Ю. С. Оводов

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ЭКСТРАКЦИИ ПОРООБРАЗУЮЩЕГО БЕЛКА  
ИЗ *Yersinia pseudotuberculosis* НА ЕГО  
МАКРОМОЛЕКУЛЯРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ\*

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Макромолекулярная организация олигомеров порина из *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенных двумя методами экстракции, была исследована с помощью физико-химических методов, реконструкцией в БЛМ и иммуноферментного анализа.

Показано, что использование SDS при высокой температуре в процессе экстракции приводит к частичной денатурации тримера порина на уровне третичной структуры белка. Эти конформационные изменения оказывают влияние на порообразующую активность и антигенную структуру порина. Частично денатурированный тример также стабилен к действию мочевины и гуанидингидрохлорида, как и нативная форма белка.

Известно [1], что в состав наружной мембраны грамотрицательных бактерий входят белки-порины, названные так в соответствии с их функциональной активностью. Они образуют водонаполненные поры, выполняющие роль «неспецифического сита», через которое в клетку поступают гидрофильные вещества с молекулярной массой не более 600—700 Да. Эти белки имеют ряд структурных особенностей, отличающих их от типичных интегральных белков. Прежде всего это наличие в них большого количества полярных аминокислот и отсутствие достаточно протяженных участков аминокислотной последовательности, способных образовывать гидрофобную  $\alpha$ -спираль, «прошивающую» липидный бислой. Напротив, для вторичной структуры поринов характерны многочисленные длинные сегменты из гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков, находящиеся в  $\beta$ -складчатой конформации [1].

В наружной мембране эти белки существуют в виде тримеров (мол. масса мономера составляет 28—48 кДа) и связаны прочной, но не ковалентной связью с пептидогликаном (ПГ) и липополисахаридом (ЛПС). В изолированном виде в растворах детергентов порины сохраняют олигомерную структуру [2, 3], обладающую повышенной устойчивостью по отношению к температуре и другим денатурирующим факторам.

В настоящее время пространственную организацию мембранных белков данного типа активно изучают различные группы авторов. В литературе имеются сведения о существенном влиянии используемых для выделения реагентов на растворимость получаемых препаратов белка [4], о конформационных перестройках поринов

\* Настоящая работа поддержана грантом 4-92 ГНТК «Приоритетные направления генетики» от Института биологии гена РАН.

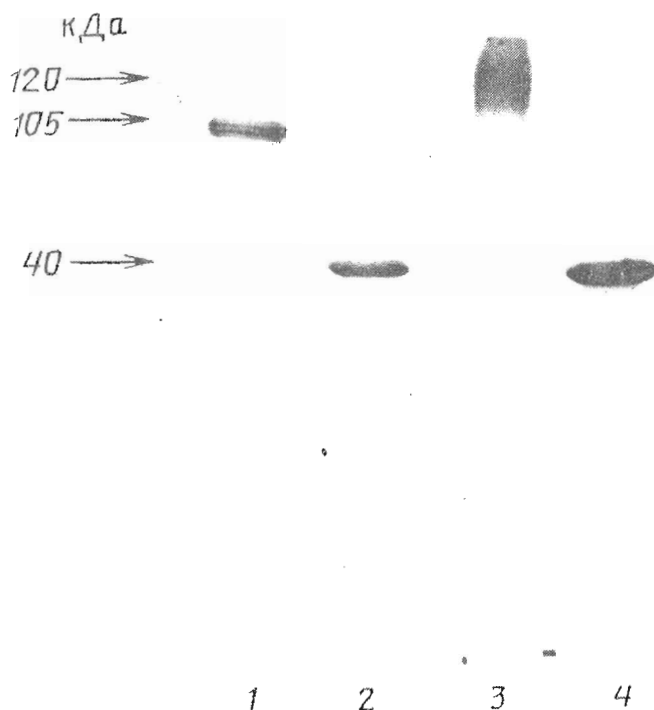


Рис. 1. Электрофореграммы тримеров иерсинина YER<sub>3</sub>-II (1) и YER<sub>3</sub>-I (3) и денатурированного мономера иерсинина, образующегося после кипячения тримеров (2, 4)

под влиянием температуры и pH в присутствии ионных и неионных детергентов [2, 3], а также гуанидингидрохлорида [5].

Эти исследования вносят важный вклад в понимание молекулярных механизмов функциональной активности поринов. Кроме того, в процессе их выполнения решаются важные методические задачи, например, по стандартизации препаратов поринов, что особенно существенно для изучения иммунобиологических свойств этих белков.

Цель данной работы — сравнительное изучение макромолекулярной организации олигомеров иерсинина, порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенных двумя различными методами.

Первый способ традиционно используется для извлечения порообразующих белков. Клеточные оболочки, полученные после механической дезинтеграции, экстрагировали тритоном X-100, избирательно растворяющим компоненты цитоплазматической мембраны [6]. При последующей обработке остатка SDS при 50° С был получен осадок ПГ с ассоциированными белками наружной мембраны [7]. Тример иерсинина был выделен экстракцией SDS при 37° С в присутствии 0,5 М NaCl (образец YER<sub>3</sub>-I) [8].

Второй (альтернативный) способ извлечения тримеров порина основан на устойчивости этих белков к трипсину [9]. Он включает в себя инкубацию обработанных EDTA и лизоцимом клеточных оболочек с трипсином в тритоне X-100 для очистки от сопутствующих белков и осаждение олигомеров порина при 42° С из полученного раствора при pH 6,0 в присутствии 0,5 М NaCl (образец YER<sub>3</sub>-II).

Авторы ограничивали применение данного способа получения тримеров порина R-формой микроорганизмов, считая лишь ее в достаточной степени чувствительной к действию лизоцима.



Рис. 2. Запись флуктуаций тока через БЛМ (1% олеоилглицерин в *n*-гептане) в присутствии 0,1 мкг/мл иерсинина: YER<sub>3</sub>-I (1) и YER<sub>3</sub>-II (2, 3). Водная фаза: 0,1 М NaCl, 5 мМ трис-HCl-буфер, рН 8,0; 25° С; потенциал на мембране — 10 мВ

Наши исследования показали, что этот метод применим и для S-формы псевдотуберкулезного микроба [10]. В качестве заключительной стадии очистки обоих образцов олигомеров иерсинина использовали гель-хроматографию в присутствии SDS. Белки хранили и исследовали в 0,25% SDS. Полученные препараты иерсинина, по данным анализа, содержали 75—80% белка и не более 5% моносахаридов. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS, ПААГ-электрофорез), оба белка были гомогенны, однако несколько отличались по своему электрофоретическому поведению. Для YER<sub>3</sub>-II в области молекулярных масс, соответствующих тримеру иерсинина (105—120 кДа), характерно наличие 1—3 полос (рис. 1). Наблюдаемая на фореграммах множественность полос свойственна и поринам из других бактерий и вызвана присутствием в белках связанного ЛПС [11]. В случае YER<sub>3</sub>-I полипептидная зона в указанной области молекулярных масс была более диффузной.

Физико-химические параметры препаратов YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II, характеризующие макромолекулярную организацию белка, были определены методами аналитического ультрацентрифугирования, спектроскопии кругового дихроизма, собственной белковой флуоресценции и сканирующей микрокалориметрии. Сравнительный анализ антигенной структуры белков проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) методом торможения. Порообразующие свойства поринов изучали реконструкцией их в бислойную липидную мембрану (БЛМ).

С помощью скоростной седиментации для YER<sub>3</sub>-I была выявлена гетерогенность по молекулярной массе. Так, на седиментограмме наряду с основным пиком с коэффициентом седиментации 7,6 S обнаружены небольшие пики с коэффициентами седиментации 5,2 и 2,6 S. Напротив, YER<sub>3</sub>-II в этих же условиях гомогенен и имеет коэффициент седиментации 7,2 S.

Слабо выраженная зависимость коэффициента седиментации в диапазоне концентрации белка 0,1—0,6 мг/мл позволяет предполагать глобулярную форму порина в растворе.

Указанное значение коэффициента седиментации для YER<sub>3</sub>-II близко к величине, полученной для тримерной формы порина из *E. coli* [12]. В таком случае можно предположить, что полипептиды 5,2 S и 2,6 S представляют собой соответственно димер и мономер иерсинина. Димерную форму поринов в некоторых случаях удается обнаружить в растворах белка [12]. Кроме того, существует предположение, что димер является промежуточной формой при сборке поринов *in vivo* [13].

Таким образом, согласно данным седиментационного анализа, YER<sub>3</sub>-I частично диссоциирован в растворе.

Сравнительное изучение порообразующих свойств тримеров иерсинина, выделенных различными методами, показало, что они различаются по эффективности и характеру встраивания в БЛМ. Как видно из рис. 2, эффективность увеличения проводимости БЛМ в присутствии YER<sub>3</sub>-I (кривая 1) выше, чем в присутствии

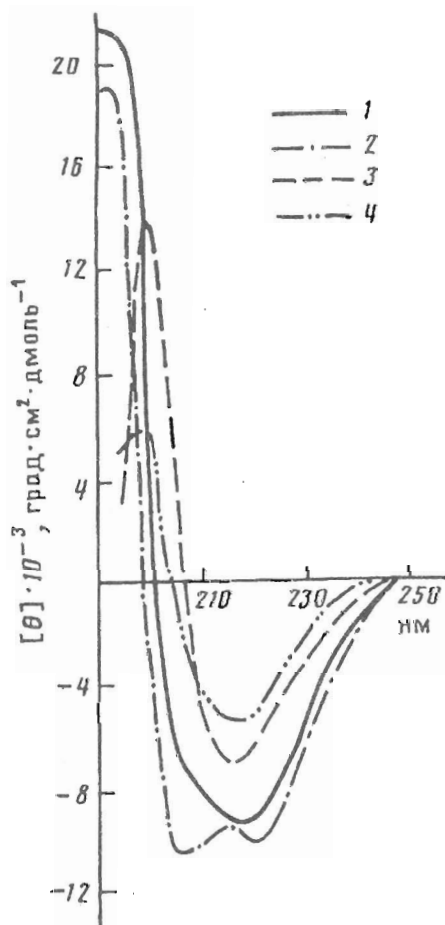


Рис. 3. Спектры КД тримеров иерсинина YER<sub>3</sub>-I (1, 2) и YER<sub>3</sub>-II (3, 4) в присутствии 0,25% SDS. Спектры сняты при 25° С (1, 3) и при 25° С после предварительного нагревания до 90° С (2, 4)

YER<sub>3</sub>-II (кривая 2). В обоих случаях наблюдается как последовательное, так и кооперативное включение каналов, но частота включения пор для YER<sub>3</sub>-I в два раза больше, чем для YER<sub>3</sub>-II. В случае YER<sub>3</sub>-II, как правило, включаются несколько кооперативно работающих каналов, о чем свидетельствует типичная запись тока через БЛМ (кривая 3). Видимо, в случае YER<sub>3</sub>-II каналобразующие единицы находятся в более агрегированном состоянии по сравнению с YER<sub>3</sub>-I. Учитывая вышесказанное и результаты седиментационного анализа, можно предположить, что в YER<sub>3</sub>-I субъединицы связаны менее прочно по сравнению с YER<sub>3</sub>-II.

Спектры КД YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II в присутствии 0,25% SDS в диапазоне длин волн 250—190 нм (рис. 3) заметно различаются между собой. Они имеют различные максимумы отрицательных и положительных полос и значение мольной эллиптичности, равное 0 ( $\theta = 0$ ) при разных длинах волн. Форма спектров свидетельствует о высоком содержании  $\beta$ -структуры в обоих белках. При этом КД-спектр YER<sub>3</sub>-II типичен для полностью  $\beta$ -структурированных белков [14]. В КД-спектре YER<sub>3</sub>-I наблюдается перекрытие двух отрицательных полос (208 и 220 нм), что приводит к появлению широкого минимума, смещенного в область 220 нм. Согласно классификации Маналалана и Джонсона [14], такая форма КД-спектра характерна для белков  $\alpha/\beta$  смешанного типа.

Содержание элементов вторичной структуры в образцах YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II

Образец иер- синина	t, °C	α-Спираль	β-структура ↑↓	β-Структура ↑↑	β-Изгиб	Другие
YER <sub>3</sub> -I	25	5	0	62	21	12
	25*	5	0	72	5	18
YER <sub>3</sub> -II	25	0	0	74	24	2
	25*	0	0	73	20	7

\* После охлаждения образца, предварительно нагретого до 90° С.

Результаты расчетов элементов вторичной структуры по методу Болотиной с соавт. [15] с учетом вклада ароматических аминокислот подтверждают вывод, сделанный на основе качественного анализа формы КД-спектров тримеров иер-синина (табл. 1).

Как видно из таблицы, YER<sub>3</sub>-II характеризуется высоким содержанием участков с параллельными β-складчатыми листами, с небольшим количеством участков с неупорядоченной конформацией и отсутствием α-спирали. YER<sub>3</sub>-I, помимо β-структурированных участков, доля которых меньше, и неупорядоченных сегментов, доля которых больше, содержит α-спиральные звенья.

Данный метод выбран нами в связи с тем, что наиболее значима для расчетов область длин волн 250—200 нм. Это позволяет исключить из рассмотрения область 190—200 нм, в которой наблюдаются искажения спектров из-за присутствия SDS в высокой концентрации.

После прогрева образцов до 90° С на уровне вторичной структуры белков происходят минимальные изменения. В YER<sub>3</sub>-II содержание отдельных элементов вторичной структуры практически не меняется, а в YER<sub>3</sub>-I наблюдается лишь небольшое увеличение количества β-структуры за счет β-изгибов.

Форма КД-спектров исходного и прогретого YER<sub>3</sub>-I, согласно [14], свидетельствует о некоторых различиях в распределении α-спиральных участков вдоль полипептидной цепи белка в этих образцах.

Таким образом, олигомеры иерсинина в растворах SDS представляют собой β-структурированные белки с весьма стабильной по отношению к температуре и детергенту вторичной структурой. Однако имеется некоторая область, составляющая приблизительно 20% от общего содержания β-структуры, более чувствительная к действию денатурантов. Об этом свидетельствует появление во вторичной структуре YER<sub>3</sub>-I α-спиральных и неупорядоченных участков. Ранее было показано [16], что порин из *E. coli* в липидной мембране содержит до 80% β-структуры и в нем практически отсутствуют α-спиральные участки. Принимая во внимание эти данные, можно предположить, что YER<sub>3</sub>-II имеет вторичную структуру, более приближенную к конформации белка в бактериальной мембране. Это может быть следствием неодинаковой степени воздействия SDS и температуры при выделении исследуемых белков. В случае YER<sub>3</sub>-I экстракция SDS при повышенной температуре используется и при получении комплекса ПГ—белок, и при извлечении собственно олигомеров порина; в случае YER<sub>3</sub>-II растворы, содержащие SDS, применяются только на стадии фракционирования белка.

В ароматической области КД-спектров исследуемых белков видна тонкая третичная структура (рисунок не приведен) с некоторыми различиями в положении и амплитуде полос. Сравнительный анализ показывает, что YER<sub>3</sub>-I обладает менее фиксированной третичной структурой, нежели YER<sub>3</sub>-II, что, по-видимому, обусловлено ослаблением некоторых внутримолекулярных связей в белке, произошедших под действием SDS в процессе выделения.

Этот вывод также подтверждается данными микрокалориметрического исследе-

Термодинамические параметры YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II

Образец иерсинина	$\Delta H_{\text{квл}}$	$\Delta G$	$\Delta H_{\text{эфф}}$	$\Delta H_{\text{квл}}/\Delta H_{\text{эфф}}$	$T_d, ^\circ\text{K}$
	кДж/моль				
YER <sub>3</sub> -I	300	9,5	133	2,25	362,2
YER <sub>3</sub> -II	395	11,8	125	3,16	355,4

\*  $\Delta H_{\text{квл}}$  — калориметрическая энтальпия денатурации,  $\Delta H_{\text{эфф}}$  — эффективная (Вант-Гоффа) энтальпия денатурации,  $\Delta G$  — свободная энергия Гиббса,  $T_d$  — температура денатурации.

Таблица 3

Параметры спектров флуоресценции триптофана YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II

Образец иерсинина	Концентрация, мг/мл	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	$\Delta\lambda$ , нм	Квантовый выход	Интенсивность флуоресценции, $I$ , отн. ед.
YER <sub>3</sub> -I	0,05	328	44,0	0,153	9,4
	0,1	328	43,5	0,138	16,9
	0,2	329	44,0	0,127	31,1
YER <sub>3</sub> -II	0,05	329	39,5	0,127	7,8
	0,1	328	39,0	0,115	14,1
	0,2	329	38,5	0,099	24,4

дования. Как видно из табл. 2, величина свободной энергии перехода из нативного состояния в денатурированное, которая является мерой стабильности пространственной структуры белка [17], для YER<sub>3</sub>-I ниже, чем для YER<sub>3</sub>-II.

Известно, что по отношению калориметрической и эффективной энтальпий денатурации можно судить о количестве в молекуле белка областей, плавящихся независимо друг от друга, так называемых энергетических доменов [18]. Как видно из табл. 2, для тримеров порина характерна доменная структура, включающая в себя 2—3 области. Ранее было показано [19], что изменение числа энергетических доменов в белковой глобуле может происходить в связи с изменением условий среды. Например, изменение общего заряда белка сопровождается уменьшением числа кооперативных доменов в глобуле трипсина [19]. Можно предположить, что в случае YER<sub>3</sub>-I уменьшение числа доменов до 2 по сравнению с YER<sub>3</sub>-II свидетельствует о частичной денатурации белка.

Наблюдаемый более высокий максимум денатурационного термоперехода для YER<sub>3</sub>-I можно объяснить наличием прочно связанного детергента.

На следующем этапе исследования методом белковой флуоресценции были изучены особенности локальной третичной структуры тримеров иерсинина, а также изменения ее под действием мочевины и гуанидингидрохлорида.

Положения максимумов суммарных спектров флуоресценции YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II различаются: для YER<sub>3</sub>-II он соответствует 328, для YER<sub>3</sub>-I — 322 нм. Известно [20], что коротковолновое положение максимумов спектров (320—330 нм) и высокие значения квантовых выходов флуоресценции указывают на то, что значительное число остатков триптофана локализовано в участках белковой молекулы со сравнительно малой подвижностью и недоступных молекулам воды. Следовательно, для тримеров иерсинина в растворе характерно полное экранирование остатков триптофана от молекул растворителя. Поскольку YER<sub>3</sub>-II имеет более компактную глобулу, смещение максимума спектра излучения в случае

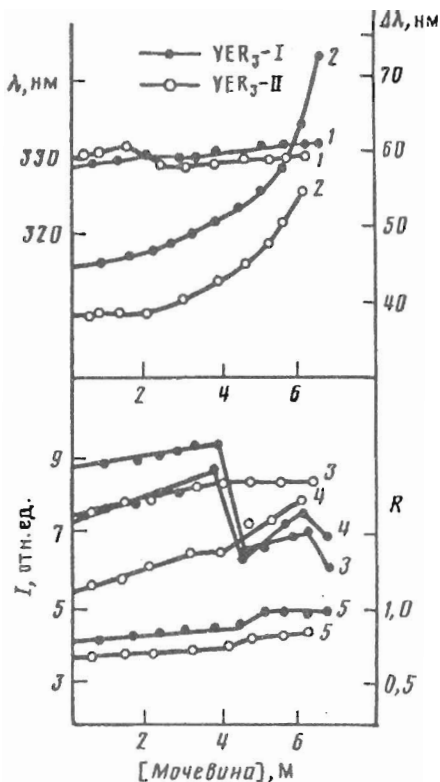


Рис. 4

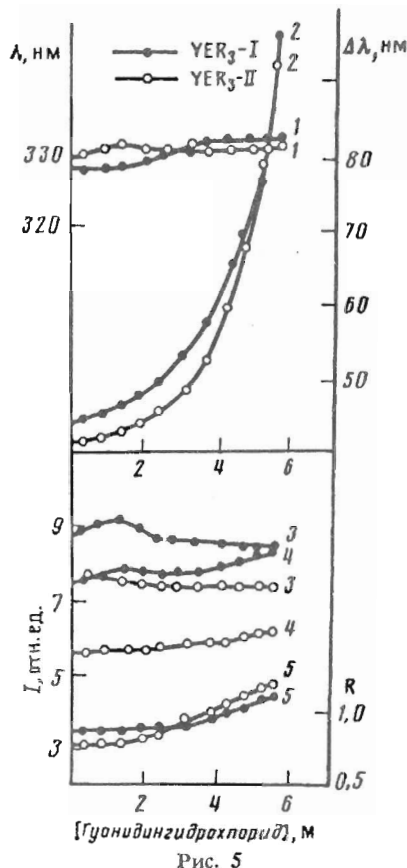


Рис. 5

Рис. 4. Изменение параметров спектров флуоресценции триптофана в зависимости от концентрации мочевины в растворе иерсинина YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II: 1 —  $\lambda$ , нм (положение максимума спектра флуоресценции), 2 —  $\Delta\lambda$ , нм (полуширина спектра излучения), 3, 4 —  $I$  (интенсивность полосы излучения при 320 и 350 нм), 5 —  $R$  (отношение интенсивностей полос флуоресценции  $I_{350}/I_{320}$ )

Рис. 5. Изменение параметров спектров флуоресценции триптофана в зависимости от концентрации гуанидингидрохлорида в растворе иерсинина YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II. Обозначения кривых как на рис. 4

YER<sub>3</sub>-I в сторону эмиссии тирозина можно считать признаком частичной денатурации. Как отмечалось ранее [21], это происходит при уменьшении передачи энергии с тирозина на триптофан, вызванной реорганизацией нативной структуры белка.

Параметры спектров флуоресценции триптофана обоих исследуемых белков приведены в табл. 3. Несмотря на отмеченные выше различия в третичной структуре YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II, микроокружение остатков триптофана у них одинаково, судя по положению максимумов спектров флуоресценции при возбуждении светом с длиной волны 296 нм. Положение  $\lambda_{\max}$ , равное  $328 \pm 2$  нм, указывает на гидрофобное окружение триптофана в молекулах белков. Спектр излучения YER<sub>3</sub>-II имеет меньшую полуширину, меньшую интенсивность флуоресценции, и, следовательно, YER<sub>3</sub>-II имеет меньший квантовый выход, чем YER<sub>3</sub>-I.

Обнаруживается зависимость квантового выхода от концентрации белков в растворе (табл. 3). Порины — это мембранные белки, в водных растворах склонные к агрегации. В процессе агрегации квантовый выход уменьшается за счет самогашения белков и тем сильнее, чем выше их концентрация в растворе. Даже в присутствии детергента порины проявляют склонность к самоассоциации. Поэтому в дальнейшем при изучении их денатурации под действием мочевины и



гуанидингидрохлорида (рис. 4—6) для исключения неспецифических эффектов за счет агрегации использовали растворы с низкой концентрацией белка (0,05 мг/мл). В предварительном эксперименте определили, что зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации белка в пределах до 60—80 мкг/мл имеет линейный характер.

С помощью титрования денатурантами была исследована динамика разворачивания белков. За структурными изменениями следили по изменению параметров флуоресценции остатков триптофана (рис. 4 и 5).

При добавлении к растворам белков мочевины в низких концентрациях наблюдалось увеличение интенсивности излучения и небольшое уширение спектров. Такие изменения в спектрах флуоресценции могут быть вызваны как процессами дезагрегации белка в результате разрыва водородных связей, участвующих в белок-белковых взаимодействиях, так и ослаблением связей между субъединицами тримера. В пользу того, что при денатурации мочевиной не происходит разрыва связей между субъединицами, т. е. процесса мономеризации, говорят данные электрофореза в 4 М мочевины: в этих условиях порин сохраняет тримерную форму.

Интенсивность полос как при 320 нм, так и при 350 нм увеличивается, начиная с самых низких концентраций мочевины (рис. 4). Как видно из рисунка, при концентрации мочевины около 4 М в случае YER<sub>3</sub>-I резко падает интенсивность флуоресценции, которая затем постепенно увеличивается и опять падает. Вероятно, этот факт указывает на существование нескольких конформационных превращений в белке под действием мочевины.

При рассмотрении соотношения интенсивностей полос флуоресценции  $R = I_{350}/I_{320}$  видно небольшое увеличение  $R$  в случае YER<sub>3</sub>-I при концентрации мочевины около 4,5 М, что также может указывать на существование конформационного перехода в белке YER<sub>3</sub>-I при концентрации мочевины 4—4,5 М. Изменение указанных параметров для YER<sub>3</sub>-II носит другой характер. Однако и для этой формы тримеров иерсинина при концентрации около 4 М соответствующие кривые имеют перегиб. Для объяснения молекулярной природы этого перехода и наблюдаемых различий в его характере для YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II требуется дополнительное исследование.

Под действием гуанидингидрохлорида наблюдается более значительное уширение спектров флуоресценции YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II, чем под действием мочевины (рис. 5). Анализ зависимости изменения интенсивностей флуоресценции при 320 и 350 нм от концентрации гуанидингидрохлорида (кривые 3 и 4) позволяет предположить, что конформация YER<sub>3</sub>-I более чувствительна к низким концентрациям этого денатуранта, нежели конформация YER<sub>3</sub>-II. Кривые 5, отражающие зависимость  $R$  ( $I_{350}/I_{320}$ ) от концентрации гуанидингидрохлорида для обоих белков, имеют перегиб в области концентрации 3 М. Очевидно, наиболее существенные пертурбации в микроокружении триптофановых остатков тримеров иерсинина наблюдаются в присутствии 1—3 М гуанидингидрохлорида в растворе.

На рис. 6 приведены спектры флуоресценции остатков триптофана YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II в 8 М мочевины и 6 М гуанидингидрохлориде в сравнении с исходными спектрами. Как видно из рисунка, положение максимумов спектров флуоресценции обоих белков даже при высоких концентрациях денатурантов практически не изменяется. Однако при этом существенно увеличивается полуширина спектров и появляется плечо при 350 нм, что свидетельствует об увеличении в белке числа остатков триптофана, находящихся в полярном окружении. Видимо, в процессе денатурации часть остатков триптофана оказывается на поверхности белковой глобулы, доступной растворителю. Поскольку положение  $\lambda_{\max}$  в спектрах денатурированных белков не изменяется, можно сказать, что другая часть остатков триптофана остается в гидрофобном окружении. Можно предположить, что остатки триптофанов в порине находятся в разных доменах, один из которых имеет структуру, устойчивую к действию денатурантов. Другая часть молекулы белка более чувствительна к процессам денатурации: она легко разворачивается, и



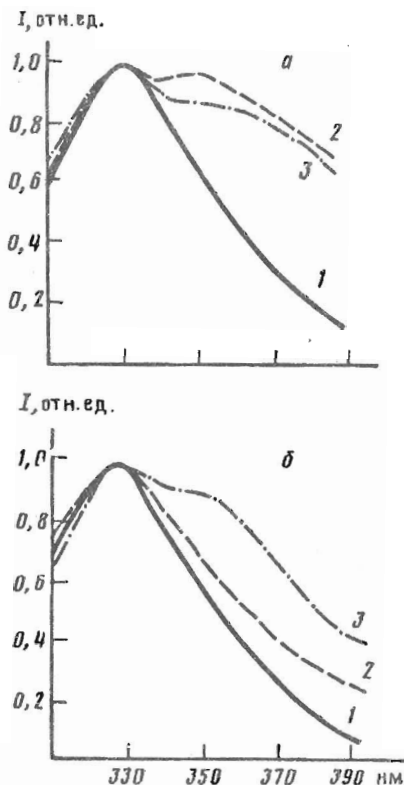


Рис. 6

Рис. 6. Спектры флуоресценции триптофана растворов иерсинина YER<sub>3</sub>-I (а) и YER<sub>3</sub>-II (б) в присутствии 0,25% SDS (1), 8 М мочевины (2) и 6 М гуанидингидрохлорида (3)

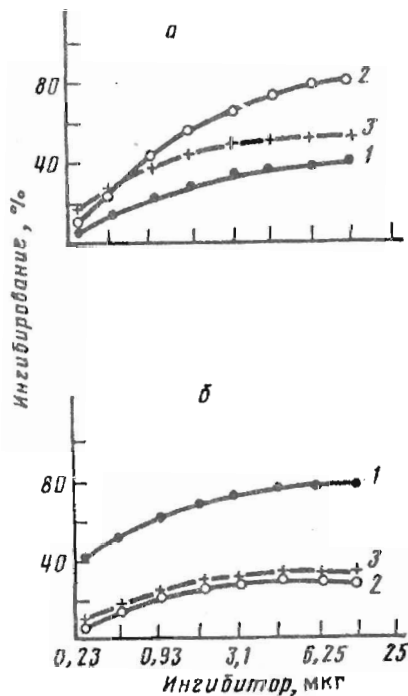


Рис. 7

Рис. 7. Иммуноферментный анализ: ингибирование реакции связывания YER<sub>3</sub>-II (а) и YER<sub>3</sub>-I (б) с соответствующими поликлональными антисыворотками. Ингибиторы: YER<sub>3</sub>-I (1), YER<sub>3</sub>-II (2) и денатурированный мономер иерсинина (3)

расстояние между остатками триптофана при этом увеличивается. Спектры излучения триптофанов, находящихся в разных доменах, слабо перекрываются, в результате в спектре флуоресценции белка появляется плечо (и даже второй максимум). Нельзя исключить также, что при высоких концентрациях денатурирующих добавок возможна частичная диссоциация тримеров иерсинина. В этом случае появление двух максимумов в спектрах флуоресценции можно объяснить присутствием в растворе двух молекулярных форм белка: тримеров и денатурированных мономеров.

Таким образом, анализ спектров собственной флуоресценции белков в исходной и денатурированной формах и изучение динамики изменения параметров спектров флуоресценции триптофана под действием обоих денатурантов позволяет считать, что конформационные превращения, имеющие место в процессе денатурации YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II, подобны, хотя и обнаружены некоторые различия в их характере.

Наблюдаемые различия в поведении белков свидетельствуют в пользу того, что YER<sub>3</sub>-I имеет более развернутую структуру, нежели YER<sub>3</sub>-II. Во-первых, значение интенсивности флуоресценции при  $\lambda = 350$  нм (рис. 4 и 5) для триптофанов, находящихся на поверхности белковой глобулы, в исходном YER<sub>3</sub>-I выше, чем в YER<sub>3</sub>-II; во-вторых, денатурация в случае YER<sub>3</sub>-I идет более глубоко, чем в случае YER<sub>3</sub>-II (рис. 6).

Сравнительное исследование серологической активности YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II

выявило существенные различия между ними. Действительно, гетерологичный антиген ингибирует взаимодействие иерсинина со специфической антисывороткой только на 30—40% (рис. 7). Подобный результат был получен при использовании в качестве ингибитора денатурированного мономера иерсинина.

Ранее было показано [3], что иерсинин имеет составные (конформационные) детерминанты, которые формируются на уровне тримера и разрушаются при диссоциации его на мономеры, а также линейные детерминанты, которые находятся на мономерных субъединицах и сохраняются при денатурации мономеров. На долю антител к эпитопам, присущим мономеру, как показано ранее [3], приходится 50—70% общего количества антител к тримеру порина.

Принимая во внимание вышесказанное, можно предполагать, что различия в антигенных структурах YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II связаны с составными детерминантами, отражающими различия в упаковке тримеров, а частичное ингибирование двух форм тримеров обусловлено термостабильными линейными детерминантами. Не исключено, конечно, существование у YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II идентичных составных детерминант, однако однозначный вывод по этому вопросу может быть сделан только с помощью моноклональных антител.

Анализ совокупности полученных данных позволяет утверждать, что способ извлечения белка из наружной мембраны влияет на макромолекулярную организацию тримеров порина. Основные различия были выявлены на уровне третичной структуры мономеров, входящих в состав тримера иерсинина. Показано, что YER<sub>3</sub>-I отличается менее прочной связью между субъединицами, меньшим количеством кооперативно плавящихся доменов в белковой глобуле. Небольшие нарушения обнаружены и на уровне вторичной структуры этой формы тримеров: в полипептидной цепи белка встречаются  $\alpha$ -спиральные участки.

Таким образом, YER<sub>3</sub>-I — более денатурированная форма тримеров иерсинина по сравнению с YER<sub>3</sub>-II. Вышеперечисленные конформационные изменения в нативной структуре порина появляются, очевидно, в результате воздействия SDS при повышенной температуре в процессе выделения YER<sub>3</sub>-I.

Подобные частично денатурированные стабильные интермедиаты с минимальными нарушениями на уровне вторичной и четвертичной структур, но ослабленным взаимодействием между субъединицами обнаружены и для порина из *E. coli* [2].

Пространственная организация таких форм порина, как показали наши эксперименты, имеет столь же высокую устойчивость к действию различных денатурантов, как и нативная форма белка. К тому же конечный результат денатурации практически не зависит от исходного состояния белка.

Изменения в конформации порина, которые происходят при его выделении из мембраны, влияют на его антигенную структуру и порообразующую активность. И это нужно учитывать при исследовании функциональных и иммунологических свойств поринов.

### Экспериментальная часть

*Выделение и очистка иерсинина.* Олигомерную форму белка получали двумя методами. YER<sub>3</sub>-I выделяли при диссоциации комплекса ПГ—белок, полученного из *Y. pseudotuberculosis* IB-серовара, штамм 598, согласно [7]. Диссоциацию проводили при 37° С в присутствии 0,5 М NaCl и 1% SDS [8]. YER<sub>3</sub>-II получали по методу, описанному в работе [9]. Олигомеры порина очищали с помощью гель-хроматографии на Toyopearl HW-60F (TSK-гель, Toyo Soda, Япония) в присутствии 0,25% SDS.

Степень очистки полученных образцов порина (YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II) анализировали с помощью SDS-ПААГ-электрофореза [22]. Белки, разделенные в геле, окрашивали раствором кумасси ярко-голубого G-250 в 3,5% хлорной кислоте [23].

Моносахариды определяли стандартным методом [24]. Для определения белка использовали модифицированный метод Лоури в присутствии 2% SDS [25].

*Иммунохимические методы.* Антисыворотку против олигомерной формы иер-

синина (YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II) получали иммунизацией кроликов по схеме, описанной в работе [3].

При постановке ИФА применяли непрямой вариант метода, используя в качестве видоых антител коммерческие иммуноферментные конъюгаты производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (Москва). Результаты реакции учитывали на сканирующем спектрофотометре Multiscan (Финляндия) при 492 нм, применяя в качестве хромогена 0,04% раствор *o*-фенилендиамина.

Сенсибилизацию планшетов проводили олигомерной формой иерсинина (YER<sub>3</sub>-I и YER<sub>3</sub>-II) в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,0, содержащем 0,1% SDS, при 37° С в течение 2 ч или при 20° С в течение 16 ч. В качестве ингибиторов использовали те же образцы иерсинина в количестве от 1 нг до 5 мкг.

*Физико-химические методы.* Опыты по скоростной седиментации проводили на аналитической центрифуге УЦА-60 (СКБ АН СССР) с ультрафиолетовой сканирующей системой автоматической регистрации. Седиментацию проводили в двухканальных ячейках при скорости центрифугирования 45 000 об/мин. Коэффициенты седиментации определяли при концентрации белка 0,15—0,6 мг/мл. В качестве растворителя использовали 0,01 М трис-НСI-буфер, pH 7,3, содержащий 0,25% SDS и 0,005 М EDTA. Константы седиментации находили экстраполяцией на бесконечное разбавление методом наименьших квадратов.

Методы получения БЛМ и измерения электропроводности аналогичны описанным в работе [26].

Калориметрические измерения проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре (ДАСМ-4, СКБ АН СССР) со скоростью нагрева 1 град/мин при концентрации белка 1,2—1,5 мг/мл. Чувствительность прибора при этой скорости нагрева соответствовала  $5 \cdot 10^{-5}$  Дж/град.

Термодинамические параметры тепловой денатурации иерсинина  $T_d$ ,  $\Delta H_{\text{кал}}$  и  $\Delta H_{\text{эфф}}$  (температура денатурации, калориметрическая энтальпия денатурации и эффективная (Вант-Гоффа) энтальпия денатурации) определяли из экспериментальных калориметрических кривых, как описано в работе [27].

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре J-500 А с процессором DP-50 1N (Jasco, Япония) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см для ароматической области и 0,1 мм для пептидной области, концентрация иерсинина 1 и 0,1 мг/мл соответственно. Полученные данные представляли в единицах молярной эллиптичности, приходящейся на средний аминокислотный остаток с  $M$  110 Да. Содержание элементов вторичной структуры белка рассчитывали по методу [15].

Корректированные по родамину В (Wako Pure Chemical Industries, Япония) спектры флуоресценции регистрировали на флуориметре Hitachi 850 (Япония) в стандартных кварцевых кюветах (1 см). Ширина щелей возбуждения и эмиссии 5 нм, линии возбуждения 280 и 296 нм.

Относительный квантовый выход флуоресценции белка определяли из отношения площади под спектром белка к площади под спектром свободного триптофана в воде, при этом растворы белка и триптофана имели одинаковое поглощение при длине волны возбуждения.

Авторы выражают глубокую признательность д-ру физ.-мат. наук В. Л. Шнырову (Институт биофизики РАН, Пущино) за помощь при проведении калориметрических исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosenbusch J. P. // *Experientia*. 1990. V. 46. № 2. P. 167—173.
2. Markovic-Hously Z., Garavito R. M. // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. V. 869. № 2. P. 158—170.
3. Новикова О. Д., Фролова Г. М., Вакорина Т. И., Таранкова З. А., Глазунов В. П., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // *Биоорган. химия*. 1989. Т. 15. № 6. С. 763—772.
4. Strittmatter W., Galanos W. // *Microbial Pathogen*. 1987. V. 2. P. 29—36.

5. Schindler M., Rosenbusch J. P. // FEBS Lett. 1984. V. 173. № 1. P. 85—89.
6. Schnaitman C. A. // J. Bacteriol. 1971. V. 108. № 1. P. 545—552.
7. Rosenbusch J. P. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 10. P. 819—829.
8. Reithmeier R. A. F., Bragg P. D. // FEBS Lett. 1974. V. 44. № 2. P. 195—198.
9. Nurminen M. // Enterobacterial Surface Antigens: Methods for Molecular Characterization / Eds Korhonen T. K. et al. N. Y.: Elsevier Science Publ., 1985. P. 293—300.
10. Новикова О. Д., Лихацкая Г. Н., Фролова Г. М., Вострикова О. П., Хоменко В. А., Тимченко Н. Ф., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. № 5. С. 453—461.
11. Rocque W. J., Coughlin R. T., McGroarty E. J. // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 9. P. 4003—4010.
12. Sen K., Nikaido H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 82. № 2. P. 743—747.
13. Rocque W. J., McGroarty E. J. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 3. P. 3738—3744.
14. Manavalan P., Johnson W. C. // Nature. 1983. V. 305. № 27. P. 831—832.
15. Болотина И. А., Лугаускас В. Ю. // Молекулярн. биология. 1985. Т. 19. Вып. 9. С. 1409—1421.
16. Vogel H., Jahning F. // J. Mol. Biol. 1986. V. 190. № 1. P. 191—199.
17. Биохимическая термодинамика / Ред. М. Джоунс. М.: Мир, 1982. С. 22.
18. Privalov H. L. // Adv. Protein Chem. 1982. V. 35. P. 1—26.
19. Макаров А. А., Протасевич И. И., Франк Е. Г., Тришина И. Б., Болотина И. А., Есипова Н. Г. // Биофизика. 1991. Т. 36. Вып. 1. С. 39—45.
20. Burstein E. F., Vedenkina N. F., Ivkova N. N. // Photochem. and Photobiol. 1973. V. 18. № 3. P. 263—279.
21. Arntfield S. D., Ismond M. A. H., Murray E. D. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1987. V. 29. № 1. P. 9—20.
22. Ogita Z., Markert C. L. // Analyt. Biochem. 1979. V. 99. № 2. P. 233—241.
23. Гааль Э., Медведи Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. С. 157.
24. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. R., Rebers P. A., Smith F. // Analyt. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350—356.
25. Kashyar M. L., Hynd B. A., Robinson K. J. // J. Lipid Res. 1980. V. 21. № 4. P. 481—484.
26. Лихацкая Г. Н., Новикова О. Д., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 12. С. 1219—1224.
27. Privalov P. L., Khechinashvili N. N. // J. Mol. Biol. 1974. V. 86. № 7. P. 665—671.

Поступила в редакцию  
22.V.1992

После доработки  
16.X.1992

O. D. Novikova, L. I. Fedoreyeva, V. A. Khomenko, O. Yu. Portnyagina,  
I. M. Ermak, G. N. Likhatskaya, S. V. Moroz,  
T. F. Solov'eva, Yu. S. Ovodov

EFFECT OF THE ISOLATION METHOD ON MACROMOLECULAR  
STRUCTURE OF PORE-FORMING PROTEIN FROM  
*Versinia pseudotuberculosis*

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

By means of physico-chemical methods, lipid bilayer reconstitution and immunoenzymic assay, macromolecular organization of porin oligomers from *Versinia pseudotuberculosis*, isolated by two extraction methods, was studied. Use of SDS and high temperature in the course of the extraction led to a partial denaturation of porin trimers at the level of the tertiary structure, these conformational changes affecting the porin's pore-forming activity and antigenic structure. At the same time, the partially denaturated trimers are as stable under the treatment of urea and guanidine hydrochloride as the native protein.