



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

СВЯЗЫВАНИЕ ПОРИНА С ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ ИЗ *Yersinia pseudotuberculosis*

© 1995 г. Л. И. Федореева, Т. Ф. Соловьева

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

Поступила в редакцию 26.01.94 г. После доработки 19.04.94 г.

Исследовано взаимодействие белка порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* с липидом А, R-ЛПС и S-ЛПС из того же микроорганизма с использованием методов КД-спектроскопии, собственной белковой флуоресценции, дифференциальной сканирующей микрокалориметрии и ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия. Установлено, что связывание белка с лигандами протекает специфично и сопровождается изменениями в конформации порина. Характер взаимодействия порина с лигандом изменяется по мере усложнения молекулы последнего: липид А → R-ЛПС → S-ЛПС. Для липида А на белке имеются два независимых центра связывания с $K_{ac} 6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. R- и S-ЛПС взаимодействуют с порином соответственно с отрицательной и положительной кооперативностью. Возможные механизмы кооперативности обсуждаются.

Ключевые слова: порин, липополисахарид, связывание.

Липополисахарид (ЛПС) и порообразующие тримерные белки (порины) являются основными компонентами наружной мембраны грамотрицательных бактерий [1]. Они специфически взаимодействуют между собой, образуя прочные комплексы. Эти комплексы играют важную роль в поддержании стабильности мембраны и в ее функционировании [2, 3]. Взаимодействие поринов с ЛПС занимает особое место в процессе их сборки в наружной мембране. Высказываются предположения, что после отщепления сигнальной последовательности мономер порина связывает вновь синтезированный ЛПС. Образование комплекса инициирует изменения в конформации порина, которые приводят к тримеризации, и перенос его в наружную мембрану [4, 5]. Однако этот процесс в настоящее время остается практически не исследованным.

В этой связи представляет интерес изучение связывания с ЛПС денатурированного мономера, который в основном сохраняет вторичную структуру нативного порина и отличается от него третичной и четвертичной структурами. Данному вопросу посвящена предлагаемая работа.

Мономерная форма порина была получена из эндотоксина – липополисахарид-белкового комплекса (ЛПБК), выделенного из наружной мембраны псевдотуберкулезного микроба [6]. Ранее

было показано, что в составе ЛПБК порин существует в тримерной форме [7]. В условиях отделения порина от ЛПС (90°C, pH 4.5) происходит диссоциация тримера и частичная денатурация мономера [8]. Молекулярная масса мономерной формы белка, по данным аминокислотного анализа, равна 36.5 кДа.

Методом кругового дихроизма (КД) обнаружено, что добавление ЛПС к белку приводит к изменениям в спектре последнего: максимум отрицательной полосы смещается в длинноволновую сторону и увеличивается молярная эллиптичность (рис. 1а).

При сравнении спектров КД белка и комплекса белок-ЛПС необходимо учитывать вклад амидных хромофоров ЛПС. Сложение спектров белка и ЛПС не приводит к искомому спектру КД искусственного комплекса (рис. 1б). Наблюдаемые изменения в спектрах КД комплекса ЛПС-белок нельзя объяснить вкладом амидных хромофоров ЛПС. Следовательно, в белке в результате связывания происходят конформационные превращения.

Увеличение молярной эллиптичности спектра КД белка находится в прямой зависимости от количества добавленного ЛПС в пределах 0.5 - 6 моль ЛПС на 1 моль белка. Дальнейшее увеличение количества ЛПС (до соотношения 9 моль ЛПС на 1 моль белка) не вызывает изменений в спектрах КД, что свидетельствует, видимо, о насыщении мест связывания при соотношении ЛПС – белок

R-ЛПС – липополисахарид, молекула которого состоит из олигосахарида кора и липида А; S-ЛПС – липополисахарид, молекула которого состоит из O-специфического полисахарида, олигосахарида кора и липида А; ЛПБК – липополисахарид-белковый комплекс, или эндотоксин.

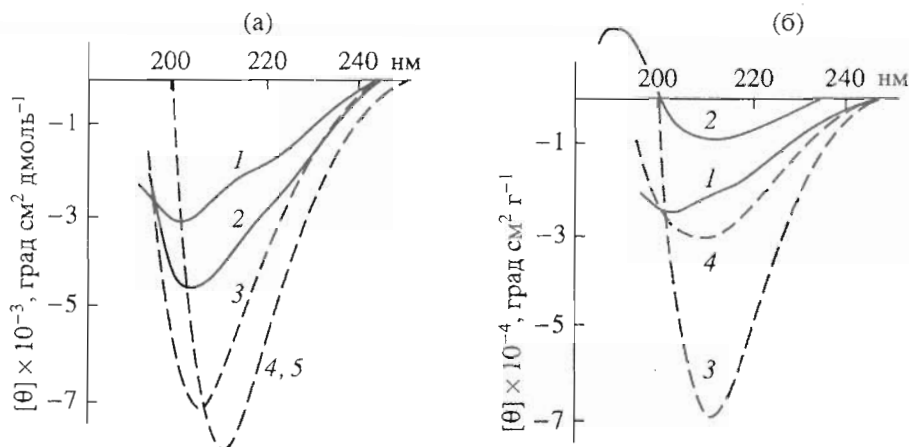


Рис. 1. Спектры КД изолированного белка (1) и комплекса S-ЛПС–белок в молярном соотношении 1 : 1 (2), 3 : 1 (3), 6 : 1 (4), 9 : 1 (5) (а). Концентрация соединений 0.2 мг/мл в 1 мл 0.05 М трис-НСI-буфера, рН 8.4, содержащего 1 мкл триэтиламина. б – учет амидных хромофоров комплекса S-ЛПС–белок: 1 – изолированный белок (0.2 мг/мл), 2 – S-ЛПС (0.1 мг/мл), 3 – комплекс S-ЛПС–белок (6 : 1, моль/моль, 0.8 мг/мл), 4 – спектр, полученный сложением спектров 1 и 2.

около 6 : 1, моль/моль, и тем самым о специфичности взаимодействия.

Изменения в содержании элементов вторичной структуры в белке при его взаимодействии с ЛПС были определены по методу Болотиной [9]. Согласно анализу спектров КД, белок высоко β-структурирован: общее содержание β-складчатых листов и β-изгибов составляет около 80% (таблица). В белке отсутствуют α-спирализованные участки и до 20% приходится на неупорядоченную конформацию. При добавлении ЛПС наблюдается увеличение содержания неупорядоченной структуры, и при соотношении белок – ЛПС 1 : 6, моль/моль, появляется небольшое количество α-спирали. Таким образом, связывание с ЛПС вызывает раскручивание некоторых β-структурированных участков полипептидной цепи, скорее всего находящихся вблизи мест связывания. Как видно из таблицы, порин в составе эндотоксина имеет до 36% неупорядоченной конформации. Возможно, увеличение доли неупорядоченной структуры в белке при комплексовании с ЛПС свидетельствует о его частичной ренатурации.

Содержание элементов вторичной структуры в порообразующем белке и в его комплексах с ЛПС

Соединение	α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Другие
ЛПБК	0.0	50.2	13.1	36.7
Белок	0.0	66.1	13.5	20.4
Белок–ЛПС, 1 : 1	0.0	65.4	11.6	23.0
» 1 : 3	0.0	61.3	13.2	25.5
» 1 : 6	0.1	59.6	9.8	30.5

По данным метода собственной белковой флуоресценции, взаимодействие с ЛПС сопровождается также изменениями в третичной структуре белка. Спектр излучения белка имеет максимумы при 307 и 338 нм при возбуждении светом с длиной волны 280.4 и 296.7 нм соответственно.

Как следует из анализа суммарного спектра флуоресценции белка в терминах модели дискретных состояний остатков ароматических аминокислот [10], основной вклад в спектр вносят остатки тирозина, вклад остатков триптофана незначителен и представлен в основном спектральными классами I и III (рис. 2а). Такой характер излучения белка, видимо, обусловлен отсутствием переноса энергии с тирозиновых остатков на триптофановые и сильным тушением последних. При образовании комплекса белок–ЛПС (1 : 6, моль/моль) максимум спектра смещается в длинноволновую область на 7 нм, появляются триптофановые остатки спектрального класса II, находящиеся в окружении связанной воды, которые отсутствуют в изолированном белке, а вклад в излучение остатков тирозина и интенсивность флуоресценции уменьшается (рис. 2б). При этом максимум спектра триптофановой флуоресценции белка не изменяется.

Можно предположить, что два остатка триптофана в белке находятся в разном микроокружении. Один из остатков расположен на поверхности белковой глобулы, другой – в гидрофобном окружении. При добавлении ЛПС к белку наблюдается “разрыхление” жесткой структуры последнего. Молекулы воды проникают в глубь белковой глобулы, в результате микроокружение остатков триптофана, находящихся в гидрофобном окружении, изменяется на более полярное.

Как следует из рис. 2б, порин в составе ЛПБК имеет локальную третичную структуру, отличную

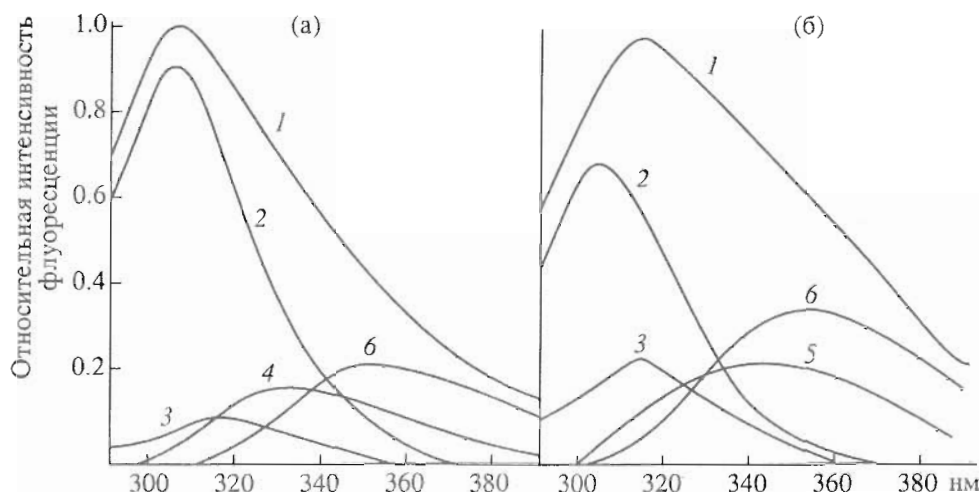


Рис. 2. Анализ спектров собственной флуоресценции на основе дискретных состояний остатков триптофана в белках: изолированного белка (а) и комплекса S-ЛПС-белок (6 : 1, моль/моль) (б): 1 – общий вид спектра, 2 – вклад остатков тирозина, вклад остатков триптофана спектральных классов [14]: S (3), I (4), II (5), III (6). Концентрация соединений 0.1 мг/мл в 0.05 М трис-НСI-буфере, рН 8.4.

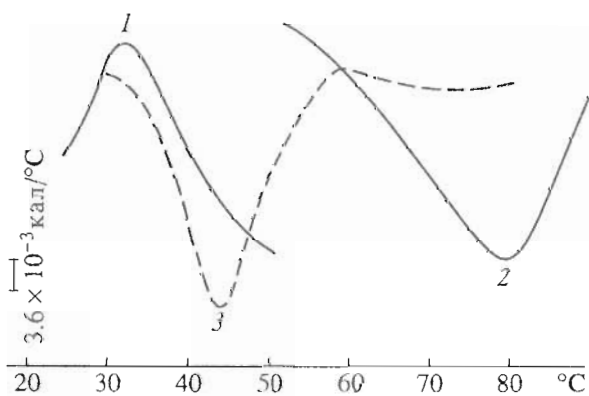


Рис. 3. Термограммы: 1 – изолированного белка (1 мг/мл), 2 – S-ЛПС (0.2 мг/мл), 3 – комплекса S-ЛПС-белок (2.2 мг/мл, 6 : 1, моль/моль). Препараты были растворены в 0.05 М трис-НСI-буфере, рН 8.4, содержащем 1 мкл триэтиламина.

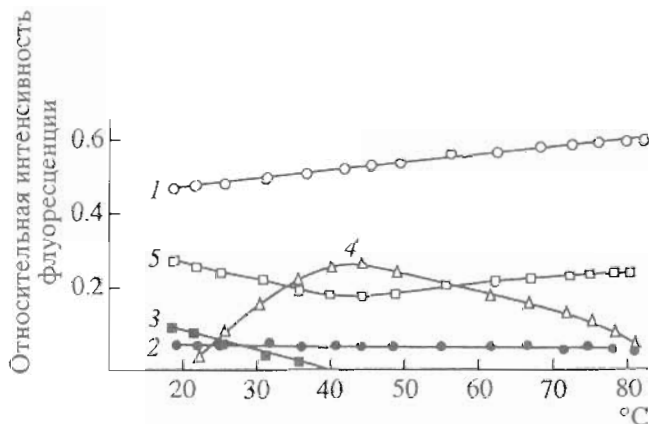


Рис. 4. Зависимость от температуры вкладов в спектр флуоресценции порина остатков тирозина (1) и триптофановых остатков спектральных классов S (2), I (3), II (4), III (5).

от таковой как в изолированном белке, так и в реконструированном комплексе.

Таким образом, при связывании с ЛПС третичная структура белка подвергается изменению, однако восстановления нативной конформации не происходит.

Образование комплекса между белком и ЛПС было подтверждено дифференциальной сканирующей микрокалориметрией. При нагревании смеси белок-ЛПС (1 : 6, моль/моль) происходит экзотермический переход при 45°C (рис. 3). В этой температурной области не найдено структурных переходов ни для изолированного белка, ни для свободного ЛПС. Для ЛПС отмечен экзотермический переход в области 80°C, а для изолированного белка – эндотермический переход при 32°C.

Данные собственной белковой флуоресценции (рис. 4) подтверждают, что термопереход, обна-

руженный микрокалориметрией, связан с образованием комплекса ЛПС-белок. Действительно, этот процесс осуществляется с изменением конформации белка, которое выражается в появлении триптофановых остатков спектрального класса II, характерных для реконструированного комплекса.

Изучение комплексообразования между ЛПС и белком было проведено также методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия (рис. 5). Было установлено, что насыщение порина наступает при соотношении белок – ЛПС 1 : 3, моль/моль. В этом случае ЛПС и белок обнаруживаются в одной зоне плотности, равной 1.405 г/см³. При других соотношениях компонентов наряду с комплексом были обнаружены свободные белок и ЛПС. Различия в составе комплексов ЛПС-белок, рассчитанные

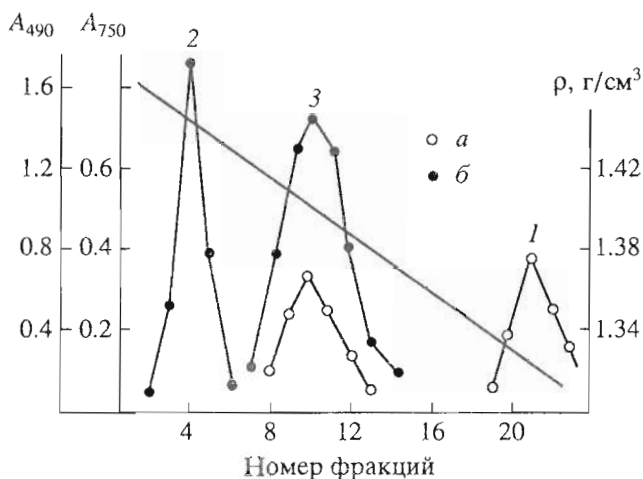


Рис. 5. Ультрацентрифугирование в градиенте плотности CsCl: 1 – изолированного белка (1 мг), 2 – S-ЛПС (1.2 мг), 3 – комплекса S-ЛПС–белок (3 : 1, моль/моль, 2.2 мг). Измерения по белку модифицированным методом Лоури [15] (а) и по углеводам [16] (б).

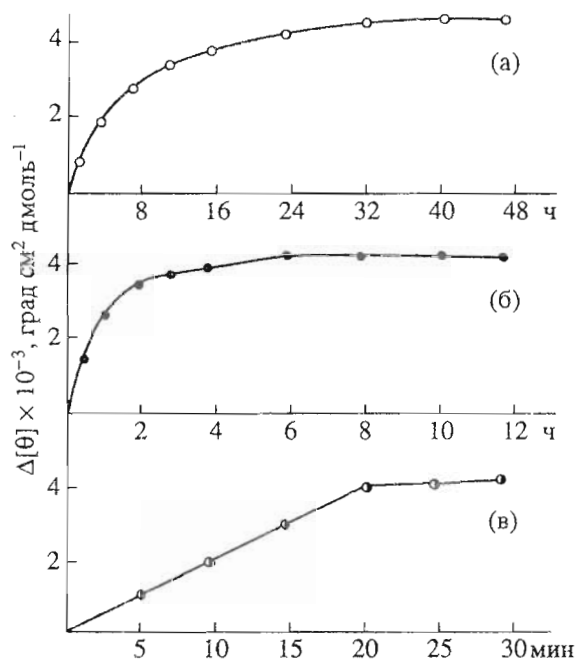


Рис. 6. Зависимость изменения молярной эллиптичности комплекса S-ЛПС–белок (6 : 1, моль/моль) от времени при 20 (а), 37 (б) и 60°C (в).

спектральными методами (6 : 1) и методом ультрацентрифугирования (3 : 1) в точке насыщения, можно объяснить нарушением связывания белка на некоторых сайтах под влиянием высокой ионной силы в условиях ультрацентрифугирования.

Для изучения процесса связывания белка с ЛПС были определены условия достижения системой равновесия (рис. 6). Как было показано методом КД-спектроскопии, равновесие устанавливается медленно, и на этот процесс влияет температура.

При 25°C изменение молярной эллиптичности прекращается только через 40 ч. С повышением температуры равновесие достигается быстрее: при 37°C достаточно 2 ч, а при 60°C – 0.5 ч. Следует отметить, что значение молярной эллиптичности в точке насыщения не зависит от температуры.

На основании полученных результатов были выбраны условия проведения опытов по равновесному связыванию.

ЛПС – это биополимер, молекула которого состоит из трех фрагментов: O-специфических полисахаридных цепей, олигосахарида кора и липида А, различающихся между собой по степени гидрофобности и по заряду. Чтобы определить молекулярный механизм взаимодействия между компонентами, мы исследовали процесс связывания с белком не только полного ЛПС – S-ЛПС, но и R-ЛПС, молекула которого состоит из липида А и олигосахарида кора, а также свободного липида А.

Изотермы связывания были построены на основе данных, полученных флуоресцентной спектроскопией (рис. 7). При постепенном добавлении к раствору порина вышеуказанных лигандов было отмечено уменьшение интенсивности собственной белковой флуоресценции (при λ_{\max}) до предельной величины, по достижении которой дальнейшее тушение флуоресценции не происходит, несмотря на увеличение концентрации лиганда, т.е. наступает насыщение центров связывания на белке, что является одним из признаков специфического взаимодействия компонентов.

Максимальное падение интенсивности флуоресценции в случае, когда все участки связывания на белке заняты лигандом, определяли из графика двойной обратной зависимости изменения интенсивности излучения от концентрации ЛПС (данные не приведены). Предполагая, что изменение интенсивности собственной флуоресценции порина зависит только от количества связанного лиганда, рассчитывали степень насыщения мест связывания при каждой концентрации лиганда.

На основании анализа кривых адсорбции для липида А, R- и S-ЛПС (рис. 7) можно предположить, что только при взаимодействии белка с липидом А отсутствует кооперативность. Вид графиков Скэтчарда подтверждает это предположение (рис. 8). Графики Скэтчарда были построены при допущении, что концентрация свободного лиганда равна общей его концентрации в системе [11].

Для липида А график Скэтчарда представляет прямую линию. Это позволяет считать, что на белке имеются эквивалентные, независимые места связывания для липида А. Используя метод Стинсона–Холбрука [12], определили количественные характеристики взаимодействия белка

с липидом А: число мест связывания равно 2, константа связывания $K_{ac} = 6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (рис. 9).

В случае R-ЛПС график Скэтчарда оказывается нелинейным и представляет собой вогнутую кривую (рис. 8). Такой вид графика можно объяснить как наличием на белке мест связывания разных типов, так и отрицательным взаимодействием между центрами. Если принять во внимание строение R-ЛПС, то модель, включающая центры по крайней мере двух типов, представляется весьма обоснованной. Можно предположить, что кроме двух сайтов для связывания с гидрофобным липидом А имеются участки, взаимодействующие с олигосахаридным фрагментом R-ЛПС. В связывании, вероятно, принимают участие отрицательно заряженные группы олигосахарида. В пользу ионного характера связывания ЛПС на части сайтов на белке могут свидетельствовать приведенные выше результаты ультрацентрифугирования в градиенте плотности.

Наблюдаемая отрицательная кооперативность может быть не только результатом различной аффинности мест связывания для липида А и кора, но также следствием того, что при низких концентрациях происходит высокоаффинное двухвалентное связывание R-ЛПС, а при более высоких концентрациях преобладает низкоаффинное моновалентное.

Антикооперативность может быть связана также с конформационными превращениями в белке. Ранее было показано, что при связывании порина с липидом А происходят изменения в пространственной организации белка [13]. Аналогичные изменения наблюдаются и при взаимодействии порина с ЛПС. Это позволяет предполагать, что основные конформационные перестройки в порине под действием ЛПС обусловлены замещением центров, имеющих сродство к липиду А. В этом случае связывание R-ЛПС на центрах, специфичных для липида А, может вызывать конформационный переход, приводящий к появлению сайтов, которые связываются с олигосахаридом кора.

Усложнение молекулы ЛПС за счет присоединения к R-ЛПС O-полисахаридных цепей (S-ЛПС) приводит к изменению характера взаимодействия его с белком. Это выражается в изменении вида кривых, описывающих процесс связывания (рис. 7 - 9). Кривая насыщения для S-ЛПС имеет сигмовидную форму, а график Скэтчарда имеет вид выпуклой кривой. Эти данные доказывают, что связывание полного ЛПС с порином происходит с положительной кооперативностью.

Такой эффект, возможно, является результатом взаимодействия между молекулами S-ЛПС через O-полисахаридные цепи. Этот тип углевод-углеводного взаимодействия был описан для молекул ЛПС в агрегатах [14].

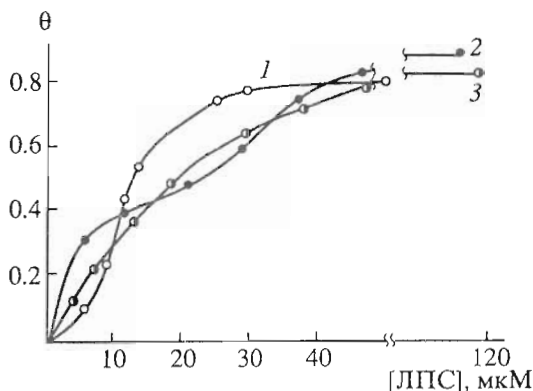


Рис. 7. Зависимость степени насыщения (f) белка порина липидным лигандом от концентрации лигандов. 1 - S-ЛПС, 2 - R-ЛПС, 3 - липид А. Условия: концентрация белка 2.7 мкМ в 1 мл 0.05 М трис-НСl, pH 8.4, содержащего 1 мкл триэтиламина. S-, R-ЛПС и липид А были растворены в том же буфере.

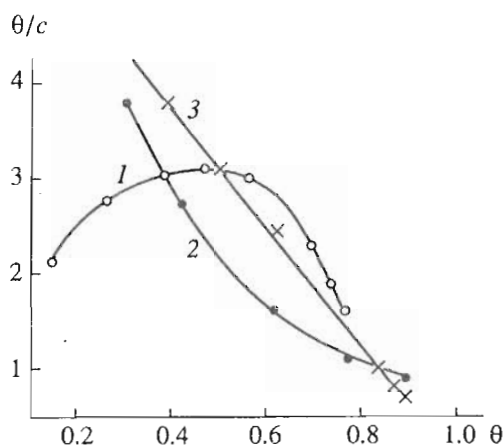


Рис. 8. Графики Скэтчарда: S-ЛПС (1), R-ЛПС (2), липид А (3). Условия как на рис. 7, c - концентрация (мкМ).

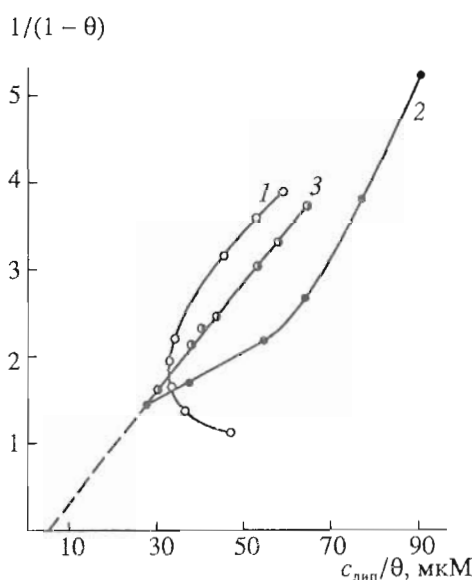


Рис. 9. Графики Стинсона-Холбрука расчета параметров связывания белка с S-ЛПС (1), R-ЛПС (2), липидом А (3). Условия см. рис. 7.

В данном случае взаимодействию между О-полисахаридными цепями может способствовать то, что связывание на соседних центрах создает высокую локальную концентрацию ЛПС и обеспечивает время контакта, необходимое для образования комплексов. Конформационные изменения в белке, которые происходят по мере связывания ЛПС, также могут быть частью механизма кооперативности. Однако, каков бы ни был этот механизм, О-полисахаридные цепи являются важным фактором, определяющим положительную кооперативность при взаимодействии между полными ЛПС и порином.

Таким образом, белок порин из внешней мембраны *Y. pseudotuberculosis* в частично денатурированной форме специфически с положительной кооперативностью взаимодействует с ЛПС. Образование комплекса сопровождается изменением конформации белка, однако полной ренатурации порина не происходит. Белок имеет центры связывания двух или более типов, имеющих сходство к разным участкам молекулы ЛПС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аналитические методы. Анализ аминокислот проводили как описано в работе [8]. Для определения содержания белка использовали модифицированный метод Лоури в присутствии 2% SDS [15]. Содержание моносахаридов определяли по методу [16]. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS проводили в трис-глициновом буфере, согласно работе [17].

Выделение белка. Высушенную ацетоном микробную массу (50 г) экстрагировали 5% трихлоруксусной кислотой (500 мл). Полученный ЛПС-белковый комплекс подвергали гель-фильтрации на сефарозе 2В. Очищенный комплекс (200 мг) гидролизали 6 ч 1% уксусной кислотой (20 мл) при 90°C. Полученный фрагмент липид А-порин (20 мг) фракционировали на компоненты как описано [6]. Выход белка 7.9 мг.

Выделение S-ЛПС. Сухие микробные клетки (90 г) экстрагировали 45% фенолом при 65 - 68°C, как описано [18]. Дополнительную очистку ЛПС от белка осуществляли экстракцией 90% фенолом при 65 - 68°C в течение 45 мин в соответствии с методом [19]. Водную фазу после обработки ее эфиром диализовали и лиофильно высушивали. Выход ЛПС после двух экстракций 200 мг. Содержание (%): белок 0.5, моносахариды 55.4, 3-кето-3-дезоксиктоновая кислота (КДО) 7.2. Средняя молекулярная масса S-ЛПС, определенная из SDS-электрофореза в полиакриламидном геле [20], равна 8 кДа.

Выделение R-ЛПС. 30 г высушенной микробной массы экстрагировали смесью фенол-хлороформ-петролейный эфир (2 : 5 : 8) (120 мл) в те-

чение нескольких минут при 5°C при перемешивании [21]. Растворители упаривали, к фенольной фазе добавляли воду по каплям. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, суспендировали в воде и лиофилизировали. Выход R-ЛПС 20 мг. Средняя молекулярная масса R-ЛПС равна 4 кДа.

Выделение липида А. S-ЛПС (100 мг) гидролизали 1% уксусной кислотой (10 мл) в течение 2 ч при 100°C [22]. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, растворяли в хлороформе и осаждали ацетоном. Выход липида А 18 мг. Средняя молекулярная масса равна 2.2 кДа.

Реконструкция искусственных комплексов. Белок растворяли в 1 мл 0.05 М трис-HCl-буфера (pH 8.4), содержащего 1 мкл триэтиламина. S-ЛПС, R-ЛПС и липид А растворяли в том же буфере. Растворы смешивали и выдерживали 2 сут при 37°C. За образованием комплекса следили методами изоплотностного ультрацентрифугирования, микрокалориметрии и оптической спектроскопии.

Ультрацентрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия. Образцы растворяли в 10 мл раствора хлористого цезия со средней плотностью 1.41 г/см³. Центрифугирование проводили в роторе Ti-50 центрифуги K-32 при 56000 об/мин в течение 72 ч при 20°C. Содержимое пробирок разливали по каплям через дно, собирая по 0.3 мл раствора, и анализировали на присутствие белка, углеводов и КДО. Плотность растворов хлористого цезия рассчитывали на основании показателя преломления, определяемого на рефрактометре РФ-4.

Методы оптической спектроскопии. Спектры КД регистрировали на автоматическом спектрополяриметре (Jasco J-500 A, Япония) в диапазоне 200 - 250 нм в кювете с длиной оптического пути 0.1 мм. Кювета с образцами помещалась на максимальном расстоянии перед детектором. Молярная эллиптичность рассчитана на средний аминокислотный остаток с молекулярной массой 110 Да.

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре (Cary 219, США). Коэффициент поглощения белка (1 мг/мл, 0.05 М трис-HCl-буфер, pH 8.4) A_{278} 1.22.

Спектры собственной белковой флуоресценции препаратов снимали на установке лабораторного типа, описанной в работе [23]. Спектры излучения регистрировали с передней стенки кюветы. Флуоресценцию белка возбуждали светом ртутной лампы при 280.4 нм. Спектры собственной флуоресценции снимали также на спектрофлуориметре (Hitachi 850, Япония).

Калориметрические измерения проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (СКБ БП РАН) при скорости нагрева 1 К/мин. Чувствительность прибора при этой

скорости прогрева соответствовала 10^{-5} Дж/град. Объем платиновой измерительной ячейки 0.5 мл. Для получения базовой линии обе калориметрические ячейки заполняли буфером, используемым при растворении.

Параметры процесса комплексообразования были рассчитаны в условиях равновесия, которое достигалось через 30 мин при 37°C при интенсивном перемешивании. Степень насыщения (f) определяли по изменению интенсивности флуоресценции белка:

$$f = (F_0 - F)/(F_0 - F_{\max}),$$

где F_0 и F – интенсивность флуоресценции при 307 нм, исходная и после добавления липидных образцов, F_{\max} – максимальное падение флуоресценции. Все значения (F) были скорректированы с учетом внутреннего фильтра, определенного по формуле [24]

$$F_{\text{корр}} = F_{\text{набл}} \text{antilog}(A_{307} + A_{280})/2,$$

где A – оптическое поглощение, определенное из УФ-спектров.

Авторы выражают благодарность д-рам биол. наук Е.А. Пермякову и В.Л. Шнырову за помощь в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lugtenberg B., van Alphen L. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 737. № 1. P. 51 - 115.
2. Gmeiner J., Schlecht S. // Arch. Microbiol. 1980. V. 127. № 1. P. 81 - 86.
3. Konisky J. // Bacterial outer Membranes: Biogenesis and Functions / Ed. Inouye M. N.Y.: John Wiley and Sons. Inc., 1979. P. 319 - 359.
4. Pages M., Bolla J.M. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 176. № 2. P. 655 - 660.
5. Reid G., Hindennach I., Henning U. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 10. P. 6048 - 6053.
6. Федорева Л.И., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 1. С. 93 - 99.
7. Соловьева Т.Ф., Бахолдина С.И., Ермак И.М., Хоменко В.А., Федорева Л.И., Новикова О.Д., Фролова Г.М., Лихацкая Г.Н., Оводов Ю.С. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1301 - 1309.
8. Федорева Л.И., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 6. С. 737 - 747.
9. Болотина И.А., Лугаускас В.Ю. // Молекулярн. биология. 1985. Т. 19. Вып. 9. С. 1409 - 1421.
10. Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. // Photochem. and Photobiol. 1973. V. 18. № 3. P. 263 - 279.
11. Мецлер Д. // Биохимия. М.: Мир, 1980. С. 249 - 252.
12. Stinson R.A., Holbrook J.J. // Biochem. J. 1973. V. 131. № 3. P. 719 - 725.
13. Федорева Л.И., Горбач В.И. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 10. С. 933 - 940.
14. Peterson A.A., Haug A., McGroarty E.J. // J. Bacteriol. 1986. V. 165. № 1. P. 116 - 122.
15. Kashyp M.L., Hynd B.A., Robinson K. // J. Lipid Res. 1980. V. 21. № 4. P. 431 - 484.
16. Dubois M., Gilles K., Hamilton I.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350 - 356.
17. Ogita Z., Market C.L. // Analyt. Biochem. 1979. V. 99. № 2. P. 233 - 241.
18. Westphal O., Jann K. // Methods in Carbohydrate Chemistry. V. 5 / Ed. Whistler R.L. N.Y.: Acad. Press. 1965. P. 82 - 91.
19. Westphal O., Luderitz O., Bister F. // Z. Naturforsch. 1952. V. 76. № 3. P. 148 - 155.
20. Peterson A.A., McGroarty E.J. // J. Bacteriol. 1985. V. 162. № 2. P. 738 - 745.
21. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. // Eur. J. Biochem. 1969. V. 9. № 2. P. 245 - 249.
22. Krasikova I.N., Gorbach V.I., Solov'eva T.F., Ovodov Yu.S. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 89. № 1. P. 287 - 289.
23. Permyakov E.A., Burstein E.A., Sawada Y., Jamazahi J. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 491. № 1. P. 149 - 154.
24. Oberfelder R.W., Lee J.C. // Meth. Enzymol. 1985. V. 117. P. 385 - 388.

Interaction of Porin with Lipopolysaccharide from *Yersinia pseudotuberculosis*

L. I. Fedoreeva and T. F. Solov'eva

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok
Address: pr. 100-Letiya, 159, 690022 Vladivostok.

Abstract – Interactions, of porin a protein from *Yersinia pseudotuberculosis*, with S- and R-LPS and lipid A were investigated by means of fluorescence and CD-spectroscopy, differential scanning microcalorimetry and CsCl gradient ultracentrifugation. S-LPS – porin monomer stoichiometry was shown by fluorescence titration to be 6 : 1. Ultracentrifugation data suggest that the maximum number of LPS molecules bound per porin monomer in three. Two equivalent lipid A binding sites on porin were determined, data the associated binding constant being $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Interactions between S- and R-LPS and porin monomer were shown to be positive and negative cooperativity, respectively. The data suggest an important role of the structural moieties of LPS molecule in the binding process. On the basis of these results and the structure of ligands a mechanism of LPS-porin interaction is discussed.

Key words: porin, lipopolysaccharide, interaction.