

Л.М. Поляков, Т.В. Зуева, Д.В. Суменкова, Л.Е. Панин

РОЛЬ ЛИПОПРОТЕИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ В СВЯЗЫВАНИИ ПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО И ДРОЖЖЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ГУ НИИ биохимии СО РАМН, Новосибирск

Методами тушения триптофановой флуоресценции и изменения электрофоретической подвижности в геле агарозы установлено, что в процессах комплексообразования липопротеинов с полисахаридами (липополисахарид из *Escherichia coli*, карбоксиметилованный гликан, сульфэтилированный гликан) принимает участие белковый компонент липопротеинов, при этом переносимые лиганды связываются на поверхности липопротеиновых частиц. Механизм образования таких комплексов можно отнести к типичному лиганд-рецепторному взаимодействию.

Ключевые слова: липополисахарид, карбоксиметилованный гликан, сульфэтилированный гликан, липопротеины, аполипротеин А-I.

В настоящее время внимание исследователей обращено на выяснение роли липопротеинов в транспорте ксенобиотиков и различных биологически активных веществ [1, 2]. Имеются данные, что липопротеины, наряду с липополисахарид-связывающим белком (lipopolysaccharid binding protein), также могут являться переносчиками полисахаридов в плазме крови [3]. Способность частиц ЛПВП связывать и нейтрализовать бактериальные липополисахариды впервые обнаружили Вурфел и соавт. [4, 5]. Внутривенное введение кроликам человеческих ЛПВП вызывало снижение продукции фактора некроза опухоли- α в ответ на липополисахаридную стимуляцию [6, 7]. ЛПВП из нормальной плазмы крови человека нейтрализуют бактериальные ЛПС и могут играть важную роль в механизме защиты организма при инфицировании его (сепсисе) грамотрицательными бактериями [8, 9]. Это было экспериментально подтверждено на модели эндотоксического шока животных [10].

В настоящей работе нами показана роль липопротеинов плазмы крови в связывании бактериального липополисахарида из *Escherichia coli* и полисахаридов дрожжевого происхождения — карбоксиметилованного гликана и сульфэтилированного гликана. Для установления характера и степени связывания липопротеинов с вышеперечисленными лигандами использовали метод тушения триптофановой флуоресценции и электрофореза в геле агарозы.

Материалы и методы исследования

Выделение липопротеинов из плазмы крови человека проводили флотацией в растворах

KBr [11] на ультрацентрифуге «Optima L-90K, Beckman-Coulter» (Австрия) с использованием ротора 70.1 Ti. Получали три основные фракции липопротеинов: ЛПОНП ($0,94 < d < 1,006$ г/мл), ЛПНП ($1,006 < d < 1,063$ г/мл) и ЛПВП ($1,063 < d < 1,21$ г/мл).

Делипидирование липопротеинов проводили охлажденной смесью хлороформ-метанол (1:1) из расчета 20 мл смеси на 1 мл раствора ЛП. с последующей многократной отмывкой эфиром. Для получения аполипротеина А-I суммарные белки ЛПВП наносили на колонку (1,6×100 см) с сефарозой 6B-CL «Pharmacia» (Швеция) и элюировали 0,01 М Трис-HCl буфером, pH 8,6, содержащим 6 М мочевины, 0,01% азид натрия и 1 мМ фенилметансульфонилфторид (ФМСФ). Скорость потока — 10 мл/ч, скорость самописца — 9 мм/ч. Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе 2151 «LKB» (Швеция). Проверка чистоты аполипротеина А-I осуществлялась с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия [12]. Белковые полосы визуализировали 0,1% Кумасси G-250 в смеси метанола и 10% уксусной кислоты (1:1). В качестве маркеров использовали низкомолекулярные белки-стандарты: фосфорилаза — 94 кДа, альбумин — 67 кДа, овальбумин — 43 кДа, карбоангидраза — 30 кДа и лактальбумин — 14,4 кДа.

В работе использовали полисахариды бактериального (липополисахарид из *Escherichia coli*, «Sigma», USA), и дрожжевого происхождения (карбоксиметилованный β -D-гликан и сульфэтилированный β -D-гликан). Гликаны произведены в Институте химии Словацкой академии наук

(Братислава, Словакия) и любезно предоставлены профессором Т.А. Короленко из НИИ физиологии СО РАМН. Полисахариды в концентрации 10 и 20 мкг/мл добавляли к ЛП-фракциям — 1 мг белка/мл. Электрофорез ЛПНП и ЛПВП после инкубации с полисахаридами проводили в 1% геле агарозы в Трис-барбитуратном буфере при pH 8,6 [13]. Анализ взаимодействия триптофансодержащих белков ЛП-фракций с полисахаридами проводили на спектрофлуориметре MPF-4 «Хитачи» (Япония) при длине волны возбуждения 285 нм и эмиссии в диапазоне от 300 до 600 нм.

Результаты

Высокая специфичность и чувствительность флуоресцентных методов позволяет их широко применять для анализа взаимодействий типа «белок-лиганд». Известно, что из трех флуоресцирующих аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин) только триптофан дает наиболее богатую информацию о структуре макромолекулы. Считается, что триптофан является естественной «меткой-репортером», поэтому исследование параметров его флуоресценции дает представление о характере его микроокружения, его изменениях при определенных воздействиях, в частности, при комплексообразовании. К тому же флуоресценция тирозина (при возбуждении на 280 нм) подавляется в результате влияния полярных группировок (CO, NH₂), соседних пептидных связей, а фенилаланин дает очень низкий квантовый выход [14].

Изучение спектров флуоресценции разных классов ЛП показало, что они различаются по форме и по значениям длин волн максимумов. Класс ЛПВП имел самый короткий максимум — 333 нм, у ЛПНП этот показатель был сдвинут на 2 нм в красную область, а у ЛПОНП максимум флуоресценции составлял 338 нм. Интересно, что сам триптофан в водном растворе имел максимум флуоресценции 354 нм. Характерный коротковолновый сдвиг флуоресценции триптофанилов во фракциях ЛП можно объяснить особенностями микроокружения: полярного (водного) для раствора триптофана и неполярного (липидного) в структуре белкового компонента ЛП.

Взаимодействие бактериального липополисахарида из *Escherichia coli* с ЛП-фракциями сопровождалось изменением интенсивности триптофановой флуоресценции (Рис. 1). Величина флуоресценции зависела от времени. Полное насыщение связывающих областей ЛП-частиц липополисахаридом наблюдалось через 20-30 минут от начала опыта. Взаимодействие липополисахарида с ЛПВП приводило к увеличению флуоресценции триптофана на 25%, а при взаимодействии с ЛПНП наблюдалось выраженное тушение

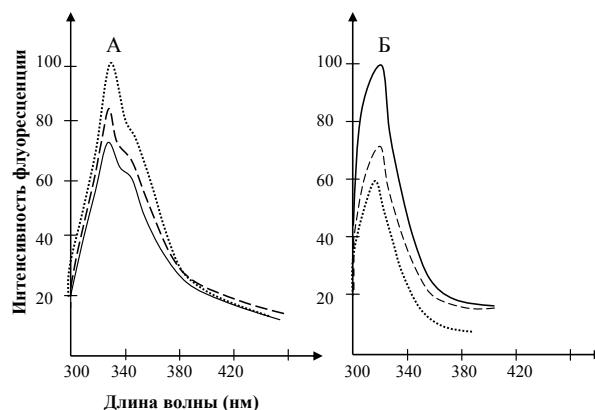


Рис. 1. Спектры флуоресценции ЛПВП (А) и ЛПНП (Б) при взаимодействии с липополисахаридом из *Escherichia coli*.

(—) — ЛП (исходный спектр);
(---) — ЛП + ЛПС (через 5 мин);
(.....) — ЛП + ЛПС (через 30 мин)

флуоресценции на 35-40%. При этом форма спектров практически не изменялась. Наблюдался слабый голубой сдвиг на 1-3 нм, что объясняется локальными конформационными перестройками белкового компонента липопротеиновых частиц после взаимодействия его с лигандом. Для окончательного решения вопроса о роли липидного и белкового компонента в связывании полисахаридных лигандов в первую очередь необходимо иметь в наличии высокоочищенные и активные аполипопротеины. Аполипопротеин А-I из смеси суммарных белков ЛПВП выделяли методом гель-фильтрации. При электрофорезе в полиакриламидном геле очищенный белок мигрировал в геле одной полосой и не содержал примесей других белков (Рис. 2).

Взаимодействие полисахаридов (ЛПС, КМГ, СЭГ) с изолированным, электрофоретически чистым аполипопротеином А-I сопровождалось тушением триптофановой флуоресценции (Рис. 3) на 20, 40 и 10%, соответственно.

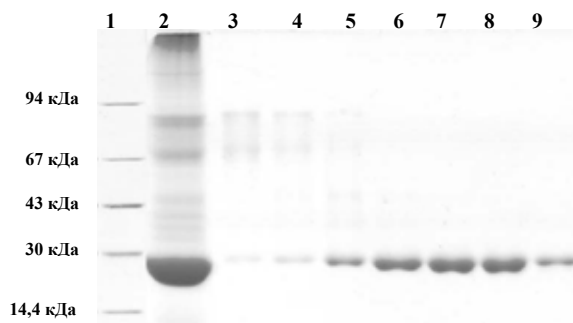


Рис. 2. Стадии хроматографической очистки аполипопротеина А-I по данным электрофореза в ПААГ (12,5%).

1 — низкомолекулярные белки-стандарты; 2 — суммарные белки ЛПВП; 3-4 — минорные белки ЛПВП; 5-9 — очищенный аполипопротеин А-I

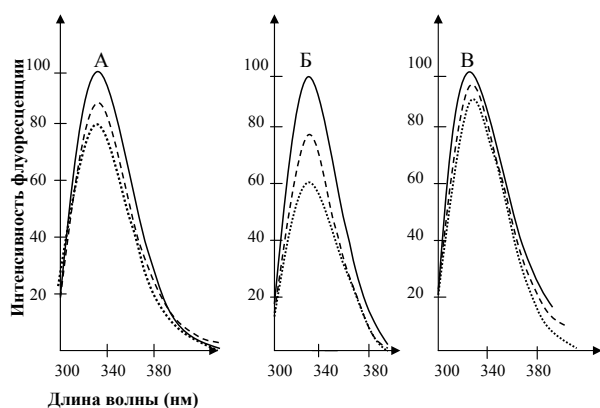


Рис. 3. Спектры триптофановой флуоресценции при взаимодействии аполипопротеина А-I с бактериальным липополисахаридом (ЛПС), карбоксиметилированным гликаном (КМГ) и сульфэтилированным гликаном (СЭГ).
А. (—) — А-I (исходный спектр);
(----) — А-I + ЛПС (через 5 мин);
(.....) — А-I + ЛПС (через 30 мин).
Б. (—) — А-I (исходный спектр);
(----) — А-I + КМГ (через 5 мин);
(.....) — А-I + КМГ (через 30 мин).
В. (—) — А-I (исходный спектр);
(----) — А-I + СЭГ (через 5 мин);
(.....) — А-I + СЭГ (через 30 мин)

Связывание липополисахаридов с различными классами липопротеинов нами исследовалось также с помощью электрофореза в геле агарозы. Поскольку ЛПС является отрицательно заряженной структурой, его взаимодействие с липопротеинами должно увеличивать скорость миграции липопротеиновых частиц к аноду. На рис. 4 видно, что добавление ЛПС к ЛПНП в концентрации 10 мкг/мл практически не влияло на электрофоретическую подвижность ЛП-частиц (Рис. 4А, дорожка 2). Однако при концентрации ЛПС 20 мкг/мл электрофоретическая подвижность ЛПНП возрастала, что свидетельствует об увеличении отрицательного заряда и модификации белкового компонента частиц ЛПНП (дорожка 3).

При добавлении ЛПС к ЛПВП и ЛПОНП наблюдали увеличение их электрофоретической подвижности пропорционально количеству связанного ЛПС (А, дорожки 5 и 6; Б, дорожки 2 и 3). При этом увеличивалась скорость миграции к аноду как второго, так и третьего подкласса ЛПВП. Это явление, вероятно, можно объяснить модификацией положительно заряженных остатков аргинина и лизина белкового компонента ЛП-частиц за счет ионного взаимодействия с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты молекулы липополисахарида.

При анализе взаимодействия изолированного, электрофоретически чистого аполипопротеина А-I с ЛПС (10 и 20 мкг/мл) скорость электрофоретической подвижности белка увеличивалась пропорционально количеству связанного полисахарида (Рис. 4 В, дорожка 2 и 3).

Таким образом, методами тушения триптофановой флуоресценции и электрофореза в геле агарозы установлено, что в процессах комплексообразования липопротеинов с полисахаридами (ЛПС, КМГ, СЭГ) принимает участие белковый компонент липопротеинов, при этом переносимые лиганды связываются на поверхности ЛП-частиц. Механизм образования таких комплексов, как ЛПС-ЛП, КМГ-ЛП и СЭГ-ЛП, в большей части, можно отнести к типичному лиганд-рецепторному взаимодействию.

ROLE OF BLOOD PLASMA LIPOPROTEINS IN BINDING OF POLYSACCHARIDES FROM BACTERIA AND YEASTS

L.M. Polyakov, T.V. Zueva, D.V. Sumenkova, L.E. Panin

By the methods of tryptophan fluorescence quenching and change electrophoresis mobility in agarose gel it is established that in interactions of lipoproteins with polysaccharides (lipopolysaccha-

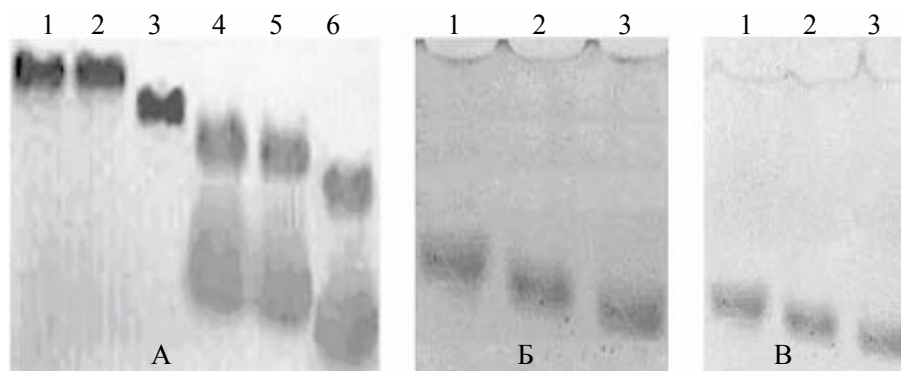


Рис. 4. Изменение электрофоретической подвижности в 1% агарозе ЛПНП, ЛПВП, ЛПОНП и апоА-I при комплексообразовании с липополисахаридом (ЛПС).
А. 1 — ЛПНП (контроль); 2 — ЛПНП + ЛПС (10 мкг/мл); 3 — ЛПНП + ЛПС (20 мкг/мл); 4 — ЛПВП (контроль); 5 — ЛПВП + ЛПС (10 мкг/мл); 6 — ЛПВП + ЛПС (20 мкг/мл).
Б. 1 — ЛПОНП (контроль); 2 — ЛПОНП + ЛПС (10 мкг/мл); 3 — ЛПОНП + ЛПС (20 мкг/мл).
В. 1 — апоА-I (контроль); 2 — апоА-I + ЛПС (10 мкг/мл); 3 — апоА-I + ЛПС (20 мкг/мл)

rides from *Escherichia coli*, carboxymethylated and sulfoethylated β -D-glucan) a protein component of lipoproteins takes part. These transferable ligands interact on surface lipoprotein particles. The mechanism of such complexes formation can be related to typical ligand-receptor interaction.

Литература

1. Поляков, Л.М. Липопротеины плазмы крови: транспортная система для ксенобиотиков и биологически активных веществ / Л.М. Поляков // Бюллетень СО РАМН. — 1998. — Т. 3. — С. 23-29.
2. Поляков, Л.М. Липопротеиновая регуляция биологических процессов / Л.М. Поляков, Л.Е. Панин // Успехи современной биологии. — 2000. — Т. 120. — С. 275-282.
3. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction / A.C. Vreugdenhil, A.M. Snoek, C.E. Van't Veer et al. // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 107. — P. 225-234.
4. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS / M.M. Wurfel, S.T. Kunitake, H. Lichtenstein et al. // J. Exp. Med. — 1994. — Vol. 180. — P. 1025-1035.
5. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact / M.M. Wurfel, B.G. Monks, R.R. Ingalls et al. // J. Exp. Med. — 1997. — Vol. 186. — P. 2051-2056.
6. Desanctis, J.B. Effects of different lipoproteins on the proliferative response of interleukin-2-activated T lymphocytes and large granular lymphocytes / J.B. Desanctis, I. Blanca, N.E. Bianco // Clin. Sci. — 1995. — Vol. 89. — P. 511-519.
7. Desanctis, J.B. Secretion of cytokines by natural killer cells primed with interleukin-2 and stimulated with different lipoproteins. Immunology / J.B. Desanctis, I. Blanca, N.E. Bianco // Immunology. — 1997. — Vol. 90. — P. 526-533.
8. Schumann, R.R. A novel acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP) / R.R. Schumann and J. Zweigner // Clin. Chem. Lab. Med. — 1999. — Vol. 37. — P. 271-274.
9. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids* / N.W. Schroder, B. Opitz, N. Lamping et al. // J. Immunol. — 2000. — Vol. 165. — P. 2683-2693.
10. Schroder, N.W. Non-LPS targets and actions of LPS binding protein (LBP) / N.W. Schroder, R.R. Schumann // J. Endotoxin Res. — 2005. — Vol. 11 (4). — P. 237-242.
11. Hatch, F.T. Practical method for plasma lipoprotein analysis / F.T. Hatch, R.S. Less // Adv. Lipid Res. — 1968. — Vol. 6. — P. 2-68.
12. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680-685.
13. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман. — М., 1981. — 288 с.
14. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. — М., 1986. — 496 с.