

УДК 541.144.8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЖУЩЕЙСЯ КОНСТАНТЫ АССОЦИИИ АНТИБИОТИКА ТЕТРАЦИКЛИНА С БЕЛКОМ-РЕПРЕССОРОМ ТРАНСКРИПЦИИ TETR(D) МЕТОДОМ СОРБЦИИ НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАНАХ

И.С. Алпеева, М.М. Анохина, И.Г. Смирнова, А.М. Копылов

(кафедра химии природных соединений, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского; e-mail: ais@genebee.msu.su)

В работе получены изотермы связывания радиоактивного 7-[³H]-тетрациклина с белком-репрессором транскрипции TetR(D) и рассчитаны кажущиеся константы ассоциации (K_a) как из общего уравнения бимолекулярного взаимодействия, так и линеаризацией по Скэтчарду. Их значения составили $K_a = (0,10 \pm 0,04) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ и $(0,13 \pm 0,05) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Из сравнения с результатами, полученными ранее методом флуоресцентной спектроскопии, сделан вывод о необходимости разработки метода определения доли белка, активного для связывания тетрациклина.

Введение

В настоящее время антибиотики – одно из основных средств борьбы с бактериальными инфекциями человека и животных. Тетрациклин (Тс)* является традиционным популярным антибиотиком широкого спектра действия, который используют в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности (рис. 1) [1, 2].

Тс проникает в бактериальную клетку через мембрану [3]. Существуют два вида бактериальной устойчивости к Тс, несопровождающиеся разрушением антибиотика. Один из них – вывод Тс из клетки с помощью молекулярного «насоса» – белка TetA, синтез которого находится под контролем белка-репрессора транскрипции TetR(D) [4].

Белок TetR(D) представляет собой типичный прокариотический транскрипционный репрессор, использующий в качестве ДНК-узнающего домена мотив «спираль-поворот-спираль» [5]. Наиболее изученным с функциональной точки зрения является репрессор, ген которого находится на транспозоне Tn10 [6, 7]. В отсутствие антибиотика белок-репрессор в виде димера связывается с операторными зонами, которые находятся перед структурной частью гена, кодирующей белок TetA. При попадании в клетку Тс происходит его взаимодействие с белком-репрессором и комплекс диссоциирует от ДНК. Промоторно-операторная зона гена становится доступной для РНК-полимеразы, и начинается синтез белка TetA, который транспортирует Тс из клетки. Таким образом, бактериальная клетка становится устойчивой к действию антибиотика.

В настоящее время в литературе подробно описаны данные рентгеноструктурного анализа о наиболее значимых с функциональной точки зрения структурах белка TetR(D): структура самого TetR(D) (PDB 1A6I) [8], структура TetR(D) в комплексе с Тс (PDB 2TRT) [9], в комплексе с 7ClТс (PDB 2TCT) [5], (PDB 1BJO, 1BJZ, 1BJY) [10], в комплексе с 9glyТс (PDB 1ORK) [11], в комплексе с 4-epiТс (PDB 1DU7) и структура TetR(D) в комплексе с участком операторной зоны tetO (PDB 1QPI) [12].

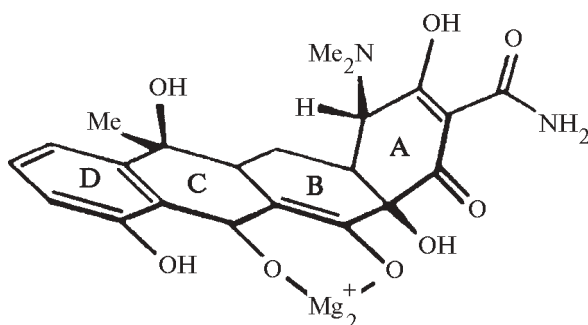


Рис. 1. Структурная формула Тс в комплексе с ионом Mg^{2+}

*Тс – тетрациклин, 7ClТс – 7-хлортетрациклин, 9glyТс – 9-(N,N-диметилглициламида)-6-деметил-6-дезокситетрациклин, 4-epiТс – 4-эпи-7-хлортетрациклин.

В работе [10] представлены структуры комплексов TetR(D) с 7CITc и с 7CITc, хелатированного ионом Mg^{2+} (7CITc- Mg^{2+}). Сравнение структур TetR(D), комплекса TetR(D) с 7CITc, комплекса TetR(D) с 7CITc- Mg^{2+} и TetR(D), один сайт связывания которого занят 7CITc, а другой – 7CITc- Mg^{2+} , показало, что только в комплексе с Mg^{2+} молекула Tc при связывании с репрессором вызывает конформационные изменения в структуре белка, необходимые для его активации. Специфическая роль ионов Mg^{2+} заключается в формировании гидрофильной части Tc-связывающего центра TetR(D) путем вовлечения His100 в первую октаэдрическую координационную сферу Mg^{2+} и взаимодействия с другими аминокислотными остатками (Thr103 и Gly147', штрихом отмечены аминокислоты из второй молекулы димера), опосредованное молекулами H_2O , также находящимися в координационной сфере Mg^{2+} . Эти конформационные изменения в положении аминокислотных остатков спирали $\alpha 6$ инициируют движение C-концевого участка спирали $\alpha 4$, что, в свою очередь, приводит к уменьшению сродства узнающих спиралей $\alpha 3$ и $\alpha 3'$, к большой бороздке ДНК и диссоциации белка-репрессора от операторной зоны ДНК [5, 10]. Таким образом, изменения в активном центре репрессора TetR(D) при связывании с комплексом $[Mg-Tc]^{2+}$ приводят к увеличению расстояния между мотивами димера «спираль-поворот-спираль» и к диссоциации белка от ДНК [12].

Несмотря на большое количество структур, полученных методом РСА для белка-репрессора TetR(D), его комплекса с Tc, а также с аналогами Tc, для создания новых антибиотиков тетрациклинового ряда недостаточно только структурных данных. Аффинность и специфичность взаимодействия Tc с мишенями во многом определяется термодинамикой. На сегодняшний день одним из самых распространенных методов, позволяющим определить параметры взаимодействия Tc с белком-репрессором, является флуоресцентная спектроскопия [13–15].

Спектр флуоресценции самого белка TetR(D) при длине волны возбуждающего света 280 нм имеет максимум испускания при 330 нм, характерный для Trp. При связывании белка с Tc появляется новый максимум при 510 нм, совпадающий по форме с флуоресценцией свободного Tc при облучении его светом длиной волны 370 нм. Это отражает процесс переноса энергии с остатка Trp белка на молекулу Tc.

Метод флуоресцентной спектроскопии не является универсальным. Его нельзя применять для аналогов Tc, не обладающих флуоресцентными свойствами. Спектры флуоресценции некоторых производных Tc перекрываются, что существенно ограничивает этот метод для применения прямого конкурентного анализа многочисленных производных Tc. Кроме того, метод сложно применять для мишеней с очень большой молекулярной массой, например, рибосом. Все это диктует необходимость разработки альтернативных методов измерения аффинности Tc к его мишеням.

В настоящей работе был разработан метод, лишенный перечисленных недостатков. Проведено комплексообразование 7- $[^3H]$ -Tc с белком-репрессором TetR(D) и определены параметры связывания.

Материалы и методы

Использованы следующие препараты: гидрохлорид тетрациклина (*Serva*, Германия), 7- $[^3H]$ -Tc (*New England Nuclear*, США), бычий сывороточный альбумин, БСА (*Sigma*, США), нитроцеллюлозные мембраны с размером пор 0,45 мкм (*Sartorius AG*37070*, Германия). Препарат белка TetR(D) любезно предоставлен проф. В. Сэнгером (*Институт кристаллографии Свободного университета Берлина*, Германия).

Комплексообразование 7- $[^3H]$ -Tc с белком TetR(D)

Комплексообразование проводили в объеме 100 мкл в буфере А (10 мМ трис-НСl (рН 7,8); 20 мМ $MgCl_2$; 200 мМ NaCl; 0,1 мМ ЭДТА, 6 мМ меркаптоэтанол; 0,5 мкг/мл БСА).

При «прямом» титровании к 0,6 мкМ белка TetR(D) в буфере А добавляли разное количество 7- $[^3H]$ -Tc с удельной активностью 18 ГБк/ммоль в диапазоне концентраций от 0 до 3 мкМ.

При «обратном» титровании к 0,1 мкМ 7- $[^3H]$ -Tc в буфере А добавляли различное количество репрессора TetR(D) в диапазоне концентраций от 0 до 2 мкМ.

Образцы перемешивали, инкубировали (37°C, 15 мин) и помещали в лед.

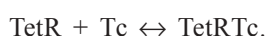
Количество образовавшегося комплекса определяли методом сорбции на нитроцеллюлозных мембранах с размером пор 0,45 мкм.

Предварительно дегазированные в деионизованной воде мембраны промывали 1 мл раствора 0,25 М ЭДТА (рН 8,0), затем деионизованной водой, а затем трижды (по 0,5 мл) буфером В (10 мМ трис-НСl (рН 7,8); 20 мМ $MgCl_2$; 200 мМ NaCl; 0,1 мМ ЭДТА; 6 мМ меркаптоэтанол).

После этого на поверхность мембранного фильтра наносили образец и промывали дважды (по 0,5 мл буфера В). Скорость фильтрации составляла 1 мл/мин. Фильтры высушивали на воздухе, количество связавшегося 7-³H]-Tc определяли гетерогенным сцинтилляционным счетом на счетчике «Tracor Analytic Delta 300» (Франция) в толуольном сцинтилляторе ЖС-106 (НПО «Монокристаллреактив», Россия). По данным связывания строили изотерму адсорбции.

Расчет изотерм связывания

Равновесие в системе, содержащей белок-репрессор TetR и Tc, можно описать следующей схемой:



Этой схеме соответствует следующее уравнение для кажущейся константы ассоциации:

$$K_a' = [\text{TetRTc}]/[\text{Tc}] \times [\text{TetR}].$$

Из уравнений материального баланса следует:

$$[\text{TetR}]_0 = [\text{TetR}] + [\text{TetRTc}],$$

$$[\text{Tc}]_0 = [\text{Tc}] + [\text{Tc}]_b,$$

$$[\text{TetRTc}] = [\text{Tc}]_b,$$

$$[\text{Tc}]_b = \alpha \times [\text{Tc}]_0,$$

где α – степень связывания Tc с репрессором; $[\text{Tc}]_0$, $[\text{Tc}]$ и $[\text{Tc}]_b$ – начальная концентрация Tc, концентрации несвязанного и связанного с белком Tc соответственно; $[\text{TetR}]_0$, $[\text{TetR}]$ и $[\text{TetRTc}]$ – начальная концентрация TetR, концентрации несвязанного и связанного в комплекс с Tc TetR соответственно.

Из выражения для K_a' получаем следующее уравнение:

$$[\text{Tc}]_b = ([\text{TetR}]_0 + [\text{Tc}]_0 + 1/K_a' - (([\text{TetR}]_0 + [\text{Tc}]_0 + 1/K_a')^2 - 4 \times [\text{TetR}]_0 \times [\text{Tc}]_0)^{1/2})/2.$$

Расчеты проводили с помощью компьютерной программы Origin 7.0 (фирма «OriginLab Corporation», www.originlab.com).

Линеаризация изотерм связывания по Скэтчарду

Если ввести понятие полной концентрации белка-репрессора в данный момент – $[\text{TetR}]_p$, то выражение для кажущейся константы ассоциации

$$K_a' = [\text{TetRTc}]/[\text{Tc}] \times [\text{TetR}]$$

можно преобразовать к следующему виду:

$$K_a' = [\text{Tc}]_b/([\text{Tc}]_f \times ([\text{TetR}]_p - [\text{Tc}]_b)),$$

где $[\text{Tc}]_f$ – концентрация несвязанного в комплекс с белком Tc и соответственно:

$$[\text{Tc}]_b/[\text{Tc}]_f = K_a' \times [\text{TetR}]_p - K_a' \times [\text{Tc}]_b.$$

Таким образом, получаем уравнение, известное как уравнение Скэтчарда [16].

Если экспериментально найденные значения $[\text{Tc}]_b$ и $[\text{Tc}]_f$, полученные в нескольких экспериментах, различающихся использованными концентрациями белка-репрессора TetR, отложить в координатах $[\text{Tc}]_b/[\text{Tc}]_f$ против $[\text{Tc}]_b$ (координаты Скэтчарда), то тангенс угла наклона полученной прямой будет численно соответствовать значению K_a' .

Если предположить, что белок-репрессор содержит несколько функционально независимых друг от друга центров связывания Tc, то величинам $[\text{TetR}]$ и $[\text{TetRTc}]$ следует придавать смысл концентраций свободных и занятых центров связывания Tc, а вместо величины $[\text{TetR}]_p$ следует использовать произведение $n \times [\text{TetR}]_p$, где n – число центров связывания Tc, приходящееся на одну молекулу белка-репрессора. Тогда уравнение Скэтчарда можно записать в следующем виде:

$$[\text{Tc}]_b/[\text{TetR}]_p/[\text{Tc}]_f = K_a' \times n - K_a' \times [\text{Tc}]_b/[\text{TetR}]_p.$$

В координатах $([\text{Tc}]_b/[\text{TetR}]_p)/[\text{Tc}]_f - [\text{Tc}]_b/[\text{TetR}]_p$ прямая линия отсекает на оси абсцисс отрезок, равный n .

Результаты и обсуждение

Чтобы охарактеризовать параметры связывания Tc с белком-репрессором TetR(D) первоначально был использован традиционный подход: титрование фиксированного количества белка-репрессора возрастающими количествами лиганда – 7-³H]-Tc, условно названное нами «прямым» титрованием (рис. 2, а) [17, 18]. Для определения количества образовавшегося комплекса 7-³H]-Tc с белком использовали метод сорбции на нитроцеллюлозных мембранах. Полученная изотерма связывания была линеаризована в координатах Скэтчарда (рис. 3, а). Кажущаяся константа ассоциации (K_a'), рассчитанная по тангенсу угла наклона прямой в координатах Скэтчарда, составила $(0,7 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. В координатах Скэтчарда по пересечению прямой с осью абсцисс было определено

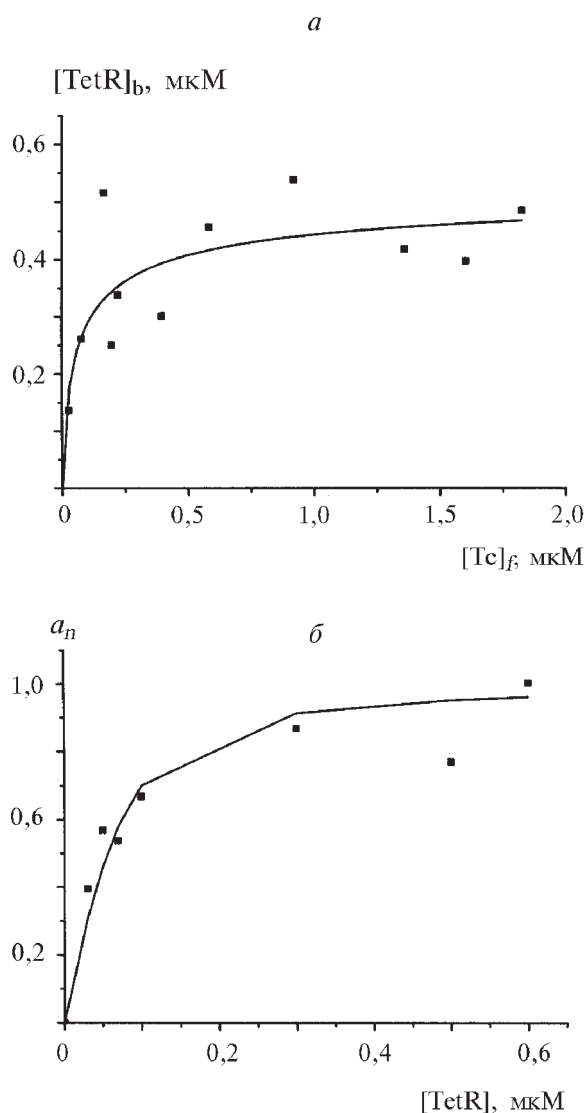


Рис. 2. Изотермы связывания по данным: *a* – прямого титрования белка TetR(D) радиоактивным 7- ^{3}H]-Tc ($[\text{TetR(D)}]$ – концентрация белка-репрессора, несвязанного в комплекс с Tc); *б* – обратного титрования 7- ^{3}H]-Tc белком TetR(D) ($[\text{7-}^{3}\text{H}\text{-Tc}]$ – концентрация 7- ^{3}H]-Tc, несвязанного в комплекс с TetR(D), $\alpha_n = \alpha/\alpha_{\text{max}}$, α – степень связывания Tc в комплекс с TetR(D), α_{max} – максимальное значение α для данного эксперимента)

число мест связывания Tc на TetR(D). В условиях избытка Tc на одну молекулу белка приходится 4 ± 3 молекулы Tc. Как было отмечено ранее [17, 18], Tc способен к сильной неспецифической сорбции на белках, видимо, в силу своей гидрофобной природы. Именно поэтому получаются завышенные значения числа мест связывания.

Для того чтобы свести вклад неспецифического связывания Tc с белком к минимуму, было проведено

титрование 7- ^{3}H]-Tc увеличивающимся количеством репрессора, т.е. при недостатке Tc, условно названное нами как «обратное» титрование (рис. 2, *б*) [18]. Изотерма «обратного» титрования также была линеаризована в координатах Скэтчарда (рис. 3); значение κK_a , рассчитанное по тангенсу угла наклона прямой в координатах Скэтчарда, составило $(1,3 \pm 0,5) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. В координатах Скэтчарда по пересечению прямых с осью абсцисс было определено число мест связывания Tc на молекуле TetR(D). В условиях избытка белка-репрессора оно составляет $1,2 \pm 0,9$ молекул антибиотика на молекулу TetR(D). Так как значение κK_a для обратного титрования практически в 20 раз

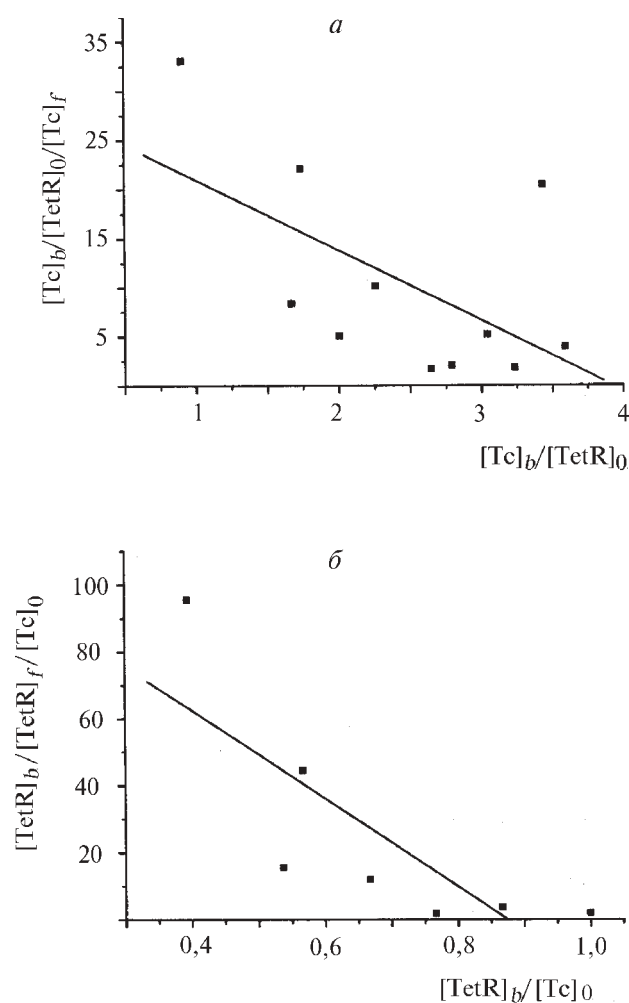


Рис. 3. Изотермы связывания, линеаризованные в координатах Скэтчарда для: *a* – прямого титрования по формуле: $[\text{Tc}]_b/[\text{TetR}]_0/[\text{Tc}]_f = \kappa K_a \times n - K_a \times [\text{Tc}]_b/[\text{TetR}]_0 \kappa K_a \times n = (28,2 \pm 8,6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $\kappa K_a = (7,1 \pm 3,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n = 4 \pm 3$; *б* – обратного титрования по формуле: $[\text{TetR}]_b/[\text{TetR}]_f/[\text{Tc}]_0 = \kappa K_a \times n - \kappa K_a \times [\text{TetR}]_b/[\text{Tc}]_0$; $\kappa K_a \times n = (1,15 \pm 0,32) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$; $\kappa K_a = (1,32 \pm 0,45) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, $n' = 0,87 \pm 0,64$, где $n' = 1/n$, число молекул белка, взаимодействующих с одной молекулой Tc

Кажущиеся константы ассоциации (κK_a) комплексов Tc с TetR(D)

Метод определения	$\kappa K_a \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	n	Ссылка
Прямое титрование (Скэтчард)	0,007±0,003	4±3	настоящая работа
Обратное титрование (Скэтчард)	0,13±0,05	1,2±0,9	настоящая работа
Обратное титрование (полное уравнение)	0,10±0,04	1*	настоящая работа
Флуоресцентная спектроскопия	3,3±1,3	1*	[15]

Примечание. Расчет проводили из предположения эквимольной стехиометричности комплекса.

превышает значение κK_a для прямого титрования, можно предположить, что в случае прямого титрования избыток Tc неспецифически связывается с белком-репрессором, что существенно занижает значение κK_a . Для обратного титрования при большом избытке репрессора вклад неспецифического связывания минимален.

Несмотря на то что метод Скэтчарда является наиболее популярным для определения кажущихся констант ассоциации лигандов с разными белками, он имеет ряд существенных ограничений диапазона используемых концентраций. За пределами этого диапазона вид изотермы связывания в координатах Скэтчарда может существенным образом отличаться от линейного, что в свою очередь приведет к искажению значения κK_a . Так как используемые методы не всегда позволяют работать в оптимуме концентраций, необходимом для линеаризации по методу Скэтчарда, мы воспользовались более универсальным методом определения κK_a , существенно увеличивающим диапазон рабочих концентраций. Для этого изотерма связывания была аппроксимирована полной функцией бимолекулярного взаимодействия:

$$[\text{Tc}]_b = 1/2([\text{TetR}]_0 + [\text{Tc}]_0 + 1/\kappa K_a - (([\text{TetR}]_0 + [\text{Tc}]_0 + 1/\kappa K_a)^2 - 4 \times [\text{TetR}]_0 \times [\text{Tc}]_0)^{1/2}).$$

Значение κK_a составило $(1,0 \pm 0,4) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, что хо-

рошо соответствует значению κK_a , рассчитанному методом Скэтчарда.

Данные по определению κK_a сведены в таблицу. Полученные использованным методом значения κK_a примерно на порядок ниже, чем определяемые флуоресцентным методом. Возможно, причина такого расхождения данных в следующем. Метод флуоресцентной спектроскопии регистрирует только связанный Tc. В методе обратного титрования, разработанном в данной работе, значения κK_a выражаются через концентрацию белка, которая определяется по общему количеству белка в единице объема. Тем не менее очевидно, что при выделении белков даже щадящими методами происходит их частичная денатурация и тогда доля активного для связывания лиганда белка может быть довольно низкой. В энзимологии для характеристики активного белка используется понятие удельной активности фермента [16]. Однако для рецепторных белков, основной функцией которых является связывание, а не ферментативная активность, в настоящее время нет методов, позволяющих определять долю активного для связывания белка. В связи с этим разработка таких методов является актуальной задачей.

Авторы выражают искреннюю благодарность А.А. Богданову, П. Орту, В.А. Спиридоновой, В. Сэнгеру, В.Н. Ташлицкому, В. Хиллену, В. Хинришу и членам группы РНП за полезные дискуссии и помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chopra I., Roberts M. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. **65(2)**. P. 232.
2. Roberts M.C. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1996. **19(1)**. P. 1.
3. Sigler A., Schubert P., Hillen W., Niederweis M. // *Eur. J. Biochem.* 2000. **267(2)**. P. 527.
4. Schnappinger D., Hillen W. // *Arch. Microbiol.* 1996. **165(6)**. P. 359.
5. Kisker C., Hinrichs W., Tovar K. et al. // *J. Mol. Biol.* 1995. **247(2)**. P. 260.
6. Saenger W., Orth P., Kisker C. et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2000. **39(12)**. P. 2042.
7. Hillen W., Berens C. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1994. **48**. P. 345.
8. Orth P., Cordes F., Schnappinger D. et al. // *J. Mol. Biol.* 1998. **279(2)**. P. 439.
9. Hinrichs W., Kisker C., Duvel M. et al. // *Science.* 1994. **264(5157)**. P. 418.
10. Orth P., Saenger W., Hinrichs W. // *Biochemistry.* 1999. **38(1)**. P. 191.
11. Orth P., Schnappinger D., Sum P.E. et al. // *J. Mol. Biol.* 1999. **285(2)**. P. 455.
12. Orth P., Schnappinger D., Hillen W. et al. // *Nat. Struct. Biol.* 2000. **7(3)**. P. 215.
13. Takahashi M., Altschmied L., Hillen W. // *J. Mol. Biol.* 1986. **187(3)**. P. 341.
14. Takahashi M., Degenkolb J., Hillen W. // *Anal. Biochem.* 1991. **199(2)**. P. 197.
15. Lederer T., Kintrup M., Takahashi M. et al. // *Biochemistry.* 1996. **35(23)**. P. 7439.
16. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. // *Биокинетика: Практический курс.* М., 1999. С. 352.
17. Hillen W., Klock G., Kaffenberger I. et al. // *J. Biol. Chem.* 1982. **257(11)**. P. 6605.
18. Beliakova M.M., Anokhina M.M., Spiridonova V.A. et al. // *FEBS Lett.* 2000. **477(3)**. P. 263.

Поступила в редакцию 20.09.04

DETERMINATION OF THE APPARENT ASSOCIATION CONSTANT OF ANTIBIOTIC TETRACYCLINE WITH TRANSCRIPTION REPRESSOR PROTEIN TETR(D) BY NITROCELLULOSE-BINDING ASSAY

I.S. Alpeeva, M.M. Anokhina, I.G. Smirnova, A.M. Kopylov

(Division of Chemistry of Natural Compounds)

The binding isotherms of tetracycline with transcription repressor protein TetR(D) were obtained and apparent association constants were determined by using general equation of bimolecular interaction and Scatchard analysis, $aK_a = (0,10 \pm 0,04) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ and $(0,13 \pm 0,05) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ respectively. Comparing of the results with the data of fluorescence spectroscopy measurements has revealed that a quantitative method of determination of active molecules TetR(D) for Tc binding has to be developed.