

УДК 541.144.8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЛИ БЕЛКА-РЕПРЕССОРА ТРАНСКРИПЦИИ TetR(D), АКТИВНОГО ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ ТЕТРАЦИКЛИНА, МЕТОДОМ КОНКУРЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ

И.С. Алпеева, М.М. Анохина, В.Н. Ташлицкий, А.М. Копылов

(кафедра химии природных соединений)

В работе получены изотермы конкурентного связывания тетрациклина и 7- ^{3}H]-тетрациклина с белком-репрессором транскрипции TetR(D). Предложена математическая модель конкурентного связывания, позволяющая рассчитать для данного препарата белка долю TetR(D), активного для связывания с тетрациклином. Введение такой поправки для расчетов кажущейся константы ассоциации позволяет унифицировать данные, полученные для различных препаратов белка. Метод можно использовать для расчетов кажущихся констант ассоциации других белковых супрамолекулярных комплексов.

В настоящее время антибиотики являются одним из основных средств борьбы с бактериальными инфекциями человека и животных. Тетрациклин (Тс) – традиционный популярный антибиотик широкого спектра действия, применяемый в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности [1, 2].

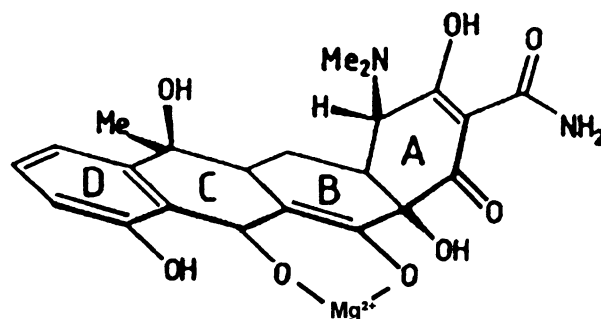
Тс проникает в бактериальную клетку путем транспорта через мембрану [3]. Существуют два вида бактериальной устойчивости к Тс, которые не сопровождаются разрушением антибиотика. Один из них – выведение Тс из клетки с помощью «молекулярного насоса» – белка TetA, синтез которого находится под контролем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

Белок TetR(D) представляет собой типичный прокариотический репрессор транскрипции [5]. В отсутствие антибиотика белок-репрессор в виде димера связывается с операторными зонами ДНК, находящимися перед структурной частью гена, кодирующей белок TetA. При попадании в клетку он взаимодействует с белком, комплекс диссоциирует с ДНК и начинается синтез белка TetA, который транспортирует Тс из клетки.

Методом рентгеноструктурного анализа (РСА) получено большое количество структур: для белка TetR(D), его комплекса с Тс и аналогами [6], а также для комплекса Тс с малой субчастицей бактериальной рибосомы [7–9]. Однако для создания новых антибиотиков тетрациклинового ряда недостаточно только структурных данных. Аффинность и специфичность взаимодействия Тс с его мишенями определяется термодинамикой. Только использование комбинированного структурно-термодинамического под-

хода позволяет объяснить механизм процесса взаимодействия и, следовательно, направленно в него вмешиваться. Именно такой комплексный подход с успехом используется в энзимологии для изучения механизма действия ферментов и создания ингибиторов [10, 11].

Одной из основных характеристик связывания низкомолекулярного лиганда с белком является кажущаяся константа ассоциации (k_{Ka}). Чаще всего этот параметр определяют по изотермам связывания, титруя белок лигандом и измеряя степень комплексообразования при различных соотношениях белок – лиганд [10, 11]. Однако для гидрофобных лигандов (к ним относится Тс) традиционный подход приводит к артефактам из-за проявления неспецифических взаимодействий, которые могут вносить значительный вклад в измеряемую величину связывания и тем самым занижать значения специфической k_{Ka} [6]. Для подобных гидрофобных лигандов было предложено использовать так называемое «обратное титрование»,

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

когда сам лиганд титруется белком, при этом значение K_{Ca} рассчитывается через концентрацию белка [6, 9, 12]. Особенность природных биополимеров состоит в том, что они могут существовать в различных конформациях, в том числе неактивных для связывания лиганда. Даже самые щадящие условия выделения препаратов белка приводят к его частичной инактивации. Таким образом, препараты белков практически всегда конформационно гетерогенны, а измеряемая концентрация белка не отражает содержания активной формы. Для учета подобного явления используют величину удельной активности фермента, выраженную в единицах ферментативной активности на единицу веса препарата (например, ед. акт./мг). В случае связывания лиганда с белком, не обладающим ферментативной активностью, функцией является собственно связывание. Это обстоятельство заставляет разрабатывать новые подходы для определения удельной связывающей активности белков.

Такие параметры необходимы для создания базы при моделировании новых производных лекарств на основе уже известных препаратов, а также для построения моделей так называемой «компьютерной клетки» (*E-cell*), описывающей *in silico*, например поведение лекарства внутри клетки.

Ранее было исследовано комплексообразование $7\text{-}[^3\text{H}]\text{-Tc}$ с белком-репрессором транскрипции TetR(D) и определены параметры его связывания с белком. Для оценки доли активного для связывания Tc белка впервые разработан метод конкурентного вытеснения «холодным» Tc из смеси $7\text{-}[^3\text{H}]\text{-Tc}$ с белком TetR(D). Метод можно использовать для расчетов кажущихся констант ассоциации для других белковых супрамолекулярных комплексов.

Материалы и методы

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

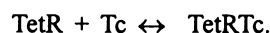
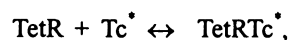
Конкурентное связывание Tc из смеси $[^3\text{H}]\text{-Tc}$ с белком TetR(D)

Конкурентное связывание «холодного» Tc и $7\text{-}[^3\text{H}]\text{-Tc}$ с белком-репрессором TetR(D) проводили в объеме 100 мкл в буфере А (10 мМ трис-НCl pH 7,8, 20 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,5 мкг/мл BSA, 6 мМ β-меркаптоэтанол).

К смеси 0,1 мкМ $7\text{-}[^3\text{H}]\text{-Tc}$ и 0,2 мкМ TetR(D) в буфере А добавляли Tc в диапазоне конечных концентраций 0–2 мкМ. Образцы перемешивали, выдерживали при 37°C в течение 15 мин и помещали в лед. Количество образовавшегося комплекса $7\text{-}[^3\text{H}]\text{-Tc}$ с белком TetR(D) определяли методом сорбции на нитроцеллюлозных мембранах, как описано ранее [6, 12].

Расчет изотерм конкуренции [13]

Равновесие в системе, содержащей белок-репрессор (TetR), а также два одинаковых по химической природе лиганда, один из которых содержит радиоактивную метку (Tc^*), а другой ее не содержит и является «холодным» (Tc), описывается следующей схемой:



Этой схеме соответствует следующая система уравнений для кажущейся константы диссоциации:

$$K_{Кд} = [\text{TetR}] \times [Tc^*] / [\text{TetRTc}^*],$$

$$K_{Кд} = [\text{TetR}] \times [Tc] / [\text{TetRTc}],$$

$$g = [\text{TetRTc}^*] / [Tc^*]_0, \quad (1)$$

где $[Tc^*]$ и $[Tc]$ – равновесные концентрации меченого и «холодного» Tc соответственно; $[\text{TetR}]$, $[\text{TetRTc}^*]$, $[\text{TetRTc}]$ – равновесные концентрации свободного репрессора и комплексов репрессора с Tc^* и Tc соответственно; $K_{Кд}$ – кажущаяся константа диссоциации комплекса; g – степень связывания меченого Tc с репрессором, определяемая экспериментально по сорбции комплекса на нитроцеллюлозных мембранах.

Из совместного решения уравнений материального баланса

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

$$Tc^*_0 = [Tc^*] + [\text{TetRTc}^*],$$

$$Tc_0 = [Tc] + [\text{TetRTc}]$$

и системы уравнений для $K_{Кд}$ (1) получаем следующее уравнение:

$$(1-g) \times ([Tc] + [Tc^*]) = \text{TetR}_0 \times (1-g) / g - K_{Кд}.$$

По тангенсу угла наклона зависимости $(1-g) \times ([Tc] + [Tc^*])$ от $(1-g) / g$ (рис. 2) может быть определена доля белка, активного для связывания лиганда. Расчеты проводили с помощью компьютерной программы Origin 7.0 (фирма OriginLab Corporation, www.originlab.com).

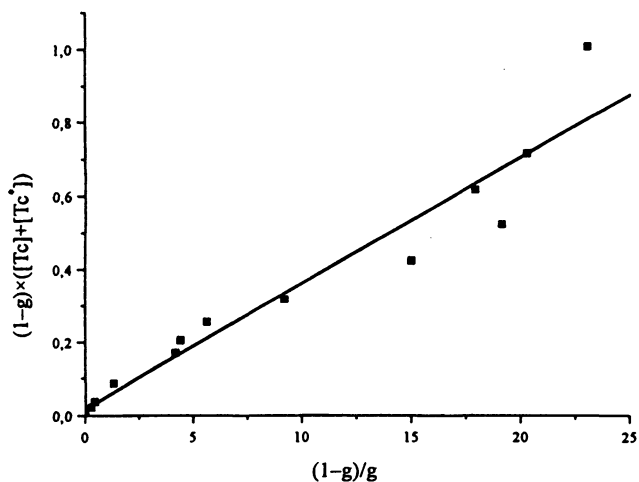


Рис. 2. Изотерма конкурентного связывания 7-[³H]-Тс и Тс с TetR(D), линейризованная в координатах ((1-g)×([Тс] + [7-³H]-Тс)), (1-g)/g

Результаты и обсуждение

Как это уже отмечалось во введении, выделение препаратов биологических макромолекул из клетки приводит к тому, что часть препарата неизбежно переходит в неактивную конформацию. Таким образом, измеряемая концентрация, например белка, не отражает концентрацию активной формы и, следовательно, не может быть прямо использована для расчетов термодинамических параметров связывания.

Так, например, из полученных нами ранее данных по связыванию 7-[³H]-Тс с белком-репрессором транскрипции TetR(D) [6], было рассчитано, что кКа для “обратного” титрования практически в 20 раз превышает значение кажущейся константы для “прямого” титрования (таблица). Так как Тс способен к сильной неспецифической сорбции на белках, види-

мо, в силу своей гидрофобной природы, можно предположить, что в случае “прямого” титрования, когда белок титруется Тс, избыток Тс неспецифически связывается с белком, что существенно снижает значение кКа. Чтобы этого избежать, нами был разработан прием, названный “обратным” титрованием (в этом случае Тс титруется белком). Предполагается, что при большом избытке белка вклад неспецифического связывания Тс должен быть минимальным. Однако метод “обратного” титрования имеет существенный недостаток: при расчетах кКа ее численное значение определяется по концентрации титрующего белка, которая может многократно отличаться от истинной концентрации активных белковых молекул, так как выделение репрессора приводит к его частичной инактивации. В связи с этим необходимо использование метода, позволяющего определять концентрацию белка, активного для связывания Тс, что в свою очередь позволит скорректировать значение кКа и даст возможность сравнивать его со значениями кКа, полученными на различных препаратах белка.

Для определения доли активных молекул белка был использован метод конкурентного связывания 7-[³H]-Тс и “холодного” Тс с TetR(D) [13]. На рис. 3 представлена изотерма связывания, полученная титрованием постоянного количества смеси 7-[³H]-Тс и TetR(D) увеличивающимися количествами “холодного” Тс. Линейризация изотермы в координатах: (1-g)×([Тс] + [Тс*]) от (1-g)/g (см. рис. 2) позволяет по тангенсу угла наклона определить долю активного для связывания лиганда белка. Для использованного препарата она составила (17,0±1,5)% от экспериментально определяемой концентрации репрессора.

Значения кКа, рассчитанные нами ранее с применением различных методов расчета эксперименталь-

Значения кажущейся константы ассоциации (кКа) комплексов Тс с TetR(D)

Метод определения	кКа×10 ⁹ М ⁻¹	кКа×10 ⁹ М ⁻¹ (с учетом активной концентрации белка)	Ссылка
Прямое титрование (Скэтчард)	0,007±0,003	–	настоящая работа
Обратное титрование (Скэтчард)	0,13±0,05	0,8±0,3	настоящая работа
Обратное титрование (полное уравнение)	0,10±0,04	0,7±0,2	настоящая работа
Флуоресцентная спектроскопия	3,3±1,3	–	[14]

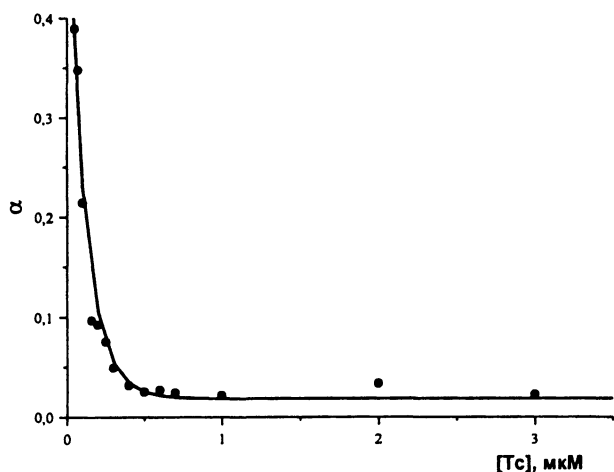


Рис. 3. Изотерма конкурентного связывания 7-[³H]-Тс и Тс с TetR(D), где α – доля 7-[³H]-Тс, связанного в комплекс с белком-репрессором

ных данных, были скорректированы с учетом активной для связывания Тс концентрации белка-репрессора

ра транскрипции TetR(D) (таблица). Полученные таким образом значения кажущейся константы оказались близки к значениям, полученным методом флуоресцентной спектроскопии. Следует отметить, что спектральный метод регистрирует только связанный с белком Тс, а при расчетах k_{Ca} используются значения концентрации Тс, а не белка. Сходство k_{Ca} , определенных различными методами, открывает широкие возможности применения разработанного нами метода с использованием радиоактивного Тс, например, при проведении конкурентного анализа различных производных Тс, что позволяет описывать их свойства при создании новых производных этого антибиотика.

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

Работа выполнена при поддержке грантов Университеты России УР-05.02.041, РФФИ 04-04-48942.

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. Hillen W., Berens C. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1994. **48**. P. 345.
6. Алпеева И.С., Анохина М.М., Смирнова И.Г., Копылов А.М. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2004. **45**(6). С. 417.
7. Pioletti M., Schlunzen F., Harms J., Zarivach R et al. // *EMBO J.* 2001. **20**(8). P. 1829.
8. Brodersen D.E., Clemons W.M. Jr., Carter A.P. et al. // *Cell.* 2000. **103**(7). P. 1143.
9. Anokhina M.M., Barta A., Nierhaus K.H. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2004. **32**(8). P. 2594.
10. Fersht A. // *Structure and Mechanism in Protein Science: a Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* W.H. Freeman and Company. USA. 1999.
11. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. // *Биокинетика: Практический курс.* М., 1999.
12. Beliakova M.M., Anokhina M.M., Spiridonova V.A. et al. // *FEBS Lett.* 2000. **477**(3).P.263.
13. Shilov I., Tashlitsky V., Khodoun M. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1998. **26**(11). P. 2659.
14. Lederer T., Kintrup M., Takahashi M. et al. // *Biochemistry.* 1996. **35**(23). P. 7439.

Поступила в редакцию 18.04.05

DETERMINATION OF THE PART OF TRANSCRIPTION REPRESSOR PROTEIN TETR(D) ACTIVE TO TETRACYCLINE-BINDING BY COMPETITIVE BINDING METHOD

I.S. Alpeeva, M.M. Anokhina, V.N. Tashlitsky, A.M. Kopylov

(Division of Chemistry of Natural Compounds)

The competitive binding isotherms of tetracycline and radioactive 7-[³H]-tetracycline with transcription repressor protein TetR(D) were obtained. Mathematical model of the competitive binding which enables to calculate the part of TetR(D) active to tetracycline-binding were proposed. The application of this correction for calculation of apparent association constants allows the data obtained for different protein preparation to be unified. This method can be applied for calculation of apparent association constants for various protein complexes.