

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

Набережных Г.А., Давыдова В.Н., Соловьева Т.Ф.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН  
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: naber1953@mail.ru  
Поступила в редакцию 14.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0606

**Аннотация.** Выделены и очищены липополисахарид-связывающие белки из двух массовых видов медуз *Aurellia aurita* и *Ropelema asamushi* и изучено взаимодействие липополисахаридов (ЛПС) разных структурных типов с ЛСБ. Ингибированием взаимодействия установлено, что оба белка специфически связываются с липидным и коровым фрагментами молекулы ЛПС. В ЛСБ присутствует два типа сайтов связывания с  $K_d = 3,28 \times 10^{-6}$  М и  $K_d = 0,13 \times 10^{-6}$  М (для белка из *A. aurita*) и  $K_d = 3,66 \times 10^{-6}$  М и  $K_d = 0,27 \times 10^{-6}$  М (для белка из *R. asamushi*). Методом динамического рассеяния света показано, что связывание ЛСБ с R-ЛПС приводит к диссоциации мицелл ЛПС. Размеры агрегатов ЛПС уменьшаются с 200 нм до 25-30 нм в составе комплексов ЛПС-ЛСБ. Данные электрокинетических измерений указывают на нейтрализацию отрицательного заряда R-ЛПС (-42,2 мВ) в комплексе ЛПС-ЛСБ- *R. asamushi* до -4,4 мВ. Мицеллы S-ЛПС из *E. coli* не дезагрегируют при связывании с ЛСБ, что, по-видимому, связано с экранированием липида А О-специфическими цепями в молекуле S-ЛПС. Связывание ЛПС с ЛСБ может оказывать влияние на их эндотоксические свойства.

**Ключевые слова:** липополисахарид, липополисахарид связывающие белки, параметры связывания, дезагрегация.

### ВВЕДЕНИЕ

Система врожденного иммунитета беспозвоночных включает огромную популяцию антимикробных пептидов и белков, распознающих и связывающих липополисахариды (ЛПС) (эндотоксины) грамотрицательных бактерий [1]. Липополисахарид-связывающие белки (ЛСБ) могут взаимодействовать с разными участками молекулы ЛПС: О-специфическим полисахаридом, олигосахаридом кора, содержащем остатки 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО), и липидом А, который представляет собой фосфорилированный и ацилированный дисахарид D-глюкозамина и является токсическим центром молекулы. Установлено, что ЛСБ синтезируются в различных тканях беспозвоночных, но максимальный уровень их обнаруживается в клетках крови. Эти белки являются индуцибельными. Экспрессия их значительно возрастает уже через несколько часов после инфицирования животных грамотрицательными бактериями или введения ЛПС. Хотя ЛСБ широко представлены в разных видах морских беспозвоночных, в настоящее время они выделены лишь из сравнительно небольшого числа видов, в основном из ракообразных и моллюсков тропических морей.

ЛСБ беспозвоночных могут быть разделены на 4 группы в соответствии с их структурными особенностями: анти-ЛПС факторы (ALF) [2], большие дифенсины (Big-Def) [3], бактерицидные/увеличивающие проницаемость белки (ВР1) [4] и ЛПС- и  $\beta$ -1,3-глюкан-связывающие белки (LGBP) [5]. Большинство изученных ЛСБ беспозвоночных – положительно заряженные амфифильные мономерные белки с молекулярной массой от 10 до 50 кДа, обнаружены также высокомолекулярные ЛСБ (до 170 кДа).

Природные ЛСБ могут стать прототипами лекарственных препаратов для терапии сепсиса, а также новых антибиотиков широкого спектра действия, способных решить проблему резистентности к существующим антимикробным средствам. Как правило, ЛСБ проявляют значительную антимикробную и мембранотропную активности. ЛСБ, способные нейтрализовать токсические свойства эндотоксинов, представляют большой интерес как потенциальные препараты для борьбы с эндотоксемией и сепсисом. Как правило, ЛСБ проявляют значительную антимикробную и мембранотропную активности. Природные ЛСБ могут стать прототипами лекарственных препаратов для терапии сепсиса, а также новых антибиотиков широкого спектра действия, способных внести вклад в решение проблемы резистентности бактерий к антимикробным средствам.

Ранее нами был выявлен целый ряд морских беспозвоночных северных морей, принадлежащих к разным систематическим группам, которые могут быть перспективными источниками для выделения ЛПС-связывающих белков [6]. Из медузы *Aurelia aurita* выделен катионный пептид, обладающий антимикробными и мембраносвязывающими свойствами антибактериальными свойствами, который потенциально может взаимодействовать с ЛПС [7]. Нами были исследованы массовые виды медуз Японского моря *A. aurita* и *Rhopilema asamushi* на присутствие в них ЛСБ и разработан метод выделения этих белков. С помощью катионообменной хроматографии были выделены и очищены несколько белков, обладающих ЛПС-связывающей активностью [8]. ЛПС связывающая активность была обнаружена во фракциях, элюированных в области градиента с 1М NaCl, что свидетельствует о высоком положительном заряде белков этой фракции. В активной фракции из обеих медуз обнаруживаются, в основном, белки с кажущейся молекулярной массой 110 кДа.

По литературным данным при взаимодействии ЛСБ с ЛПС происходят структурные изменения высокомолекулярных агрегатов ЛПС. Встраивание ЛСБ в агрегаты ЛПС приводит к изменению надмолекулярной структуры эндотоксина. Индуцированная белком конверсия мономеллярной, кубической

или смешанной мономеллярной/кубической структуры ЛПС и липида А в мультиламеллярную рассматривается как необходимое условие инактивации ЛПС [9]. В настоящей работе проведено исследование взаимодействия ЛПС различных типов (S; S, R; R) с ЛСБ из двух видов медуз, установлено влияние ЛСБ на размер агрегатов ЛПС и определены параметры связывания с ЛСБ. Сайты связывания на молекулах ЛСБ специфичны к отрицательно заряженным участкам молекулы ЛПС: липиду А и олигосахариду кора.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение ЛСБ.** Медуз собирали в Уссурийском заливе Японского моря в летний сезон и хранили при  $-18^{\circ}\text{C}$ . Лизаты мезоглеи *R. asamushi* и *A. aurita* получали в результате трех циклов замораживания-оттаивания. Нерастворимую фракцию удаляли центрифугированием, надосадочную жидкость концентрировали на мембране ультрафильтрацией с пределом исключения 3 кДа (Millipore, США) и диализовали против ФСБ (0,01 М фосфат, 0,15 М NaCl, pH 7,5). Изолированный ЛСБ получали катионообменной хроматографией на колонке Source 15S с помощью хроматографической системы FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) и элюцией 1М NaCl согласно процедурам, описанным в работе [8]. Концентрацию общего белка определяли по методу Брэдфорд [10] с использованием кристаллического бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

**Выделение различных форм липополисахаридов.** R,S-ЛПС из *Yersinia pseudotuberculosis* выделяли по методике [11]. Образцы S-ЛПС *Escherichia coli* 055 B5 и R-ЛПС *E. coli* K-12 были приобретены Флюка (Германия).

**Получение меченых флуоресцеином и биотином ЛПС. Получение ЛПС, меченых флуоресцеином и биотином.** Образцы 30 мг ЛПС *E. coli* 055 B5 растворяли в 1 мл воды. Для введения аминогрупп в полисахаридную часть ЛПС добавляли 20 мг бромистого циана в 50 мкл ацетонитрила. Смесь инкубировали 10 мин и добавляли этилендиамин (30 мг на 1 мл 0,02 М NaHCO<sub>3</sub>). После 60-минутной инкубации смеси раствор диализовали в течение 48 ч против воды и лиофилизировали. В результате было получено 25 мг амино-ЛПС.

Для введения аминогрупп в молекулу 30 мг ЛПС *E. coli* 055 B5 растворяли в 1 мл воды, добавляли 20 мг бромистого циана в 50 мкл ацетонитрила. Смесь инкубировали 10 мин и добавляли этилендиамин (30 мг на 1 мл 0,02 М NaHCO<sub>3</sub>). После 60-минутной инкубации смеси раствор диализовали в течение 48 ч против воды и лиофилизировали. В результате было получено 25 мг амино-ЛПС.

Для синтеза меченого флуоресцеином липополисахарида (Ф-ЛПС) 20 мг амино-ЛПС растворяли в 3 мл 0,02 М NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,5), добавляли раствор 4 мг флуоресцеинизотиоцианата (Sigma, США) в 0,25 мл диметилсульфоксида. и смесь инкубировали в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$ . Реакционную смесь подвергали диализу в течение 48 ч против воды и затем лиофилизировали. Для синтеза меченого флуоресцеином липополисахарида (Ф-ЛПС) 20 мг амино-ЛПС растворяли в 3 мл 0,02 М NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,5) и добавляли 4 мг флуоресцеинизотиоцианата (Sigma, США) в 0,25 мл диметилсульфоксида. Смесь инкубировали в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$ , диализовали в течение 48 ч против воды и затем лиофилизировали.

Для введения биотина к 6 мг амино-ЛПС в 1 мл 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,3) добавляли 1 мг N-гидроксисукцинимидного эфира биотин амидогексановой кислоты (Sigma, США), растворенного в 0,1 мл диметилсульфоксида. Смесь инкубировали в течение 16 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Полученный меченный биотином ЛПС (Б-ЛПС) диализовали в течение 48 ч против воды и лиофилизировали.

**Лиганд-ферментный твердофазный анализ (ЛФТА).** В лунки микропланшета PolySorp (Nunc, США) добавляли 200 мкл (20 мкг/мл) объединенных фракций ЛСБ после катионообменной хроматографии, инкубировали при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 16 ч. Лунки трижды промывали ФСБ (pH 7,5) с добавлением 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т) и блокировали 0,1% БСА-ФСБ в течение 2 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Лунки, заполненные 100 мкл ФСБ -Т с добавлением 0,1% БСА, использовали в качестве отрицательного контроля. Планшеты промывали ФСБ -Т, в лунки добавляли по 100 мкл раствора Б-ЛПС в разных концентрациях (0,08–2,0 мг/мл) и инкубировали в течение 4 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . После инкубации планшеты промывали ФСБ-Т, добавляли конъюгат пероксидазы хрена (HRP) и стрептавидина Sigma Chemical (США) в разведении 1: 1000 и инкубировали в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Связанный конъюгат определяли по активности пероксидазы с использованием 100 мкл/лунку раствора субстрата (0,4 мг/мл о-фенилендиамина (о-ФДА) и 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере (pH 5,0)). Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 0,2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 мкл/лунку). Поглощение при 492 нм измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов (μQuantBio-TekInstrument, Inc., США) и наносили на график связывания ЛПС-ЛСБ средние значения трехкратных измерений. Данные связывания анализировали с использованием модифицированного графика Скэтчарда для ELISA, как описано в работе [12]. Для описания взаимодействия между ЛСБ и ЛПС была применена модель связывания на двух независимых участках белковой молекулы:

$$\frac{r}{[S]} = \frac{n_1 K_1}{1 + K_1 [C_{\text{ЛПС}}]} + \frac{n_2 K_2}{1 + K_2 [C_{\text{ЛПС}}]} \quad (1)$$

$$r/[S] = n_1 K_1 / (1 + K_1 [C_{\text{ЛПС}}]) + n_2 K_2 / (1 + K_2 [C_{\text{ЛПС}}]), \quad (2)$$

где  $r$  – отношение количества связанного ЛПС к добавленному белку;  $[C_{\text{ЛПС}}]$  – концентрация ЛПС;  $n$  – количество сайтов связывания на молекуле ЛПС,  $K_1$  и  $K_2$  – константы ассоциации. Рассчитывали значение  $\Delta A = A_{\text{exp}} - A_0$ , где  $A_0$  и  $A_{\text{exp}}$  – оптическая плотность растворов до и после добавления ЛПС соответственно. Значения  $\Delta A_{\text{max}}$  и  $K_b$  определяли по зависимости Скэтчарда в координатах  $\Delta A/C_{\text{ЛПС}}$  от  $\Delta A$ .

**Диссоциация агрегатов ЛПС под действием ЛСБ.** Использовали несколько форм липополисахаридов: S-ЛПС (*E. coli* 055), S-R-ЛПС (*Y. pseudotuberculosis*) и R-ЛПС (*E. coli* K12). В Ф-ЛПС флуоресценция ФИТЦ самогасится в мицеллах ЛПС, тогда как диссоциация мицелл приводит к увеличению флуоресценции.

Флуоресценцию Ф-ЛПС регистрировали при возбуждении 480 нм и эмиссии 520 нм. Диссоциацию мицелл ЛПС регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции, возрастающей со временем после добавления ЛСБ.

Дезагрегацию различных форм ЛПС (Rd-ЛПС из *E. coli* K12, S-R-ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* 598 и S-ЛПС из *E. coli* 055) при взаимодействии с ЛСБ из двух видов медуз так же изучили методом динамического светорассеивания (ДРС) на приборе ZetaSizer Nano ZS («Malvern», Великобритания), оснащенном He-Ne-лазером ( $\lambda = 633$  нм, 4 мВт), при угле  $173^\circ$ . Время накопления данных составляло 15–30 мин. Расчет Z-average (среднего гидродинамического радиуса частиц образца) и RH (гидродинамического радиуса) частиц при анализе их объемного распределения выполняли с помощью программного обеспечения к прибору (ZetaSizer Nano ZS, «Malvern», Великобритания).

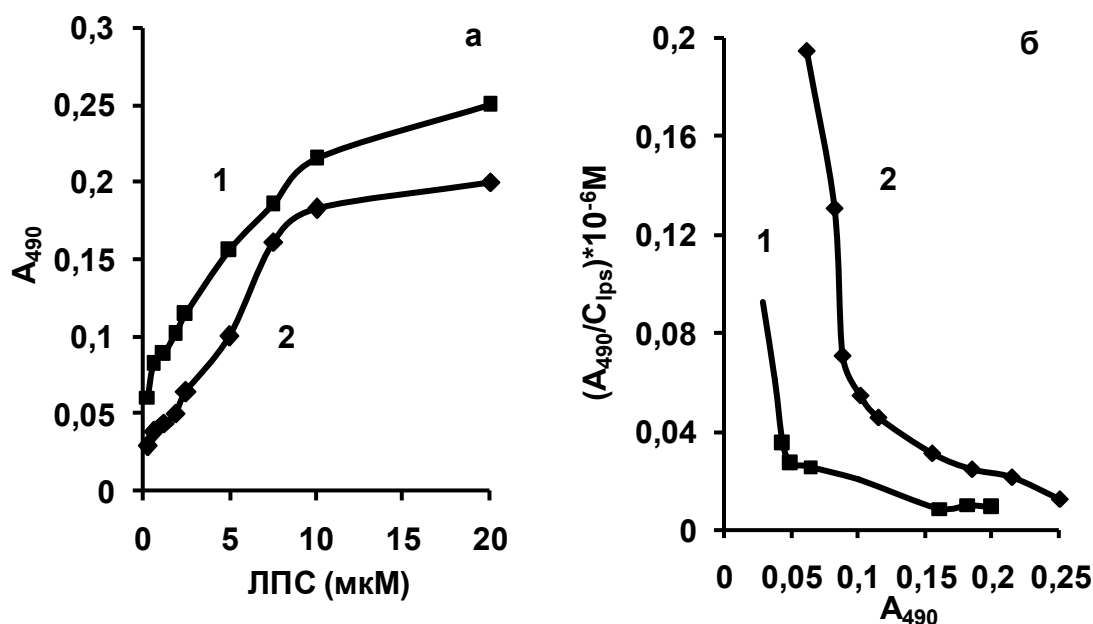
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Характеристика ЛСБ.** Из лизата мезоглеи медуз из *Aurelia aurita* и *Rhopilema asamushi* с помощью катионообменной хроматографии были выделены и очищены несколько ЛСБ с кажущейся молекулярной массой 110 кДа [8]. ЛПС связывающая активность была обнаружена во фракциях, элюированных в области градиента с 1М NaCl, что свидетельствует о высоком положительном заряде белков этой фракции.

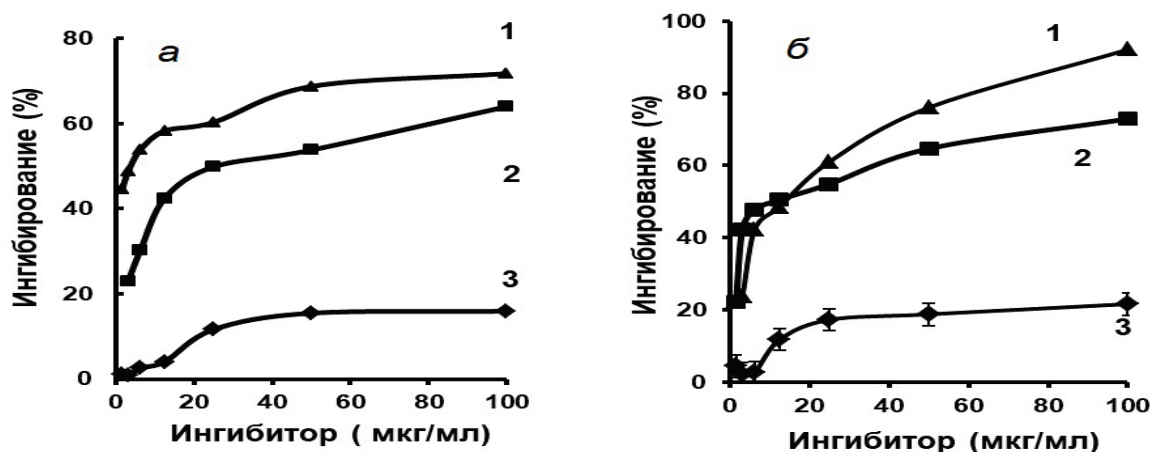
**Определение параметров связывания ЛПС с ЛСБ медуз.** Для изучения взаимодействия ЛПС с белками из двух видов после катионообменной хроматографии использовали лиганд-ферментный твердофазный анализ. ЛСБ медуз с одинаковой концентрации общего белка сорбировали на поверхности полистирольной пластины и титровали меченым биотином ЛПС. Для учета образующихся комплексов использовали конъюгат стрептавидин–пероксидаза хрена. Как видно из рисунка 1а, связывание белков с ЛПС имеет специфический характер, так как достигается насыщение сайтов связывания на белках лигандом.

График Скэтчарда для данных связывания дает двухфазную кривую (рис. 1б), что позволяет предположить, что в ЛСБ присутствует более одного типа сайтов связывания для ЛСБ. Если предположить наличие двух сайтов связывания для ЛПС, то можно рассчитать константу диссоциации для одного класса рецепторов как  $K_d = 3,28 \times 10^{-6}$  М, а для второго класса рецепторов как  $K_d = 0,13 \times 10^{-6}$  М для *A. aurita* и  $K_d = 3,66 \times 10^{-6}$  М и  $K_d = 0,27 \times 10^{-6}$  М для *R. asamushi*. Если предположить наличие двух сайтов связывания для ЛПС, то можно рассчитать величины констант диссоциации. Для ЛСБ *A. aurita*  $K_{d1} = 3,28 \times 10^{-6}$  М и  $K_{d2} = 0,13 \times 10^{-6}$  М и для ЛСБ из *R. asamushi*  $K_{d1} = 3,66 \times 10^{-6}$  М и  $K_{d2} = 0,27 \times 10^{-6}$  М. Согласно литературным данным, в ELISA связывающем тесте ЛСБ из белого шримса *Litopenaeus vannamei* имел большую величину  $K_d = 1,28 \times 10^{-7}$  М [13].

**Ингибирование связывания ЛСБ с ЛПС.** Ингибирование связывания проводили, используя изолированный R-ЛПС, свободный липид А и О-специфический полисахарид, чтобы определить фрагменты молекулы ЛПС, участвующие во взаимодействии с ЛСБ. Как R-ЛПС, так и свободный липид А ингибировали связывание ЛСБ из обоих видов медуз с ЛПС дозозависимым, насыщаемым образом для обоих видов медуз (рис. 3а, 3б). Напротив, О-специфический полисахарид (рис. 3а, 3б) слабо ингибирует связывание Б-ЛПС с ЛСБ.



**Рисунок 1.** Связывание меченого биотином ЛПС с иммобилизованными ЛСБ *Aurelia aurita* (1) и *Rhopilema asamushi* (2). Связывание ЛСБ с Б-ЛПС определяли с помощью HRP-конъюгированного стрептавидина (а). Графики Скэтчарда для взаимодействия ЛСБ с Б-ЛПС (б)



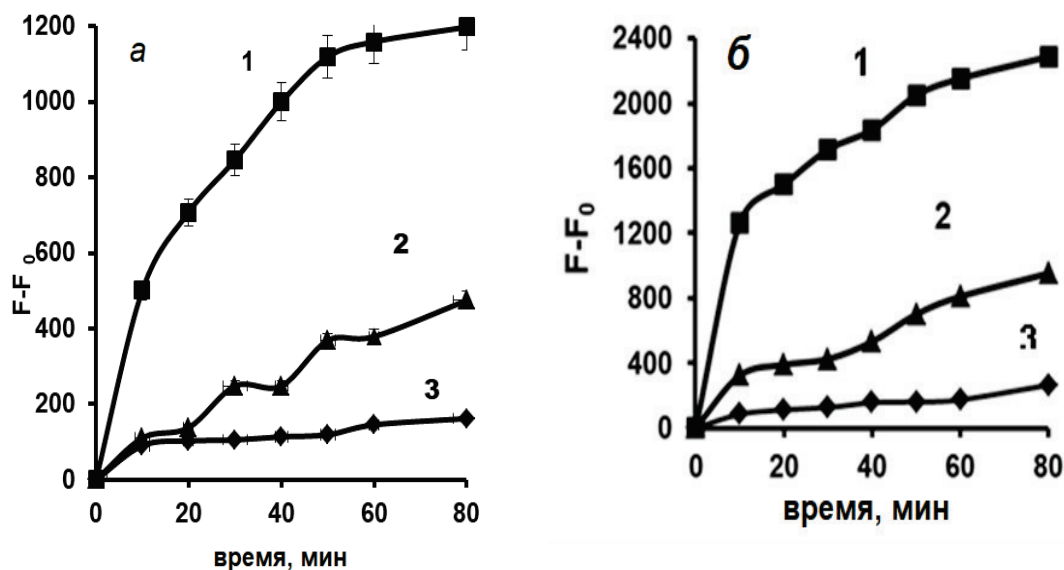
**Рисунок 2.** Ингибирование связывания Б-ЛПС с ЛСБ из *A. aurita* (а) и *R. asamushi* (б) с помощью Rd-ЛПС (1), свободного липида А (2) и О-PS (3). Результаты представляют средние значения из трех повторений

Это указывает на то, что ЛСБ связываются с липидом А или олигосахаридом кора, которые являются наиболее консервативными компонентами ЛПС.

**Диссоциация мицелл ЛПС при взаимодействии с ЛСБ.** Способность ЛСБ диссоциировать мицеллы ЛПС изучали флуорометрически с использованием Ф-ЛПС. Использовали следующие формы липополисахарида: S-ЛПС (*E. coli* 055), S,R-ЛПС (*Y. pseudotuberculosis*) и Rd-ЛПС (*E. coli* K12).

Флуоресценция ФИТЦ самогасится в мицеллах Ф-ЛПС, тогда как диссоциация мицелл приводит к увеличению флуоресценции. За диссоциацией мицелл Ф-ЛПС следили по увеличению интенсивности флуоресценции с увеличением времени их инкубации в присутствии ЛСБ. Под действием ЛСБ из медуз обоих видов достаточно эффективно разрушаются мицеллы R-ЛПС, в молекуле которого отсутствуют О-полисахаридные цепи, в то время как мицеллы S, R- и особенно R-ЛПС диссоциируют в гораздо меньшей степени. Полученные результаты, вероятно, объясняются разной доступностью сайтов связывания на молекуле ЛПС для ЛСБ.

Деагрегацию различных форм ЛПС (R<sub>d</sub>-ЛПС из *E. coli* K12, S,R-ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* 598 и S-ЛПС ЛПС из *E. coli* 055) при взаимодействии с ЛСБ из двух видов медуз так же изучили методом динамического светорассеивания. Характер распределения и размер частиц (34 нм и 88,8 нм) R<sub>d</sub>-ЛПС в комплексе с ЛСБ из *R. asamushi* указывает на деагрегацию R<sub>d</sub>-ЛПС (рис. 4). После связывания с белком исчезают крупные частицы ЛПС с размерами в области 200 нм. Влияние ЛСБ из *A. aurita* на размеры R<sub>d</sub>-ЛПС было менее выраженным, хотя связывание белка с ЛПС приводило к появлению частиц размером 100 нм. Данные электрокинетических



**Рисунок 3.** Изменение интенсивности флуоресценции конъюгатов ФИТЦ с R<sub>d</sub>-ЛПС (1), S,R-ЛПС (2) and S-ЛПС (3) в при добавлении ЛСБ из *A. aurita* (а) и *R. asamushi* (б). Результаты представляют средние значения из трех повторений

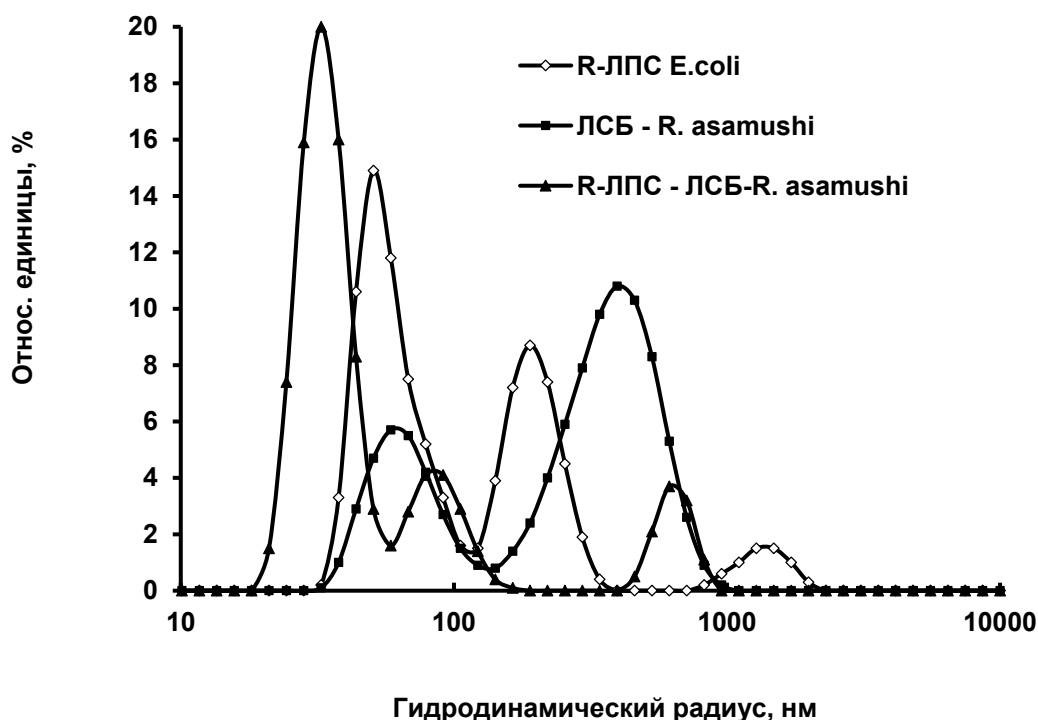


Рисунок 4. Объемное распределение по размеру частиц ЛСБ из *R. asamushi* (1), R<sub>d</sub>-ЛПС *E.coli* K12 (2), комплексов ЛСБ из *R. asamushi* с R<sub>d</sub>-ЛПС (3)

измерений так же указывают на связывание ЛСБ с ЛПС. Происходит нейтрализация отрицательного заряда R<sub>d</sub>-ЛПС (-42,2 мВ) в комплексе ЛПС-ЛСБ-*R. asamushi* до -4,4 мВ.

S,R-ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* дезагрегировал под воздействием ЛСБ из обоих видов медуз (рис. 5а, 5б). В растворе обнаруживаются частицы комплексов ЛПС-ЛСБ размером 25-30 нм и отрицательным зарядом -15-20 мВ, вместо частиц ЛПС размером 138 нм и зарядом -30 мВ. ЛСБ из *R. asamushi* более активен при взаимодействии с ЛПС, чем белок из *A. aurita*.

Мицеллы S-ЛПС из *E. coli* не дезагрегируют при связывании с ЛСБ *R. asamushi* и *A. aurita* (рис. 6а, 6б), что, по-видимому, связано с экранированием липида А О-специфическими цепями в молекуле S-ЛПС.

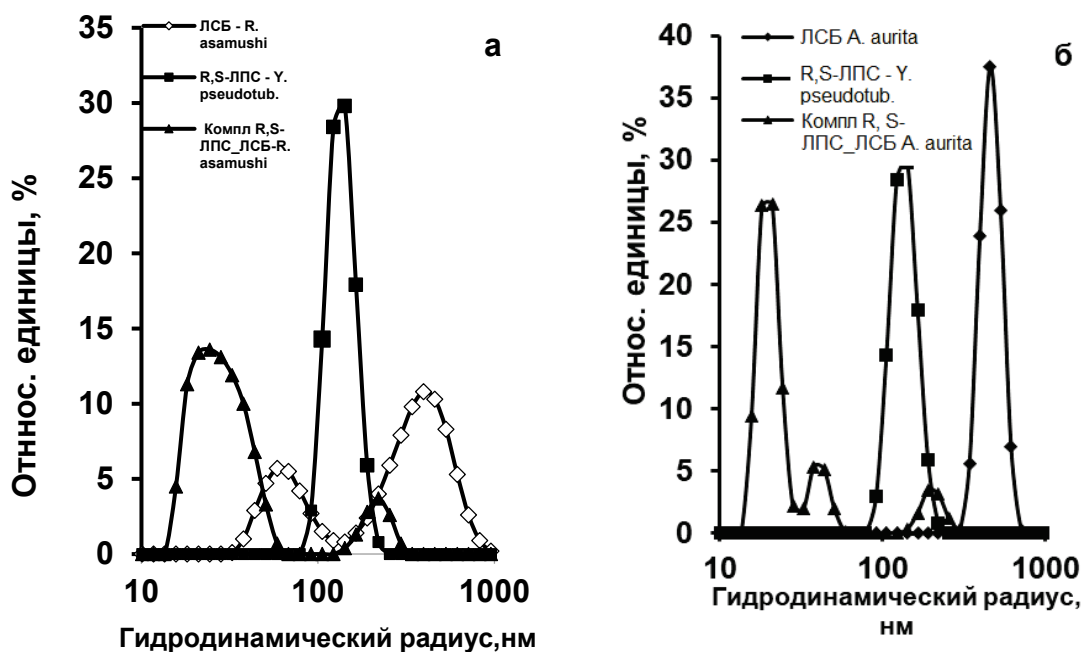


Рисунок 5. Объемное распределение по размеру частиц ЛСБ из *R. asamushi* (1а), *A. aurita* (1б), R,S-ЛПС *Y. pseudotuberculosis* (2 а,б), комплексов ЛСБ из *R. asamushi* с R,S-ЛПС (3 а), *A. aurita* с R,S-ЛПС (3 б)

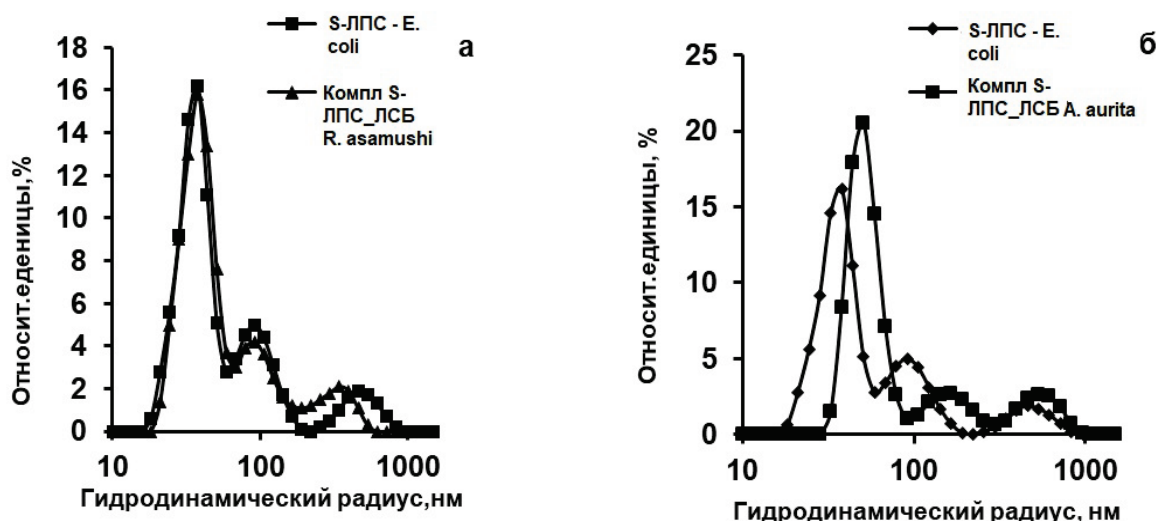


Рисунок 6. Объемное распределение по размеру частиц S-ЛПС *E. coli* K12 (а,б), комплексов ЛСБ из *R. asamushi* с R,S-ЛПС (а), *A. aurita* с R,S-ЛПС (б)

Таким образом, изучено взаимодействие ЛПС разных структурных типов с ЛСБ из двух видов медуз *A. aurita* и *R. asamushi*. Оба белка специфически и с высокой аффинностью ( $K_d$  порядка  $10^{-6}$  М) связываются с липидным и коровым фрагментами ЛПС. В ЛСБ присутствует два типа сайтов связывания. Связывание ЛСБ приводит к диссоциации мицелл ЛПС. Размеры ЛПС уменьшаются с 200 нм до 25-30 нм в составе комплексов R<sub>d</sub>-ЛПС-ЛСБ. Данные электрокинетических измерений указывают на нейтрализацию отрицательного заряда R-ЛПС (-42,2 мВ) в комплексе ЛПС-ЛСБ-Ропилема до -4,4 мВ. Этот факт свидетельствует о том, что электростатические взаимодействия участвуют в образовании комплексов между ЛСБ и ЛПС и что катионная природа белка играет важную роль в этом процессе. Мицеллы S-ЛПС из *E. coli* не дезагрегируют при связывании с ЛСБ, что, по-видимому, связано с экранированием липида А О-специфическими цепями в молекуле S-ЛПС. Связывание ЛПС с ЛСБ может оказывать влияние на их эндотоксические свойства.

#### Список литературы / References:

- Iwanaga S., Lee B.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biology*, 2005, vol. 38, pp. 128-150, doi: 10.5483/bmbrep.2005.38.2.128.
- Warren H.S., Glennon M.L. et al. Binding and Neutralization of Endotoxin by Limulus Antilipopolysaccharide Factor. *Infect. Immun.*, 1992, vol. 60, pp. 2506-2513, doi: 10.1128/iai.60.6.2506-2513.1992.
- Saito T., Kawabata S.I., Shigenaga T., Takayenoki Y., Cho J., Nakajima H., Hirata M., Iwanaga S. A Novel Big Defensin Identified in Horseshoe Crab Hemocytes: Isolation, Amino Acid Sequence, and Antibacterial Activity. *J. Biochem.*, 1995, vol. 117, pp. 131-1137.
- Tobias P.S., Mathison J.C., Ulevitch R.J. A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to Gram-negative sepsis. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, pp. 13479-13481.
- Amparyup P., Sutthangkul J., Charoensapsri W., Tassanakajon A. Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan and activates shrimp prophenoloxidase system. *J Biol Chem.*, 2016, vol. 291, no. 20, p. 10949, doi: 10.1074/jbc.A111.294744.
- Бахолдина С.И., Набережных Г.А., Горбач В.И., Исаева М.П., Соловьева Т.Ф. Морские беспозвоночные Охотского моря как новые источники липополисахарид связывающих белков. *Биология моря*, 2014, т. 40, № 1, с. 63-69, doi: 10.1134/S106307400906008X [Bakholdina S.I., Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Isaev, M.P., Solov'eva T.F. Marine Invertebrates of the Sea of Okhotsk as a New Source of Lipopolysaccharide Binding Proteins. *Russian J. Mar. Biol.*, 2014, vol. 40, pp. 59-65 (In Russ.)].
- Ovchinnikova T.V., Balandin S.V., Aleshina G.M., Tagaev A.A., Leonova Y.F., Krasnodembsky E.D., Men'shenin A.V., Kokryakov V.N. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochem. Bioph. Res. Com.*, 2006, vol. 348, pp. 514-523, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.078.
- Naberezhnykh G.A. New Lipopolysaccharide Binding Proteins from the Jellyfishes *Aurelia aurita* and *Rhopilema asamushi* of Sea of Japan. *J Marine Biol Aquacult.*, 2017, vol. 3, no. 2, pp. 1-5.
- Andra J., Howe J., Garidel P., Rossle M., Richter W., Leiva-Leon J., Moriyon I., Bartels R., Gutschmann T., Brandenburg K. Mechanism of interaction of optimized Limulus-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochem. J.*, 2007, vol. 406, pp. 297-307, doi: 10.1042/BJ2007027936.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quatitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248-534, doi: 10.1006/abio.1976.9999.

11. Galanos O. Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1969, vol. 9, pp. 245-249, doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.
12. Hogg P.J, Johnston S. Calculation of equilibrium constants for antigen-antibody interactions by solid-phase in immunoassay: the binding of paraquat to its elicited mouse monoclonal antibody. *Mol. Immunol.*, 1987, vol. 24, pp. 797-801, doi: 10.1016/0161-5890(87)90064-2.
13. Chen Y.-Y., Chen J.-C., Kuo Y.-H., Lin Y.-C., Chang Y.-H., Gong H.-Y., Huang C.-L. Lipopolysaccharide and b-1,3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Develop. Comp. Immunol.*, 2016, vol. 55, pp. 144-151, doi: 10.1016/j.dci.2015.10.023.

#### INTERACTION OF LIPOPOLYSACCHARIDE-BINDING PROTEINS WITH VARIOUS FORMS OF LIPOPOLYSACCHARIDES.

**Naberezhnykh G.A., Davydova V.N., Soloveva T.F.**

Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FarEastern Branch of the Russian Academy of Sciences  
100 Let Vladivostok Ave., 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: naber1953@mail.ru

Received 14.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0606

**Abstract** Lipopolysaccharide-binding proteins from two common jellyfish species *Aurellia aurita* and *Ropelema asamushi* were isolated and purified, and the interaction of lipopolysaccharides (LPS) of various structural types with LBP was studied. By inhibiting the interaction, it was found that both proteins specifically bind to the lipid and core fragments of the LPS molecule. There are two types of binding sites in LBP with  $K_d = 3,28 \times 10^{-6}$  M and  $K_d = 0,13 \times 10^{-6}$  M (for the protein from *A. aurita*) and  $K_d = 3,66 \times 10^{-6}$  M and  $K_d = 0,27 \times 10^{-6}$  M (for protein from *R. asamushi*). It has been shown by dynamic light scattering that the binding of LBP to R-LPS leads to the dissociation of LPS micelles. The sizes of LPS aggregates decrease from 200 nm to 25–30 nm in the composition of LPS–LSB complexes. The data of electrokinetic measurements indicate the neutralization of the negative charge of R<sub>d</sub>-LPS (-42,2 mV) in the LPS-LSB-R. *asamushi* complex up to -4,4 mV. S-LPS micelles from *E. coli* do not disaggregate upon binding to LBP, which is apparently due to the shielding of lipid A by O-specific chains in the S-LPS molecule. The binding of LPS to LBP may affect their endotoxic properties.

**Key words:** lipopolysaccharide, lipopolysaccharide binding proteins, binding parameters, disaggregation.