

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПИДНОГО МАТРИКСА И ТЕМПЕРАТУРЫ НА РЕКОНСТРУКЦИЮ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ OMPF ПОРИНА ИЗ *YERSINIA RUCKERI*

Набережных Г.А., Чистюлин Д.К., Хоменко В.А., Сидорин Е.В.,
Портнягина О.Ю., Новикова О.Д.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, д. 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: novolga_05@mail.ru
Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. С помощью липосомальной модели установлена прямая зависимость между изменениями в молекулярной структуре неспецифических поринов наружной мембраны грамотрицательных бактерий, происходящими под действием температуры, и функциональной активностью этих белков. В работе были использованы: OmpF порин из *Y. ruckeri*, бактерии патогенной для рыб и в качестве белка сравнения классический OmpF порин из *E. coli*. Установлено, что в отличие от порина из *E. coli*, OmpF порин из *Y. ruckeri* более устойчив к действию температуры. Для обоих белков показано, что стабильное освобождение флуорометки наблюдается до температуры, не превышающей критическую температуру диссоциации тримеров белков на мономеры, при более высокой температуре наблюдается резкое снижение каналообразующей активности поринов. Высказано предположение о том, что необратимые конформационные изменения в мономерах поринов, происходящие в результате термоденатурации, «не позволяют» им образовывать проводящий тримерный канал даже в липидном окружении.

Ключевые слова: порин, нанопоры, липосомальная модель, функциональная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Движение ионов или молекул через биологические мембраны регулируется с большой точностью при помощи каналов различной специфичности, образованных белками особого класса. В природе эти нанопоры осуществляют разнообразные и важные функции, от поддержания гомеостаза клетки и участия в клеточной сигнализации до активации или уничтожения клеток. Сочетание наноразмерных размеров и сложной, но регулируемой функциональности, делают эти биологические поры особенно привлекательными для различных областей нанобиотехнологии, бурно развивающейся в настоящее время [1]. Область применения биологических пор простирается от сверхчувствительных биосенсоров до целенаправленного уничтожения злокачественных клеток [2].

Одними из таких биологических нанопор являются каналы неспецифических поринов наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий. Порины принадлежат к бета-баррельным интегральным мембранным белкам, образующим в нативной мембране олигомерные структуры (чаще всего тримеры). Они состоят из антипараллельных амфифильных бета-стрендов (тяжей), гидрофобные остатки аминокислот которых экспонированы в липидный бислой, а гидрофильные - во внутреннюю часть (интерьер) барреля [3]. По своим физико-химическим свойствам порины представляют собой слабокислые белки, имеющие необычайно большое для интегральных белков количество полярных аминокислотных остатков. В стабилизации пространственной структуры поринов как в НМ, так и в изолированном состоянии помимо гидрофобных взаимодействий существенную роль играют водородные и ионные связи [4]. Именно этим обусловлена необычайная устойчивость этих белков к протеазам, повышенной температуре и другим денатурирующим факторам.

Амфифильная природа молекул этих белков и сохранение пространственной структуры их молекул в изолированном состоянии в растворах детергентов позволяет им легко встраиваться в липидный бислой с образованием ион-проводящей структуры. Как было показано нами ранее, существенное значение для реконструкции порина в липидный бислой и проявления его функциональных свойств имеет пространственная структура молекулы порина [5]. Кроме того, в предыдущих исследованиях используя порин из *Y. pseudotuberculosis* в качестве модельного белка, мы выбрали оптимальные условия встраивания порина в липосомальную мембрану [6].

Целью данной работы явилось изучение стабильности функционально активной молекулярной структуры OmpF порина из НМ *Y. ruckeri* в зависимости от температуры с помощью липосомальной модели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование бактерий. В работе использовали штамм КММ 821 *Y. ruckeri*. Культивирование микроорганизмов проводили при 4 °С на питательном бульоне (Махачкала, Россия) в колбах (1 л) с интенсивной аэрацией в течение 5 суток.

Выделение. Электрофоретически гомогенные образцы OmpF поринов из *Y. ruckeri* и *E. coli* были получены по методикам, описанным в работах [7] и [8] соответственно.

Получение моноламельных липосом, меченных карбоксифлуоресцеином (КФ). Для получения отрицательно заряженных липосом смесь, состоящую из 30 мг лецитина, 12,5 мг холестерина, 1,8 мг дицетилфосфата (ДЦФ), растворяли в 0,3 мл хлороформа упаривали и высушивали в вакууме в течение 3 ч. Остаток растворяли в 0,3 мл сухого эфира, добавляли 50 мкл воды и 50 мкл 0,2 М раствора карбоксифлуоресцеина (КФ) в 0,1 М Na_2CO_3 . Смесь встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой бане (Elma, Latvia) в течение 10 мин при 5 °С и упаривали в вакууме до полного удаления эфира. Остаток суспендировали в 4 мл Трис-НСl буфера, содержащего 0,15 М NaCl, pH 7,5 (TNBS). Суспензию липосом отмывали TNBS, осаждая липосомы центрифугированием при 25000g, затем осадок липосом суспендировали в 4 мл TNBS. После отмывания липосом от несвязавшегося КФ, липосомы обрабатывали в ультразвуковой бане (Elma, Latvia) в течение 10 мин при 5 °С и 10 раз пропускали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 200 нм (Nucleopore, США). Контроль за размерами липосом осуществляли методом динамического светорассеяния с использованием прибора ZetaSizerNano ZS («Malvern», Великобритания) при температуре 25 °С, при фиксированном угле рассеяния 173 ° и длине волны лазера 633 нм.

Регистрация изменения проницаемости липосомальной мембраны. Для определения порообразующей активности исследуемых белков при различной температуре регистрировали изменение проницаемости липосомальной мембраны. Вначале определяли фоновую флуоресценцию, добавляя к 50 мкл суспензии липосом 120 мкл TNBS. Затем к суспензии липосом добавляли 20 мкл раствора порина, выдержанного при различных температурах, и фиксировали изменение флуоресценции в течение 30 мин. Для определения максимальной флуоресценции при полном лизисе к суспензии липосом добавляли 100 мкл раствора 10 % раствора SDS. Процент специфического освобождения маркера (COM) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ COM} = \frac{F_{\text{эксп}} - F_{\text{фон}}}{F_{\text{макс}} - F_{\text{фон}}} \times 100 \%,$$

где $F_{\text{эксп}}$ – флуоресценция после добавления белка, $F_{\text{макс}}$ – флуоресценция после полного лизиса липосом, $F_{\text{фон}}$ – флуоресценция без добавления белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В нативной мембране грамотрицательных бактерий неспецифические порины существуют преимущественно в виде гомотримеров, именно эта молекулярная форма белков является функционально активной единицей. В изолированном состоянии в растворах детергентов молекулярная структура поринов может изменяться под действием температуры. По достижении некоторой температуры, называемой критической, тримеры белков диссоциируют на мономеры, и этот процесс сопровождается потерей функциональной активности поринов.

В нашу задачу входило установление корреляции между точкой термоперехода и каналобразующей активностью поринов с помощью липосомальной модели. В работе были использованы: OmpF порин из *Y. ruckeri*, бактерии патогенной для рыб, прежде всего, из семейства лососевых и классический OmpF порин из *E. coli* (в качестве белка сравнения). Как было показано нами ранее [7], порин из *Y. ruckeri* значительно более устойчив к тепловой денатурации по сравнению с порином из *E. coli*. Согласно данным калориметрии и электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS [7], диссоциация порина из *Y. ruckeri* происходит в интервале температур 85-90 °С, тогда как тример порина из *E. coli* полностью диссоциирует на мономеры при 70 °С [8].

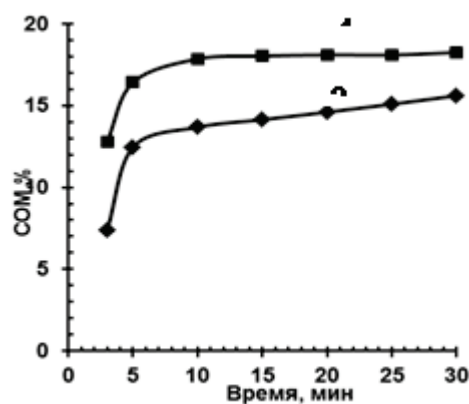


Рисунок 1. Кинетика освобождения КФ из липосом, 1 – OmpF из *E. coli*, 2 – OmpF из *Y. ruckeri*.

Порины были выдержаны с суспензией липосом при 25 °С. Ось ординат: COM, % – процент специфического освобождения КФ

Для контроля за изменением молекулярной структуры OmpF порина из *Y. ruckeri*, связанным с действием температуры, был использован метод вытекания флуоресцентной метки из отрицательно заряженных липосом, состоящих из лецитина, ДЦФ и холестерина. Концентрация флуорофора КФ внутри липосом в исходной суспензии превышала концентрацию его самотушения. Образование пор в липосомальной мембране при добавлении образца порина сопровождалось вытеканием флуорофора во внешний раствор и, соответственно, заметным увеличением интенсивности его флуоресценции. По изменению величины СОМ при включении белка в липосомы можно было судить, насколько меняется функциональная активность порина в зависимости от температуры предварительной обработки белка.

Наши эксперименты показали, что состав липидного матрикса весьма важен для стабильности липосом. Оказалось, что липосомы без холестерина нестабильны даже при комнатной температуре и, соответственно, малопригодны для исследований температурной зависимости структуры и функции исследуемых белков в составе липосом. В связи с этим, даже принимая во внимание, что в состав бактериальной мембраны холестерин не входит, для повышения стабильности липосом было решено ввести в их состав этот компонент.

На рисунке 1 приведены кинетические графики выхода КФ из липосом при включении обоих белков. Они свидетельствуют об эффективном встраивании поринов в липосомы и достижении точки насыщения в течение первых 10 мин, на что указывает дальнейшее стабильное освобождение флуорофора за весь период наблюдения (30 мин).

Следует отметить, что размеры липосом, определенные методом динамического светорассеяния, составили 200 нм. После добавления поринов их размеры увеличивались до 400 нм, что также может свидетельствовать о связывании поринов с липосомами.

На втором этапе исследования порины, прогретые при разных температурах и охлажденные с помощью ледяной бани, добавляли к суспензии липосом, а собственно реконструкцию белков в липосомальную мембрану проводили при комнатной температуре. Таким образом, мы смогли установить корреляцию между изменениями в конформации молекулы белка, произошедшие под действием температуры, и функциональной активностью порина, выявляемую при встраивании его в липосомальный бислой. Как следует из данных рисунка 2, резкое уменьшение выхода флуорофора соответствует температуре диссоциации тримеров белков на мономеры, значения которой для исследуемых белков приведены выше.

Таким образом, с помощью липосомальной модели получены экспериментальные доказательства того, что в искусственной липосомальной мембране тримерная молекулярная форма изолированных поринов сохраняет способность образовывать функционально активную проводящую структуру. Конформационные изменения, происходящие при температуре, не превышающей критическую температуру диссоциации тримеров белка на мономеры, не влияют на количество освобождаемого флуорофора. Однако диссоциация тримеров сопровождается резким падением величины СОМ. Это свидетельствует о том, что функциональная активность поринов напрямую зависит от молекулярной структуры этих белков. Можно предположить, что причиной наблюдаемого явления, являются необратимые конформационные изменения в субъединицах (мономерах) белков, которые «не позволяют» им образовывать проводящий тримерный канал даже в липидном окружении.

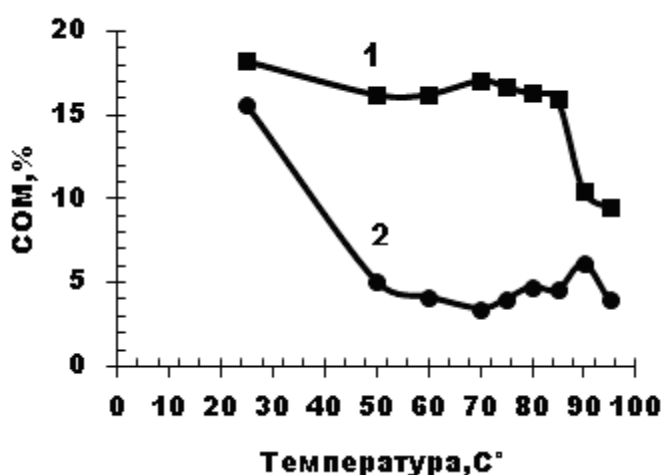


Рисунок 2. Зависимость функциональной активности исследуемых поринов от температуры предварительной обработки образцов: 1 – OmpF из *Y. ruckeri*, 2 – OmpF из *E. coli*. Перед реконструкцией в липосомы белки были предварительно выдержаны при температур 25-95 °C. Ось ординат: СОМ, % - процент специфического освобождения КФ

Список литературы / References:

1. Majd S., Yusko E.C., Billeh Y.N., Macrae M.X., Yang J., Mayer M. Applications of biological pores in nanomedicine, sensing, and nanoelectronics. *Curr Opin Biotechnol.*, 2010, vol. 21, pp. 439-476.
2. Pradeep H., Rajanikant G.K. Nanochannels: biological channel analogues. *IET Nanobiotechnol.*, 2012, vol. 6, no. 2, pp. 63-70.
3. Schulz G.E. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1565, pp. 308-317.
4. Koebnick R., Locher K.P., Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.*, 2000, vol. 37, pp. 239-253.
5. Набережных Г.А., Карпенко А.А., Горбач В. И., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Кульчин Ю.Н. Исследование морфологии надмолекулярных структур белка-порина из *Yersinia pseudotuberculosis* в липидном бислое методом атомно-силовой микроскопии. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2016*, 2016, т. 2, с. 32-36. [Naberezhnykh G. A., Karpenko A.A., Gorbach V. I., Khomenko V.A., Novikova O.D., Kulchin Yu.N. Morphology of supramolecular structures of pore-forming protein from *Yersinia pseudotuberculosis* in lipid bilayer by atomic force microscopy. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, vol. 2, pp. 32-36. (In Russ.)]
6. Новикова О.Д., Ким Н.Ю., Лукьянов П.А., Емельяненко В.И., Кузнецова С.М., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. Влияние pH на структуру и функциональную активность порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* (иерсинина) Сообщение 2. pH-Индукционные конформационные интермедиаты порина из наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*. *Биол. мембраны*, 2007, т. 24, № 2, с. 159-168. [Novikova O. D., Kim N. Yu., Luk'yanov P. A., Likhatskaya G. N., Emel'yanenko V. I., Solov'eva T. F. Effects of pH on Structural and Functional Properties of Porin from the Outer Membrane of *Yersinia pseudotuberculosis*. II. Characterization of pH-Induced Conformational Intermediates of *Yersinin*. *Membrane and Cell Biology*, 2007, vol. 1, no. 2, pp. 154-162. (In Russ.)]
7. Novikova O.D., Chistyulin D.K., Khomenko V.A., Sidorin E.V., Kim N.Yu., Sanina N.M., Portnyagina O.Yu., Solov'eva T.F., Uversky V.N., Shnyrov V.L. Peculiarities of thermal denaturation of OmpF porin from *Yersinia ruckeri*. *Molecular BioSystems*, 2017, vol. 13, pp. 1854-1862.
8. Rosenbusch J.P. Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding. *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, no. 24, pp. 8019-8029.

EFFECT OF THE LIPID MATRIX COMPOSITION ON RECONSTITUTION AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF OMPF PORIN FROM *YERSINIA RUCKERI*

**Naberezhnykh G.A., Chistyulin D.K., Khomenko V.A., Sidorin E.V.,
Portnyagina O.Yu., Novikova O.D.**

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the RAS
prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: novolga_05@mail.ru

Abstract. Using liposome model, a direct relationship between changes in the molecular structure of the nonspecific porins of the outer membrane of Gram-negative bacteria that occur under the influence of temperature and the functional activity of these proteins has been established. OmpF porin from *Y. ruckeri*, bacteria pathogenic for fish and classical OmpF porin from *E. coli* as a comparison protein were used in the study. It was found that unlike porin from *E. coli*, OmpF porin from *Y. ruckeri* is more resistant to temperature. For both proteins, stable release of the fluorophore was observed up to a temperature not exceeding the critical temperature of the dissociation of trimers of the proteins into monomers, at a higher temperature a sharp decrease in the channel-forming activity of the porins was found. It is suggested that irreversible conformational changes in the porin monomers that occur as a result of thermal denaturation "do not allow" them to form a conducting trimeric channel even in a lipid environment.

Key words: porin, nanopores, liposomal model, functional activity.