

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР БЕЛКА-ПОРИНА ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Набережных Г.А.¹, Карпенко А.А.², Горбач В. И.¹, Хоменко В.А.¹, Новикова О.Д.¹, Кульчин Ю.Н.³

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ

²Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

ул. Пальчевского, 17, г. Владивосток, 690041, РФ

³Институт автоматизации и процессов управления ДВО РАН, РФ

ул. Радио, 5, г. Владивосток, 690041, РФ

e-mail: naber1953@mail.ru; novolga_05@mail.ru

Аннотация. Формирование упорядоченных наноструктур порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* проводили двумя методами: из протеолипосом и прямой реконструкцией белка в предварительно нанесенный на поверхность слюды фосфолипидный бислой. Морфологию полученных структур анализировали с помощью атомно-силовой микроскопии. Показано, что эффективность формирования, степень однородности и размер доменов поринов существенным образом зависят от условий эксперимента и содержания липополисахарида (ЛПС) в образцах белка. Обнаружено, что полученные из протеолипосом домены порина имели неравномерное распределение в бислое и большой разброс в диаметре (20-100 нм). Самопроизвольное формирование протяженных участков пориновых наночастиц наблюдалось в слабокислой среде при включении ЛПС в поддерживающий липидный бислой или при использовании образцов белка с высоким содержанием ЛПС. При этом средняя высота доменов была приблизительно одинакова (8-10 нм), а средний диаметр составлял 75 и 30 нм соответственно.

Ключевые слова: порин, липополисахарид, фосфолипидный бислой, наноструктура, атомно-силовая микроскопия.

MORPHOLOGY OF SUPRAMOLECULAR STRUCTURES OF PORE-FORMING PROTEIN FROM *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* IN LIPID BILAYER BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Naberezhnykh G. A.¹, Karpenko A.A.², Gorbach V. I.¹, Khomenko V.A.¹, Novikova O.D.¹, Kulchin Yu.N.³

¹G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences

100 let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russia

²A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology FEB RAS

Palchevskogo str., 17, Vladivostok, 690041, Russia

³Institute of Automation and Control Processes FEB RAS

Radio str., 5, Vladivostok, 690041, Russia

e-mail: naber1953@mail.ru; novolga_05@mail.ru

Abstract. Formation of ordered nanostructures of outer membrane porin from *Yersinia pseudotuberculosis* was carried out in two ways: from the proteoliposomes and by direct protein reconstitution in the pre-deposited phospholipid bilayer on the mica surface. The morphology of the structures obtained was analyzed by atomic force microscopy. It is shown that the efficiency of formation, size and degree of homogeneity of the porin domains essentially depend on the experimental conditions and lipopolysaccharide (LPS) content in protein samples. It was found that the porin domains derived from proteoliposomes had uneven distribution in the bilayer and the wide variation in diameter (20-100 nm). Spontaneous formation of extended regions of porin nanoparticles was observed in a weakly acidic solution when the LPS was included in the supported lipid bilayer or by using protein samples with a high content of LPS. The average height of porin domains was approximately the same (8-10 nm) and the average diameter was 75 and 30 nm, respectively.

Key words: porin, lipopolysaccharide, phospholipid bilayer, nanostructure, atomic force microscopy.

Амфифильная природа молекул интегральных мембранных белков, в частности неспецифических поринов, обеспечивающих транспорт низкомолекулярных веществ через наружную мембрану (НМ) грамотрицательных бактерий, позволяет им легко встраиваться в липидный бислой. В присутствии фосфолипидов порины в результате белок-белкового взаимодействия могут самопроизвольно формировать наноструктуры [1, 2]. Выбор детергента и липида имеет большое значение для получения двумерных кристаллов порообразующих белков, при этом химическая структура указанных компонентов определяет параметры упорядоченных белковых структур [2, 3]. Метод самоорганизации двух- и трехмерных структур из наноразмерных составляющих рассматривается как простой и экономически выгодный способ получения наноматериалов. Подобные структуры находят широкое применение в нанобиотехнологии и наномедицине [4]. К ним относятся биогенные наночастицы терапевтического или диагностического назначения, векторы направленной доставки лекарств, нативные или искусственно сконструированные химические и биологические сенсоры.

Целью данной работы явилась разработка подходов к получению на основе белка-порина из НМ *Yersinia pseudotuberculosis* биоматриц, потенциально пригодных для создания комплексных неорганических наноструктурных композиций различного назначения.

Материалы и методы. *Культивирование бактерий.* В работе использовали штамм H-557 *Y. pseudotuberculosis* 0:1В серовара. Культивирование микроорганизмов проводили при 4 °С на питательном бульоне (Махачкала, Россия) в колбах (1 л) с интенсивной аэрацией в течение 5 суток.

Выделение порина и его комплексов с пептидогликаном (ПГ) и липополисахаридом (ЛПС). Комплекс ПГ-порин и изолированный порин, содержащий 8 % ЛПС, получали экстракцией бактериальных клеток ионным детергентом додецилсульфатом натрия (ДСН) по методу, описанному в работе [5]. Для получения порина, не содержащего ЛПС (П), использовали обработку 30 % раствором ДСН, как описано в работе [6]. Дальнейшую очистку образца порина проводили гель-фильтрацией в присутствии 1 % раствора неионного детергента октилглюкозида (ОГ). В результате был получен образец П-ОГ, гомогенный по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Липополисахарид-белковый комплекс (ЛПБК) получали экстракцией 5 % трихлоруксусной кислотой по методу Буавена [7].

Получение больших моноламелярных липосом, меченных карбоксифлуоресцеином (КФ) и регистрация изменения проницаемости липосомальной мембраны. Для получения отрицательно заряженных липосом (1) смесь, состоящую из 2,0 мг лецитина, 0,87 мг холестерина, 0,18 мг дицетилфосфата (ДЦФ), растворенную в 300 мкл хлороформа упаривали и сушили в вакууме 30 минут. Остаток растворяли в 0,3 мл сухого эфира, добавляли 50 мкл 0,254 М раствора КФ (в трис-цитратном буфере с pH 5.0 или 8.0) и 50 мкл воды. Для получения положительно заряженных липосом (2) использовали 0,08 мг цетиламина (ЦА) в 100 мкл хлороформа. Смеси (1) и (2) озвучивали 3 раза по 20 мин при 22 КHz и упаривали в вакууме до полного удаления эфира. Полученную суспензию липосом отмывали физ. раствором с помощью центрифугирования при 25000 g, затем осадок липосом суспензировали в 1 мл физ. раствора. Интенсивность флуоресценции КФ измеряли на спектрофлуориметре Hitachi 850 (Япония) при $\lambda_{\text{возб.}}$ 492 нм и $\lambda_{\text{эмис.}}$ 517 нм. К 980 мкл трис-цитратного буфера с определенным pH добавляли 10 мкл суспензии липосом, определяли фоновую флуоресценцию, затем добавляли 10 мкл раствора белка и фиксировали изменение флуоресценции через 5 мин. Затем добавляли 0,1 мл раствора 10 % ДСН для определения максимальной флуоресценции при полном лизисе липосом. Рассчитывали % специфического освобождения маркера (СОМ) по формуле:

$$\% \text{СОМ} = \frac{F_{\text{экср.}} - F_{\text{фон.}}}{F_{\text{макс.}} - F_{\text{фон.}}} \times 100 \%$$

Получение образцов для микроскопических исследований. Протеолипосомы получали методом длительного диализа раствора образца П-ОГ против НЕРЕС буфера (pH 7.5) в присутствии синтетического фосфолипида дидодецилфосфатидилхолина (ДДФХ) [8] Включение образца П-ОГ в предварительно сформированный на слюде липидный бислои из ДДФХ и дестабилизированный неионным детергентом додецилмальтозидом (ДДМ), осуществляли по методу [9]. Образцы ПГ-порин и ЛПБК, суспендированные в 0,05 М ацетатном буфере, pH 5.5, наносили непосредственно на свежеосколотую поверхность слюды.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Наноструктурные изображения полученных образцов получали с помощью атомно-силового микроскопа Bioscope Catalist (BRUKER, USA) в контактном режиме (Contact mode) на воздухе или в буфере, используя оригинальную разработку фирмы Bruker в режиме Scan Asyst mode. В обоих случаях использовали кантилевер ScanAsyst-Fluid ($k \sim 0.7 \text{ N/m}$, tip radius < 10 nm nominal), предназначенный для работы в жидкой среде. Прижимное усилие к объекту выставляли в пределах 120 pN. Препараты, нанесенные на свежеосколотую пластинку слюды, анализировали с помощью АСМ по методике [8].

Результаты и их обсуждение.

Для сольубилизации порина из *Y. pseudotuberculosis* белка был выбран неионный детергент, поскольку ранее было показано, что в присутствии ОГ белок имеет пространственную структуру максимально приближенную к структуре порина в нативной мембране. Для получения упорядоченных наноструктур образца порина П-ОГ на поверхности слюды были использованы два подхода. Первый метод основан на получении протеолипосом из сольубилизованного в детергенте порина в присутствии синтетического фосфолипида ДДФХ. Данный фосфолипид был выбран, поскольку длина его ацильного остатка соответствует высоте молекулы тримера порина и при встраивании белка в липидный бислои не происходит искажения последнего. Второй подход заключался в предварительном формировании на поверхности слюды липидного бислоя, дестабилизации его раствором детергента и последующего встраивания молекул порина в бислои [9].

Результаты, полученные по первому методу, представлены на рисунке 1,а. Как видно из данных рисунка, нанокластеры порина различного диаметра (20-100 нм) и высоты (до 20 нм) неравномерно включены в гладкий фосфолипидный слой, образующийся, вероятно, в результате взаимодействия липида протеолипосом с плоской подложкой. Скорее всего, различный размер наблюдаемых нанокластеров обусловлен тем, что они являются результатом спонтанной агрегации молекул белка в процессе длительного диализа смеси порин-детергент-фосфолипид.

При использовании прямого метода включения порина в поддерживающий фосфолипидный слой образования больших нанокластеров порина не наблюдалось (см. рис. 1,б и в). Как видно из данных рисунка, на поверхности слюды расположены протяженные области («острова») липидного слоя с отдельными мелкими включениями белка. Темные области, по-видимому, соответствуют частично удаленной под действием детергента липидной подложке. Высота липидного слоя составляет 4-6 нм, что соответствует размерам бислоя фосфолипидов. Размеры липидных «островов» сильно варьируют и в среднем составляют 800 нм. Порины выступают над бислоем в виде нанодоменов высотой 2.5-6.5 нм и диаметром 40-60 нм (см. рис. 1,б).

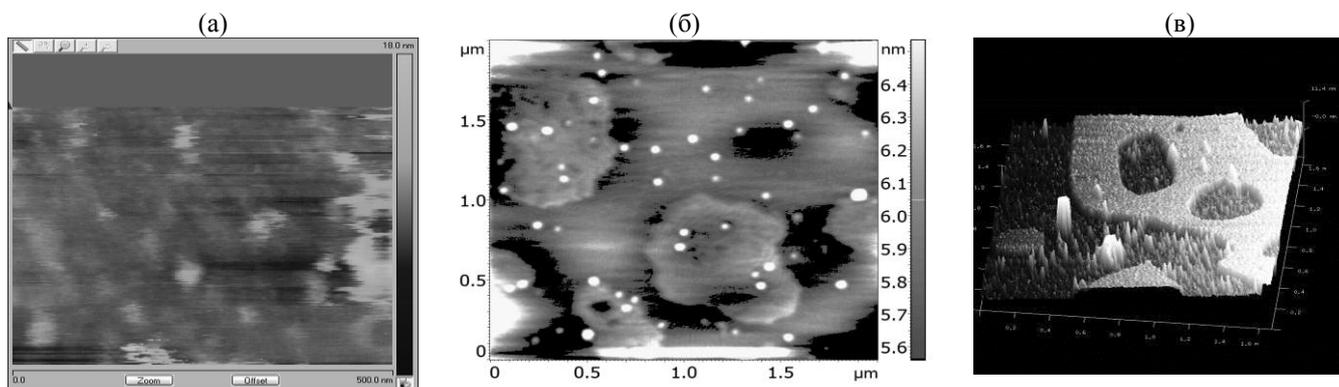


Рисунок 1 – АСМ-изображения наноструктур образца порина П-ОГ, полученных в результате нанесения на слюду: (а) протеолипосом, масштаб 0.5 мкм; (б) порина в поддерживающем фосфолипидном слое, масштаб 2 мкм и (в) его трехмерное изображение, масштаб 1,6 мкм. Сканирование влажного образца проводили на воздухе

В обоих описанных выше экспериментах образцы белка были солюбилизированы в буферах со значением рН, близком к нейтральному (рН 7.5). Оказалось, что в этих условиях в бислой включается относительно небольшое количество порина и, как следствие, по-видимому, не происходит образования протяженных участков 2-D кристаллов поринов.

Как было показано нами ранее, существенное значение для реконструкции порина из *Y. pseudotuberculosis* и проявления его функциональных свойств имеет пространственная структура молекулы порина, которая, может изменяться в зависимости от рН буферного раствора [10]. В связи с этим, следующий этап исследования был посвящен определению оптимальных условий встраивания образца порина в липидный бислой. Для этого был использован метод вытекания флуоресцентной метки из отрицательно заряженных липосом при включении белка. Концентрация флуорофора. КФ внутри липосом в исходной суспензии превышала концентрацию его самотушения. Образование пор в липосомальной мембране при добавлении образца П-ОГ сопровождалось вытеканием флуорофора во внешний раствор и, соответственно, заметным увеличением интенсивности его флуоресценции.

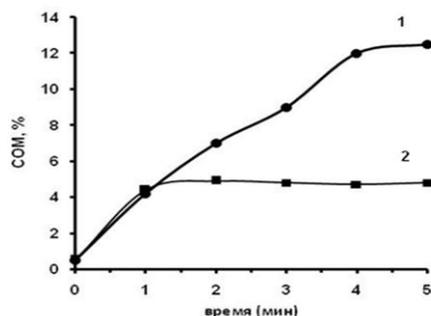


Рисунок 2 – Кинетика освобождения КФ из отрицательно заряженных липосом при добавлении образца порина П-ОГ при различных рН раствора: (1) – рН 5.5; (2) – рН 8.0. Ось ординат СОМ, % – специфическое освобождение КФ

Липосомы, полученные из лецитина, холестерина и ДЦФ, оказались достаточно стабильны к действию буфера, содержащего ОГ, в котором был солюбилизирован порин. Как видно из данных рисунка 2, графики выхода КФ из липосом в присутствии порина в буферах со слабокислым и щелочным значениями рН существенно отличаются. Наиболее эффективное встраивание порина наблюдалось при рН раствора 5.5.

Как известно, в нативной мембране порины существуют в виде комплексов с ЛПС, эти два основных компонента бактериальной мембраны связаны между собой прочной, но нековалентной связью. В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что взаимодействие между ЛПС и порином играет существенную роль в сборке последнего в НМ клетки в процессе биосинтеза [11]. Кроме того, молекулы ЛПС также могут играть важную вспомогательную роль при образовании двумерных кристаллов поринов в искусственном бислое [3]. Для экспериментальной проверки влияния ЛПС на формирование упорядоченных структур порина было использовано несколько образцов белка, отличающихся содержанием ЛПС: (1) изолированный порин, не содержащий ЛПС (П-ОГ); (2) комплекс ПГ-порин с содержанием ЛПС 8 %; (3) ЛПБК с содержанием ЛПС 60 %.

Реконструкцию образца порина П-ОГ в фосфолипидный бислой, с предварительно включенным в него ЛПС, проводили в слабо кислой среде (ацетатный буфер, рН 5.5). АСМ изображения получали в жидкой среде, используя тот же буфер (см. рис. 3). Действительно, как видно из данных рисунка, количество включенного порина в бислой в этих условиях значительно увеличивается по сравнению с реконструкцией порина в

слабощелочной среде. На поверхности бислоя обнаруживаются регулярно расположенные домены порина со средним диаметром 75 нм и высотой 6-10 нм.

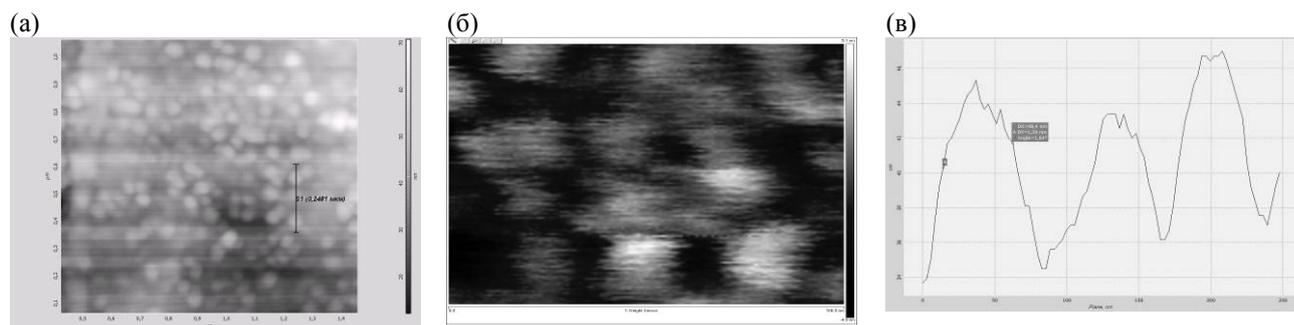


Рисунок 3 – АСМ изображение образца порина П-ОГ в поддерживающем фосфолипидном слое, содержащем ЛПС, при разных масштабах: (а) 1.5 мкм, (б) 0.5 мкм, (в) 0.16; (г) профиль поверхности вдоль линии, показанной на рисунке (а). Сканирование образцов проводили в 0.05 М ацетатном буфере, рН 5.5

На следующем этапе данного исследования в качестве матрицы для образования закрепленного слоя порина был использован ПГ, который является жестким «каркасом» бактериальной мембраны и связан с порином очень прочной связью. Полученное АСМ изображение ПГ-порина представлено на рисунке 4.

Как видно из данных рисунка, поверхность комплекса ПГ-порин представляет собой упорядоченную структуру с набором доменов значительно различающихся по размерам (см. рис. 4,а). Как и в предыдущих экспериментах, смещения объекта на поверхности слюды при сканировании ПГ-порина избежать не удалось, однако положение доменов порина восстанавливалось при сканировании в обратном направлении.

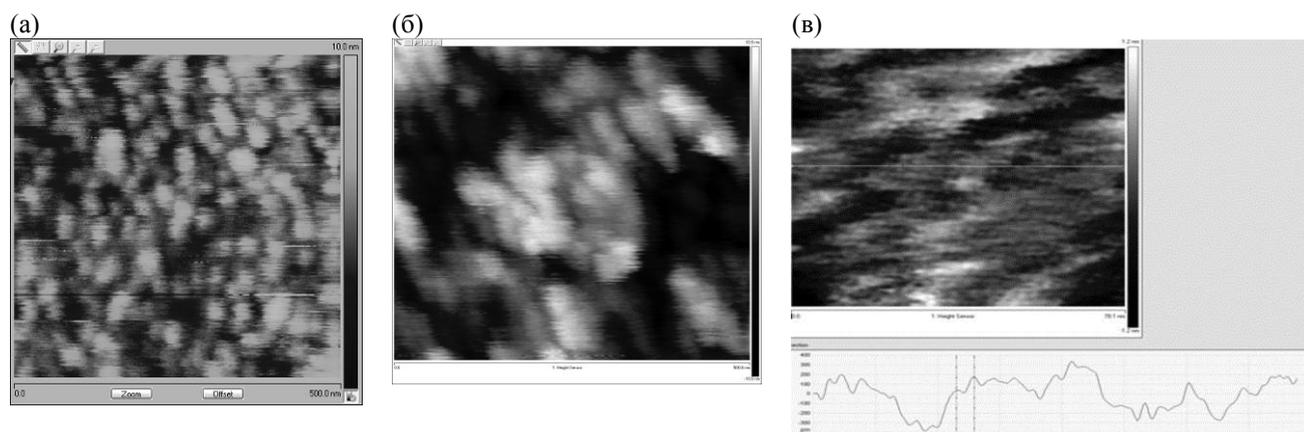


Рисунок 4 – АСМ изображение комплекса ПГ-порин при разных масштабах: (а) 0.55 мкм, (б) 0.19 мкм, (в) 0.078 мкм. Внизу профиль поверхности вдоль линии, показанной на рисунке (в)

И, наконец, при использовании комплекса ЛПС-порин (ЛПБК) для формирования упорядоченной наноструктуры белка на поверхности слюды нам удалось получить набор нанодоменов, значительно более однородных, чем при использовании комплекса ПГ-порин (см. рис. 4). Средний диаметр выявленных объектов составляет 30 нм и высота 8-10 нм (см. рис. 5, а и б).

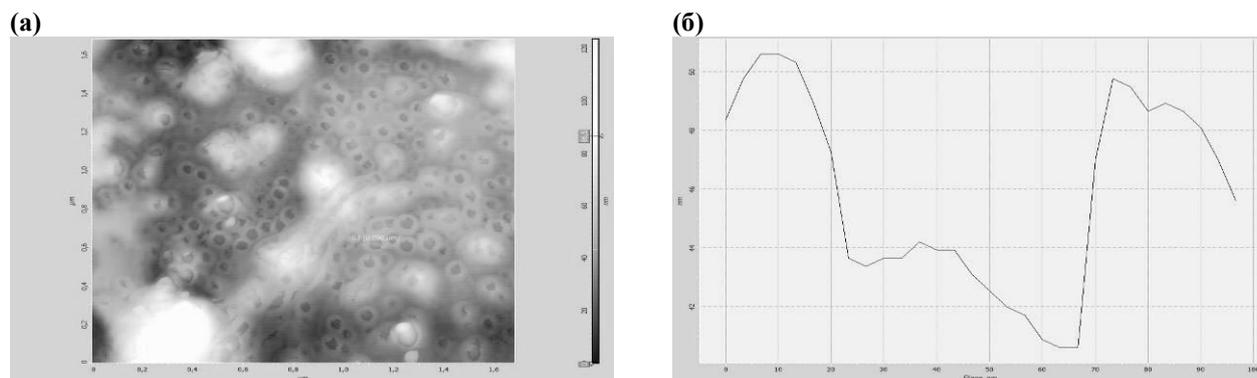


Рисунок 5 – АСМ изображение поверхности образца комплекса ЛПС-порин (ЛПБК): (а) 1.6 мкм; (б) профиль поверхности вдоль линии, показанной на рисунке (а)

В результате проведенных исследований апробированы различные подходы для формирования упорядоченных наноструктур порина из НМ *Y. pseudotuberculosis* в присутствии фосфолипидного бислоя. Анализ морфологии полученных АСМ-изображений показал, что порины встраиваются фосфолипидный бислой с образованием нанодоменов. При этом степень эффективности и размер доменов поринов существенным образом зависят от условий эксперимента. Показано, что эффективным вектором для встраивания порина при слабокислых значениях pH является ЛПС. Обнаружено, что присутствие значительного количества ЛПС (как в случае ЛПБК) приводит к образованию однородных и небольших по размерам наноструктур белка.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта ДВО РАН № 15-1-5-004.

Список литературы / References:

1. Muller D.J., Engel A. Strategies to prepare and characterize native membrane proteins and protein membranes by AFM. *Cur. Opin. Colloid Interface Science*, 2008, vol. 13, pp. 338-350.
2. Hasler L, Heymann J.B., Engel A., Kistler J., Walz T. 2D Crystallization of Membrane Proteins: Rationales and Examples. *J. Struct. Biology*, 1998, vol. 121, pp. 162-171.
3. Wiese A., Schroder G., Brandenburg K., Hirsch A., Welte W., Seydel U. Influence of the lipid matrix on incorporation and function of LPS-free porin from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, vol. 1190, pp. 231-242.
4. Глик Б., Пастернак Д. *Молекулярная биотехнология: Принципы и применение*. М.: Мир, 2002, с. 589. [Glik B., Pasternak D. *Molecular biotechnology. Principles and applications*. Moscow: Mir, 2002, 589 p. (In Rus.)]
5. Новикова О.Д., Вакорина Т.И., Хоменко В.А., Лихацкая Г.Н., Ким Н.Ю., Емельяненко В.И., Кузнецова С.М., Соловьева Т.Ф. Влияние условий культивирования на пространственную структуру и функциональную OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия*, 2008, т. 73, № 2, с. 173-184. [Novikova O.D., Vakorina T.I., Khomenko V.A., Likhatskaya G.N., Kim N.Yu., Emelyanenko V.I., Kuznetsova S.M., Solov'eva T.F. Influence of Cultivation Conditions on Spatial Structure and Functional Activity of OmpF-Like Porin from Outer Membrane of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry*, Moscow, 2008, vol. 73, no. 2, pp. 139-148. (In Rus.)]
6. Todt J.C., Roque W.J., McGroarty E.J. Effects of pH on bacterial porin function. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, pp. 10471-10478.
7. Boivin A., Mesrobian J., Mesrobian L. Techniques pour la preparation des polysaccharides microbiens spécifiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, vol. 113, pp. 490-492.
8. Schabert F. A., Engel A. Reproducible Acquisition of Escherichia coli Porin Surface Topographs by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, 1994, vol. 67, pp. 2394-2403.
9. Milhiet P.-E., Gubellin F., Berquand A., Dosset P., Rigaud J.-L., Grimellec C., Levy D. High-Resolution AFM of Membrane Proteins Directly Incorporated at High Density in Planar Lipid Bilayer. *Biophys. J.*, 2006, vol. 91, pp. 3268-3275.
10. 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., Lukyanov P.A., Likhatskaya G.N., Emelyanenko 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. *Biochemistry, Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, Moscow, 2007, vol. 1, pp 154-162. (In Rus.)]
11. Sen K., Nikaido H. Lipopolysaccharide Structure Required for In Vitro Trimerization of *Escherichia coli* OmpF Porin. *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, pp. 926-928.