Учреждение Российской академии наук Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН Лаборатория биоэлектрохимии

на правах рукописи

КНЯЗЕВ ДЕНИС ГЕННАДЬЕВИЧ

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР НА ПРИМЕРЕ ВИРУСНОГО БЕЛКА М1: ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД.

Специальность 02.00.05 – Электрохимия

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Москва 2008

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Валерий Сергеевич Соколов

Официальные оппоненты:

доктор химических наук Владимир Валентинович Арсланов

доктор физико-математических наук Всеволод Александрович Твердислов

Ведущая организация: Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, МГУ

Защита состоится <u>21</u> октября 2008 года в <u>11</u> час. <u>00</u> мин. на заседании диссертационного совета Д 002.259.03 при Учреждении Российской академии наук Институте физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН по адресу:

119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН.

Автореферат разослан <u>18</u> сентября 2008 года.

Ученый секретарь диссертационного совета кандидат химических наук

Refus

Г. М. Корначева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение. Актуальность исследования. Матриксный белок М1 вируса гриппа, наиболее представленный среди белков вириона, является мембранноассоциированным. Он образует каркас (сеть) внутри липидного бислоя, который обеспечивает механическую прочность вирионов. Белок М1 является ключевым элементом, опосредующим процессы инфицирования клетки вирусом, причем основополагающим является взаимодействие белка с бислойными липидными структурами. В процессе вирусного слияния при понижении pH среды внутри эндосомы происходит транспорт ионов H⁺ через протонные каналы вируса, в результате чего происходит диссоциация белкового каркаса. Экспериментально обоснованного механизма этой диссоциации до сих пор не было предложено. Белок представляет собой небольшую (27.8 кДа, 252 аминокислотных остатка) молекулу, плотно прилегающую к внутренней стороне вирусной мембраны (Ruigrok, R.W., 2007). В ряде работ показано, что белок М1 способен связываться с липидными мембранами (El Karadaghi, S. et al., 1984, Ruigrok, R.W.H. et al., 2000). Однако, не исключено, что при образовании сети должен взаимодействовать также с вирусными трансмембранными OH гликопротеинами.

Согласно данным, полученным методами малоуглового нейтронного микроскопии рассеяния И электронной (Arzt, S. et al., 2001,Schulze, I.T., 1972), мономер M1 имеет форму стержня. Образуемый такими молекулами в вирионе каркас имеет толщину около 60Å, а размер ячейки около 40Å. Структура М- и N-доменов этого белка (остатки 2-158) была успешно определена методом рентгеноструктурного анализа (Baudin, F. et al., 2001, Sha, B.D. and Luo, M., 1997). Однако структура белка, связанного с липидной мембраной, может отличаться

от его структуры в кристалле. Нативный белок имеет еще и С-домен, структура которого установлена, поскольку процессе кристаллизации не В ОН отщепляется. Продолжается активная дискуссия о характере M1-M1 взаимодействий в составе матрикса и взаимодействий белка М1 с вирусной мембраной in situ. Так, в работе (Ruigrok, R.W.H. et al., 2000) утверждалось, что связывание белка с липидной мембраной осуществляется за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных аминокислот М1 с отрицательно заряженными группами мембранных липидов. Однако другие авторы (Sha, B.D. and Luo, M., 1997) говорят о гидрофобных взаимодействиях N-концевого домена белка M1 с вирусной липидной мембраной.

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия матриксного ней белка с липидной поверхностью. В использовались системы, моделирующие липидную поверхность вирусной мембраны. На этих системах оказалось возможным изучить роль электростатических взаимодействий при белка М1 на липидной поверхности путем варьирования адсорбции поверхностного заряда мембраны за счет изменения содержания в ней заряженных липидов, значения рН раствора и его ионной силы.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в изучении особенностей формирования белок-липидных структур при адсорбции матриксного белка М1 на липидную поверхность. Для этого были выбраны такие модельные системы, как бислойная липидная мембрана (БЛМ), липидный моно- и бислои на твердой подложке. В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1) Изучить влияние pH на адсорбцию белка M1 в значимом для вируса гриппа диапазоне pH от 5 до 7;

2) Выяснить эффективность связывания белка М1 с липидом в различных условиях;

3) Оценить толщину слоя адсорбировавшегося белка и уточнить ориентацию молекулы М1 относительно липидного слоя.

Новизна исследования и его научно-прикладное значение.

Использованные в работе оригинальные экспериментальные подходы позволили впервые детально изучить адсорбцию нативного матриксного белка М1 на липидных поверхностях. Исследованы роль электростатических и гидрофобных взаимодействий в адсорбции белка, а также влияние на нее pH в физиологически значимом диапазоне. На основе оценки толщины слоя адсорбированных белков и распределения в нем заряда предложены вероятная ориентация молекулы М1 на поверхности липидного слоя, а также механизм диссоциации белкового каркаса при понижении pH среды.

Практическая значимость работы обусловлена тем, что матриксные белки принимают непосредственное участие в инфицировании клетки оболочечными вирусами, и выяснение механизма их функционирования имеет огромное значение в разработке новых лекарственных препаратов. В частности, в настоящее время ведутся работы над созданием универсальной вакцины от гриппа. В отличие от обычных вакцин, мишенью которых являются трансмембранные гликопротеины, эта вакцина основана на «настраивании» иммунной системы именно на белок М1, который является высоко консервативным во всех штаммах вируса.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на конференциях молодых ученых ИФХЭ РАН (Москва, 2006, 2007), на 8-м международном Фрумкинском симпозиуме «Кинетика электродных процессов» (Москва, 2005), на XX Зимней международной молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2008) и на научных семинарах лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН (Москва, 2004–2007).

Публикации. За время работы над диссертацией опубликована одна статья в отечественном реферируемом журнале и 2 тезиса докладов на международных конференциях.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 90 страницах и иллюстрирована 31 рисунком. Диссертация состоит из введения, трех основных частей (восьми глав, включая обзор литературы) и заключения. Список цитированной литературы содержит 105 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВНИЯ.

Матриксный белок М1 был выделен из вирионов гриппа штамма A/PR/8/34 методом Жирнова (Zhirnov, O.P., 1992). Концентрация белка в растворе определялась количественным аминокислотным анализом на анализаторе Hitachi L-8800 (Япония) в стандартном режиме разделения на катионобменной колонке с детекцией нингидриновым реагентом. Для предотвращения агрегации белка М1 его концентрация в ячейке не превышала $\frac{1}{300} \frac{M \kappa 2}{M \kappa n}$.

Эксперименты, проведенные методом компенсации внутримембранного поля (КВП). Плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ) формировали по методу Мюллера-Рудина из дифитаноилфосфатидилхолина (ДФФХ) и дифитаноилфосфатидилсерина (ДФФС) или из их смеси в мольном отношении 7:3, соответственно.

Разность граничных потенциалов БЛМ измеряли электрохимическим методом компенсации внутримембранного поля с использованием второй гармоники емкостного тока (Соколов, В.С. и др., 1980). Измерение осуществлялось с помощью автоматической установки с использованием фазочувствительного усилителя DSP-7265 (Signal Recovery, США), который

управлялся компьютером через приборный интерфейс GPIB (Measurement Computing, США) с помощью разработанной в лаборатории программы.

Белок добавлялся в отсек с электродом, соединенным со входом Keithley-427 (потенциал этого электрода поддерживался равным нулю), – этот отсек мы будем называть цис-отсеком. Другой отсек с электродом, на который подавалось напряжение, будем называть транс-отсеком.

Эксперименты, проведенные методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Измерения адсорбции белка М1 на липидной поверхности проводились на ППР-рефлектометре Biosuplar-6 (реализация по Кретчману) производства Mivitec (Германия). Добавление белка производилось при непрерывной перфузии через экспериментальную ячейку (объемом 20 мкл) белковой суспензии соответствующей концентрации.

Химическая модификация поверхности производилась по методике, описанной в (Mirsky, V.M. et al., 1999). Монослойное тиольное покрытие формировалось на стеклянной пластине с напыленным слоем золота вариантах. В первом использовался октадекантиол В двух (ОДТ), формирующий гидрофобную поверхность раздела с водным раствором. Поверх тиольной поверхности за счет перфузии ячейки раствором с липосомами формировался липидный монослой, на который и адсорбировался М1. Липосомы формировались либо из смеси ДФФХ и ДФФС в мольном отношении 7:3, либо из азолектина, либо из ДФФХ. Добавление белка производилось при непрерывной перфузии через экспериментальную ячейку объемом 20 мкл белковой суспензии с различной концентрацией белка. Во втором варианте применялся карбоксигексадекантиол (КГДТ), создающий полярную заряженную поверхность, имитирующую липидную. В этом случае адсорбция M1 проводилась непосредственно на слое тиолов, что позволило упростить методику и повысить стабильность данной системы.

Эксперименты, проведенные методом атомной силовой микроскопии (ACM). Атомный силовой микроскоп был представлен контроллером Multimode Nanoscope IV и сканирующей головкой типа E с ячейкой для электрохимических измерений в жидкости. Все перечисленные компоненты были приобретены у Veeco Digital Instruments, США. Данный прибор позволяет получать топограмму поверхности, а также проводить эксперименты по силовой микроскопии. Все опыты осуществлялись при комнатной температуре в жидкости в резонансном режиме. В качестве зондов использовались заостренные кантилеверы из нитрида кремния с номинальной жесткостью 0.6 H/м (Veeco Digital Instruments, США).

Для формирования липидного бислоя на подложке (слюда) использовался т.н. метод разворачивания липосом на поверхности. Были использованы липосомы, сформированные из смеси ДОФХ и ДОФС в молярном отношении 9:1. Для формирования липидного покрытия на свежесколотую слюду (Veeco Digital Instruments, США) добавлялась суспензия липосом. После инкубации в течение 15 минут слюда промывалась буферным раствором. В результате описанной процедуры на ее поверхности формировался липидный бислой. Однородность полученного липидного покрытия контролировалось по топограммам, а о том, что это покрытие представляет собой бислой, свидетельствовала его толщина, оцененная по силовым кривым. Белок в соответствующем буферном растворе добавлялся над липидным бислоем на подложке и инкубировался в течение часа. После этого подложка промывалась чистым буферным раствором и помещалась в измерительную ячейку АСМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Изучение адсорбции белка М1 на БЛМ методом КВП. При изучении адсорбции белка М1 методом КВП мы варьировали следующие параметры:

концентрацию M1 в растворе, значение pH и ионную силу водной среды, липидный состав БЛМ.

Кинетика изменения разности граничных потенциалов БЛМ при введении различных концентраций М1 в водный раствор при рН 5.0 приведена на рис. 1а. В этом и последующих КВП-экспериментах, если это не оговорено особо, БЛМ формировалась из смеси ДФФХ и ДФФС в мольном отношении 7:3. Белок вводился с одной стороны БЛМ. Каждая из представленных на рисунке кривых выходит на насыщение, причем время этого выхода для разных концентраций М1 заметно различается. От концентрации белка в растворе зависело и стационарное значение разности граничных потенциалов БЛМ (в дальнейшем мы будем называть ее потенциалом адсорбции). При этом наблюдалась неаддитивность при последовательных добавках белка в ячейку: если белок при нейтральном рН вводился в раствор не сразу, а в несколько этапов, так чтобы каждое последующее добавление делалось после достижения стационарного потенциала от предыдущего добавления, то потенциал адсорбции оказывался меньше, чем после разовой добавки того же количества белка. Отмывка белка из ячейки с помощью замены раствора не приводила к заметному уменьшению потенциала, что указывает на то, что десорбция белка М1 с поверхности БЛМ или вообще невозможна, или происходит очень медленно. Это позволяет предположить, что матриксный белок способен формировать на поверхности БЛМ сети различной структуры в зависимости от концентрации белка.

Зависимость потенциала адсорбции от pH. Эксперименты, аналогичные приведенному на рис. 1а, проводились при различных значениях pH в физиологически значимом диапазоне от 5 до 7. Было показано, что pH влияет как на кинетику изменения граничного потенциала после добавления M1 в раствор, так и на конечное значение потенциала адсорбции.

На рис. 16 приведена типичная кинетика изменения граничного потенциала при адсорбции М1 при рН 7.0.



Рис. 1. Изменение граничного потенциала при введении М1-белка с цис-стороны БЛМ, сформированной из смеси 70% ДФФХ и 30% ДФФС. Состав водной среды 10 мМ КСl, 0.1 мМ ЕDTA при разных значениях рН. а) В буферном растворе 2 мМ MES, pH 5.0. Концентрация добавленного белка в ячейке 50, 100 и 200 нМ для кривых 1-3, соответственно. б) В буферном растворе 2 мМ НЕРЕS, pH 7.0. Концентрация добавленного белка в ячейке 100 нМ. Стрелкой показано добавление белка.

Из сравнения этой кривой с кривой для соответствующей концентрации М1 при рН 5.0 (рис. 1а) можно заключить, что время выхода кинетических кривых на насыщение при обоих рН приблизительно одинаково (около 150 минут). Однако при рН 7.0 потенциал изменялся во времени немонотонно. В начале записи потенциал становился отрицательным, и только с течением времени он рос, достигая положительных значений. Мы полагаем, что потенциала при рН 7 немонотонное изменение вызвано изменением ориентации молекул белка на поверхности липидной мембраны в процессе формирования сети. Зависимость величины потенциала адсорбции от рН иллюстрирует рис. 2, где приведены значения этого потенциала при трех различных pH: 5.0, 6.0 и 7.0. Видно, что самое сильное влияние pH на потенциал имеет место в диапазоне от 7 до 6. В отдельных экспериментах было показано, что поверхностный заряд БЛМ данного состава при изменении рН от 7.0 до 5.0 практически не меняется. Таким образом, возможной причиной рНзависимости потенциала адсорбции М1 является изменение свойств самого

белка, а не липидного бислоя. В принципе, увеличение потенциала при понижении pH может быть вызвано либо а) увеличением количества молекул белка, адсорбированных на мембране, либо б) изменением заряда или ориентации молекул белка на поверхности мембраны.



Рис. 2. Вверху: Потенциал адсорбции при введении белка (100 нМ), измеренный при разных рН. Состав буферного раствора: 10 мМ KCl, 0.1 мМ EDTA, 2 мМ MES (при рН 5 и 6), 2 мМ HEPES (при рН 7).



Рис. 3. Эксперимент с изменением рН среды до рН 5.0 (стрелка 2 – добавление HCl) при достижении стационарного значения после введения белка (100 нМ) при нейтральном рН (стрелка 1). Состав буферного раствора: 10 мМ KCl, 0.1 мМ EDTA, 2 мМ цитрат.

Был проведен эксперимент, который позволил проверить, какое из двух приведенных выше предположений верно. В нем адсорбция белка М1 сначала проводилась при рН 7, затем, после выхода потенциала адсорбции на стационарное значение, рН среды добавлением кислоты понижался до 5. Сразу же после этого наблюдался быстрый рост граничного потенциала: за 10 минут сигнал вырос на 20 мВ (рис. 3). Рост потенциала происходил значительно быстрее кинетики выхода потенциала на насыщение после добавки М1 в раствор. Этот факт нельзя объяснить вновь начавшейся после уменьшения рН среды адсорбцией белка: за столь малое время могли произойти лишь переориентация белка или изменение его заряда.

Зависимость потенциала адсорбции от ионной силы. Чтобы выяснить, не влияет ли рН на заряд белка, мы оценили величину привнесенного белком заряда на БЛМ, изучая зависимость потенциала адсорбции от ионной силы. Результаты опытов, представленные на рис. 4, были получены по следующей схеме. Сначала на БЛМ адсорбировался белок М1. Адсорбция М1 проводилась при низкой ионной силе (10 мМ KCl) в среде с pH 6.0 или 7.0. Спустя примерно 3 часа с момента добавки M1 пошагово изменялась ионная сила сначала в цисотсеке, а затем в транс-отсеке, не содержащем белка. Запись такого эксперимента при рН 6.0 представлена на рис. 4а. Изменение ионной силы в отсеках начиналось с момента, когда кривая адсорбции М1 выходила на насыщение. Изменение потенциала происходило быстро по сравнению с длительностью адсорбции белка. Так как измерялась разность граничных потенциалов БЛМ, то увеличение ионной силы в разных отсеках давало эффект разного знака. Изменение потенциала при введении KCl в разные отсеки различалось и по абсолютной величине: в цис-отсеке, содержащем белок, изменение потенциала было меньшим по сравнению с транс-отсеком, где белок отсутствовал. Судя по полученным результатам, белок привносит на мембрану небольшой положительный заряд по сравнению с абсолютной величиной исходного отрицательного заряда БЛМ. При этом адсорбция белка не вызывает перезарядку ее поверхности.

Заряд, привнесенный белком на БЛМ, был оценен следующим образом. Используя зависимость изменения граничного потенциала от ионной силы в каждом из двух отсеков, мы определяли величины поверхностного заряда для обеих сторон БЛМ: с адсорбировавшимся белком (цис-сторона) и без него (транс-сторона). Зависимости изменения граничного потенциала от ионной силы в соответствующем отсеке (рис. 4а) были перестроены следующим Значение каждой KCl образом. потенциала для концентрации В соответствующем отсеке было получено путем сложения эффектов от всех предыдущих добавок соли в этот отсек (рис. 46) в предположении, что

изменения граничных потенциалов от каждого из монослоев с обеих сторон БЛМ были независимыми друг от друга. Нулевые уровни для каждой зависимости соответствуют исходной разности граничных потенциалов в фоновом электролите (10 мМ KCl) перед повышением его ионной силы. Расчет поверхностного заряда производился в рамках модели Гуи-Чепмена по формуле, описывающей разность поверхностных потенциалов, соответствующих начальному (в растворе 10 мМ KCl) и конечному (после увеличения ионной силы) состояниям, как и в работе (Соколов, В.С. и др., 1980):

$$\Delta \varphi = \frac{2RT}{F} \cdot \ln \frac{a_2 + \sqrt{a_2^2 + 1}}{a_1 + \sqrt{a_1^2 + 1}} \tag{1}$$

где $a_i = \frac{\sigma}{\sqrt{8\epsilon RTc_i}}$, σ – поверхностный заряд монослоя со стороны цис- или

транс-отсека, ε – абсолютная диэлектрическая проницаемость среды, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, F – постоянная Фарадея, c_i – концентрация KCl. Индекс 1 относится к начальному состоянию, когда концентрация соли составляла 10 мМ, индекс 2 – к раствору после добавки KCl (с концентрацией 30 мМ, 60 мМ или 120 мМ). Теоретическая кривая для каждого из отсеков проводилась по экспериментальным точкам методом наименьших квадратов, где свободным параметром был поверхностный заряд σ.

Аналогичным образом определялись значения поверхностных зарядов при pH 7.0 (данные не приведены). Рассчитанные по уравнению (1) значения поверхностных зарядов БЛМ со стороны транс-отсека при двух значениях pH оказались близкими: $\sigma_{pH6} = 2 \pm 0.1 \cdot m\kappa K \pi / cm^2$, $\sigma_{pH7} = 2.3 \pm 0.1 \cdot m\kappa K \pi / cm^2$. Они хорошо согласуются с результатом измерения электрофоретической подвижности липосом из тех же липидов: $\sigma_{pH7} = 2.1 \pm 0.1 \cdot m\kappa K \pi / cm^2$. Значение привносимого белком на поверхность положительного заряда находится как

разность между полученными значениями σ для каждого из монослоев при соответствующем pH. Этот заряд при pH 6.0 ($\Delta \sigma_{pH6} = 1.6 \pm 0.1 \cdot M\kappa K\pi / cm^2$) оказался примерно в 3 раза выше, чем при pH 7.0 ($\Delta \sigma_{pH7} = 0.5 \pm 0.1 \cdot M\kappa K\pi / cm^2$).



Рис. 4. а) Последовательное увеличение ионной силы водного раствора в ячейке после достижения стационарного значения потенциала в присутствии белка (100 нМ), добавленного в начальный момент времени. Исходная концентрация КСІ в ячейке 10 мМ. Добавление 2 М раствора КСІ производилось с цис-стороны БЛМ (широкие стрелки вверх) и транс-стороны БЛМ (тонкие стрелки вниз) до концентрации 30, 60 и 120 мМ для стрелок 1-3, соответственно. Исходный буферный раствор 10 мМ КСІ, 0.1 мМ ЕDTA, 2 мМ МЕЅ, рН 6.0. б). Приращение граничного потенциала в эксперименте, приведенном на рис. ба в зависимости от концентрации КСІ в цис-отсеке ячейки (темные точки) и в транс-отсеке (светлые точки). Теоретические кривые построены по уравнению (1) при значении плотности поверхностного заряда, равном σ = 0.4±0.03 · мкКл/см² и σ = 2±0.1 · мкКл/см² для цис- и трас-стороны БЛМ, соответственно.

На основании известного аминокислотного состава белка можно показать, что полученное выше изменение величины привнесенного заряда в зависимости от pH коррелирует с изменением суммарного заряда всей молекулы M1. Оценка заряда проводилась в предположении, что значения pK_a боковых групп аминокислот в полипептидной цепи не отличаются от соответствующих pK_a одиночных аминокислот в растворе (Saggerson, D., 1988). В рассматриваемом диапазоне pH основной вклад в изменение заряда белковой молекулы будут вносить такие аминокислоты, как гистидин, аспарагин, глутамин. Расчет показал, что заряд матриксного белка при pH 7.0 составляет +8, а при pH 5.0 и 6.0 – +16,2 и +11.3 ед. элементарного заряда соответственно. При этом основной вклад в положительный заряд белковой молекулы вносит С-домен. Обычно считают, что С-домен в вирусе обращен в водный раствор и взаимодействует с рибонуклеопротеиновыми (РНП) комплексами вириона. Однако, на плоской БЛМ, в отсутствие РНП, ориентация С-домена может отличаться от таковой на мембране вириона. Так, в нашей модельной системе при закислении среды не исключено такое изменение ориентации С-домена относительно мембраны, что отрицательный заряд липидов будет компенсироваться положительным зарядом и этого домена.

Различие в оценках, полученных выше по результатам измерения зависимости граничного потенциала от ионной силы раствора (рис. 4) и по аминокислотному составу, не столь велико. Оно может быть объяснено тем, что размеры белка сопоставимы с толщиной диффузной части двойного электрического слоя, и на потенциал адсорбции наибольшее влияние оказывают не все заряженные участки М1, а только находящиеся в непосредственной близости от поверхности мембраны. Возможно, такими участками в домене, ответственном за взаимодействие с БЛМ (N-домене), являются положительно заряженные α-спирали остатков 108-117 и 89-104, поскольку они несут на себе большой положительный заряд.

Чтобы изучить влияние ионной силы на потенциал адсорбции белка в более широком диапазоне, мы изменили предыдущий эксперимент и варьировали концентрацию KCl до введения белка. В экспериментах, результаты которых представлены на рис. 5, M1 адсорбировался на БЛМ, сформированной из ДФФС, в водной среде с концентрацией KCl 10 мМ, 100 мМ, 500 мМ и 1000 мМ при рН 7.0. Потенциал адсорбции был положительным и составил 22 и 14 мВ при концентрации KCl 10 и 100 мМ, соответственно. При дальнейшем увеличении концентрации потенциал практически не менялся. Это

может свидетельствовать о том, что при адсорбции белка меняется не только поверхностная, но и дипольная компонента граничного потенциала.



Рис. 5. Значения потенциала адсорбции белка (100 нМ) на отрицательно заряженной БЛМ, сформированной из ДФФС, измеренные при разной ионной силе раствора. Состав исходного буферного раствора: 2 мМ HEPES, pH 7 и указанная на оси абсцисс концентрация KCl.

Зависимость потенциала адсорбции от состава БЛМ. Потенциалы адсорбции белка на мембранах, сформированных из смеси ДФФХ и ДФФС в мольном отношении 7:3, либо только из ДФФХ, представлены на рис. 6. Видно, что в присутствии отрицательно заряженного липида потенциал адсорбции существенно выше как при рН 5.0, так и при рН 7.0. Значения потенциалов адсорбции при рН 5.0 на отрицательно заряженной и нейтральной мембране составили 31 мВ и 14 мВ, соответственно. В экспериментах по адсорбции М1 на БЛМ разного состава была отмечена следующая особенность: форма кинетической кривой, а именно, наличие или отсутствие немонотонной кинетики изменения потенциала, определяется не только рН водного раствора, но и наличием в БЛМ отрицательно заряженного липида. При концентрации М1 100 нМ падение потенциала на начальном этапе адсорбции (аналогичное представленному на рис. 16) на нейтральных БЛМ (ДФФХ) наблюдалось как при низком, так и при нейтральном значениях pH, и, напротив, это падение отсутствовало при обоих pH в случае отрицательно заряженной БЛМ (ДФФС). Ряд контрольных экспериментов, которые были проведены на БЛМ из диолеоилфосфатидилсерина и диолеоилфосфатидилхолина показали, что потенциал оставался прежним, когда фитановые углеводородные цепи липидов заменялись на олеиновые. Это означает, что на адсорбцию белка влияют не углеводородные цепи липидов, а их полярные группы.



Рис 6. Потенциал адсорбции белка (100 нМ) на нейтральной БЛМ из ДФФХ (А), и отрицательно заряженной БЛМ из 70% ДФФХ и 30% ДФФС (Б). Состав исходного буферного раствора: 100 мМ KCl и 2 мМ HEPES, pH 7 (темные колонки), либо 2 мМ MES, pH 5 (заштрихованные колонки).

В литературе обсуждался вопрос, способен ли белок М1 встраиваться в липидный бислой (Sha, B.D. and Luo, M., 1997). Пытаясь ответить на него, мы измеряли проводимость БЛМ при адсорбции на ней белка М1. Если бы белок встраивался в мембрану, это должно было приводить к увеличению ее электропроводности. Однако, во всем диапазоне концентраций белка М1 в растворе увеличения проводимости БЛМ не наблюдалось. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что белок М1 не встраивается в липидную мембрану. Такой же вывод был сделан на основе данных, полученных методом электронной микроскопии, согласно которым белок расположен вне липидного бислоя (Wrigley, N.G., 1979).

Изучение адсорбции белка М1 на липидном монослое на подложке методом IIIIP. Этот метод позволяет получить толщину слоя адсорбировавшегося белка в случае, когда этот слой можно аппроксимировать сплошной пленкой. Приведенная ниже оценка проводилась по результатам серии экспериментов по адсорбции белка М1 на ОДКТ (рис. 7). Приведенные графики представляют собой изменение эффективного показателя преломления среды над пластиной в относительных единицах, в зависимости от концентрации белка в растворе при двух значениях ионной силы. Видно, что кривые выходят на насыщение. Толщина адсорбировавшегося слоя М1 была рассчитана в предположении, что данное насыщение соответствует полному заполнению поверхности белком. Это предположение подтверждается результатами ACM-экспериментов, которые будут приведены ниже. Сигнал ППР с хорошей точностью можно считать пропорциональным показателю преломления среды над пластиной (Jung, L.S. et al., 1998):

$$R = m(n_{eff} - n_s) \tag{2},$$

где R – сигнал ППР (ответ на изменение показателя преломления приповерхностной области), n_{eff} – эффективный показатель преломления среды над пластиной, n_s –показатель преломления раствора над адсорбировавшейся пленкой, т – коэффициент пропорциональности. Величина R берется на уровне выхода кинетической кривой на насыщение.

Поскольку заполнение поверхности полное, мы можем записать n_{eff} как:

$$n_{eff} = \frac{2}{l_d} \int_0^\infty n(z) e^{-\frac{2z}{l_d}} dz = \frac{2}{l_d} \left[\int_0^d n_a e^{-\frac{2z}{l_d}} dz + \int_d^\infty n_s e^{-\frac{2z}{l_d}} dz \right] = \left(1 - e^{-\frac{2d}{l_d}} \right) \cdot \left(n_a - n_s \right) + n_s$$
(3),

где d – толщина адсорбировавшегося слоя, l_d – характерная длина затухания электромагнитного поля, которая по грубой оценке составляет 37 ±

13% от длины волны падающего света (в нашем случае $l_d \approx 240$ нм), z – координата по оси, перпендикулярной плоскости пластины и направленной от металла в раствор, n(z) – показатель преломления как функция z. Нормировочный множитель $\frac{2}{l_d}$ находится из условия n(0)=n_a.



Рис. 7. Концентрационная зависимость адсорбции М1 на поверхности, сформированной из отрицательно заряженного тиола (КГДТ). Кружки соответствуют экспериментам с 10 мМ KCl, звездочки – 100 мМ KCl. Буферный раствор: 2 мМ HEPES, pH 7. По оси ординат отложен сигнал ППР в относительных единицах.

Таким образом, комбинируя (2) и (3), а затем логарифмируя получившееся уравнение, получаем:

$$d = -\frac{l_d}{2}\ln(1 - \frac{R}{R_{\text{max}}})$$
(4),

где $R_{\text{max}} = m(n_a - n_s)$. Иными словами, R_{max} соответствует сигналу ППР для гипотетического случая бесконечно толстого белкового слоя (d>>l_d).

В нашем случае, когда сигнал R много меньше R_{max} , формула (3) переходит

В

$$d = \frac{l_d}{2} \frac{R}{R_{\text{max}}}$$
(5)

По данным, приведенным на рис. 7, $\frac{R}{R_{max}} = \frac{n}{n_{max}} = 0,048$. Здесь R_{max} определялся по известному из литературы значению показателя преломления белка (n_p) с массой 28 кДа (Voros, J., 2004), равному 1,48: $n_{max} = n_p - n_s$, где $n_s = 1,33$ (показатель преломления водного раствора). Оценка толщины слоя белка по формуле (5) дала значение d = 6,3 ± 0,6 нм. По данным рентгеноструктурного анализа матриксный белок можно аппроксимировать параллелепипедом с размерами $3 \times 4 \times 6$ нм. Полученные результаты позволяют конкретизировать ориентацию белка относительно липидной поверхности, а именно, полагать, что «стержень» М1 расположен перпендикулярно мембране. Наши данные хорошо согласуются с данными, полученными в (Schulze, I.T., 1972), где при помощи криоэлектронной микроскопии было показано, что толщина M1-каркаса в вирионе составляет 6 нм.



Рис. 8. Адсорбция белка М1 на отрицательно заряженной липидной поверхности (70% ДФФХ и 30% ДФФС). Буферный раствор: 10 мМ КСl, 2 мМ НЕРЕS, pH 7. По оси ординат отложен сигнал ППР в относительных единицах. Первая стрелка показывает начало перфузии ячейки раствором, содержащим М1 в концентрации 500 нМ. Стрелки со знаком "||" указывают на момент остановки перфузии ячейки белковым раствором, со знаком "▷" – на момент возобновления перфузии. Последняя стрелка указывает на момент начала перфузии ячейки буферным раствором, не содержащим белка (в течение 1 часа). Для того, чтобы подтвердить полученный методом КВП результат о необратимости адсорбции белка М1 на липидном бислое, после выхода адсорбционной кривой на стационарное значение производилась перфузия ячейки буферным раствором, не содержащим белка (рис. 8). Видно, что сигнал при этом практически не изменялся, а следовательно, десорбции белка не происходило.

Изучение адсорбции белка М1 на липидном бислое на подложке методом АСМ. Белок М1 в исходной объемной концентрации 2 мкМ адсорбировался на бислойным поверхность с липидным покрытием. Топограмма такой поверхности с адсорбировавшимся белком при значении рН водной среды 7 приведена на рис. 9, слева. Состав буферного раствора 100 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ HEPES. Видно, что белок образует сплошную сеть на липидном бислое. Темные круглые участки – дефекты в липидном покрытии. Эти данные, как и представленные выше, показывают, что матриксный белок образует самоорганизующиеся структуры на плоском липидном бислое. Результат понижения значения pH среды до 5 приведен на рис. 9, справа: целостность слоя адсорбировавшегося белка в этом случае была нарушена.

Силовые кривые, снятые для каждого из случаев (данные не приведены), показывают, что упругие свойства системы адсорбировавшийся белоклипидный бислой заметно изменяются при изменении pH. А именно, в случае целой белковой сети (pH 7) система состоит из двух сред с различными упругими свойствами: липидного бислоя и слоя адсорбированного белка. Когда белковая сеть разрушена (pH 5), система ведет себя как однородная, а именно, ее упругие свойства определяются только липидным бислоем.

В измерениях методом сканирующей зондовой микроскопии информативной величиной является перепад высот, а не их абсолютное значение, т.к. за базовый уровень на топограмме принимается самая низкая точка на площадке сканирования, которой может оказаться дефект в липидном

покрытии или иная неровность, например, дефект слюды. Поэтому толщину слоя белка М1 на липидной поверхности с большей точностью удалось определить при адсорбции белка в кислой среде, т.к. в этом случае лучше видна поверхность липидного бислоя. Определенная таким образом толщина белкового слоя составила 6±1 нм, что согласуется с полученным ранее методом ППР результатом.



Рис. 9. Топограмма липидного бислоя состава 10% ДОФС и 90% ДОФХ с адсорбировавшимся белком М1 в буферном растворе со значением рН 7 (2 мМ НЕРЕЅ, рисунок слева) и после замены буферного раствора на буферный раствор со значением рН 5 (2 мМ MES, рисунок справа). Состав водной среды: 100 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂. Справа от каждой топограммы приведены шкалы высот. Приведенный масштабный отрезок соответствует 200 нм. Исходная концентрация белка в растворе 2 мкМ.

выводы

- 1. Показано, что белок М1 способен адсорбироваться на липидных поверхностях. Это свидетельствует о том, что наличие трансмембранных гликопротеинов для сборки белкового каркаса не является необходимым.
- Полученные результаты свидетельствуют, что белок М1 при адсорбции на липидной поверхности может образовывать сеть, структура которой зависит от pH раствора и объемной концентрации белка.

- Электрохимическим методом компенсации внутримембранного поля было показано, что при адсорбции белка М1 на липидную поверхность привносится положительный заряд, значение которого возрастает при понижении значения pH среды.
- 4. Результаты экспериментов по атомной силовой микроскопии свидетельствуют, что понижение значения pH приводит к разрушению белковой сети на липидной поверхности. Предложен возможный механизм дестабилизации сети – электростатическое отталкивание мономеров вследствие возрастания их заряда (см. п.3).
- 5. Перфузия ячейки с адсорбировавшимся на поверхности белком М1 буферным раствором в экспериментах по спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса не приводила к его десорбции. Таким образом, было показано, что адсорбция матриксного белка на липидной поверхности необратима.
- 6. Показано, что регистрируемые в экспериментах сигналы, связанные с адсорбцией М1, значительно возрастают в случае, если поверхность отрицательно заряжена. Тем не менее, на нейтральной поверхности адсорбция тоже происходит. Это свидетельствует о том, что в процессе адсорбции существенны как кулоновское взаимодействие разноименно заряженных липидов и белка, так и взаимодействие белка с нейтральными липидами, возможно, гидрофобное.
- 7. Двумя независимыми методами спектроскопией поверхностного плазмонного резонанса и атомной силовой микроскопией – была определена толщина слоя адсорбировавшегося белка, которая составила около 6 нм. Это позволило предложить ориентацию адсорбированных молекул белка, в которой стержневидная молекула белка расположена перпендикулярно липидной поверхности.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

- Князев Д.Г., Радюхин В.А., Соколов В.С. Изучение межмолекулярных взаимодействий белков М1 вируса гриппа на поверхности модельной липидной мембраны методом компенсации внутримембранного поля // Биологические мембраны.- 2008.- Т.25.- №6.- С.491-500.
- Knyazev D.G., Maksaev G.I. Research on virus matrix protein M1-bilayer lipid membrane interaction // Abstracts of VIII International Frumkin Symposium "Kinetics of electrode processes".- Moscow, 2005.- P.205.
- Князев Д.Г., Батищев О.В., Соколов В.С. Изучение взаимодействия матриксного белка вируса гриппа М1 с липидным слоем // Сб. Тезисы докладов XX зимней международной молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии».- Москва, 2008.- С.57.