

УДК 578.086

ОБРАЗОВАНИЕ КВАЗИКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОСТРУКТУР ИЗ АТФ-СИНТЕТАЗНОГО БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА, ВКЛЮЧЕННОГО В МЕМБРАНУ ПРОТЕОЛИПОСОМ

© 2000 г. О. И. Киселёва*, И. В. Яминский*, Л. С. Ягужинский**, М. Ф. Янюшин***, G. Büeldt****

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119899 Москва, Воробьевы горы;
Центр перспективных технологий
103009 Москва, Б. Никитская 24-7,

**Институт физикохимической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова
119899 Москва, Воробьевы горы;

***Институт фундаментальных проблем РАН
142292 Московская обл., г. Пущино;

****Institute für Biologische Strukturforchung
Juelich, Germany

Поступила в редакцию 10.07.98 г.

Методом атомно-силовой микроскопии зарегистрировано спонтанное образование нескольких типов квазикристаллических наноструктур из высокоочищенного АТФ-синтеазного белкового комплекса F_1F_0 . Постулировано, что первой стадией их образования из протеолипосом является агрегация последних в крупные комплексы, спонтанная перестройка которых приводит, в зависимости от условий, к формированию структуры одного из трех типов. Трехмерные структуры были получены непосредственно из раствора белка в водном растворе неионогенного поверхностно-активного вещества, в отсутствие липида.

ВВЕДЕНИЕ

В состав бислоевых фосфолипидных, а также протеолипидных мембран (липосом) в качестве существенной компоненты входит связанная вода. В данной работе проведено систематическое исследование структурных превращений, происходящих при медленном удалении воды из протеолипосом, содержащих АТФ-синтеазный белковый комплекс F_1F_0 , выделенный из термофильных бактерий *Chlorophlexus aurantiacus*. Удаление воды, нарушающее стабильность фосфолипидного бислоя, должно приводить к изменению белок-липидных и белок-белковых взаимодействий в составе мембран. В широком смысле цель работы – продемонстрировать роль воды в стабилизации белок-липидных взаимодействий в протеолипосомах.

Для визуализации возникающих структур мы использовали атомно-силовой микроскоп (АСМ) [1, 2] – новый перспективный инструмент неразрушающего исследования поверхности. Ранее методом атомно-силовой микроскопии уже были получены изображения отдельных молекул АТФ-синтеазы [3]. Подробнее этот метод и последние достижения в области исследования с его помощью различных белков и белок-мембранных комплексов описаны в обзоре [4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Жидкие фосфолипидные мембраны при температуре выше температуры фазового перехода плавления ($t_{пл}$) обладают низкой вязкостью, что существенно осложняет наблюдение их в АСМ. При этом точки фазового перехода для бислоев большинства природных фосфолипидов лежат вблизи 20°C. Удовлетворительные результаты удалось получить в условиях, когда образцы приготавливали в дистиллированной воде с рН 6.7–7.0 при температуре 4–8°C. Затем, в процессе наблюдения в АСМ при 20°C белково-мембранные структуры сохраняли достаточную вязкость в течение 20–40 мин.

Приготовление протеолипосом, содержащих высокоочищенный белковый комплекс АТФ-синтеазы F_1F_0 из мембран *Chlorophlexus aurantiacus*, подробно описано в [5]. Их получали путем 80-кратного разбавления водной дисперсии смешанных мицелл, имеющих состав (в мг на 1 мл дисперсии): липид–октилглюкозид–белок (F_1F_0) – 10 : 20 : 0.5(2). Через 30 мин образовавшиеся липосомы с молекулярной массой ≥ 100 кД концентрировали на мембране “Миллипор” в 30–40 раз. Липосомы без белка получали аналогичным образом.

Каплю суспензии липосом в воде, не содержащей дополнительных ионов, наносили на свежесколотую, охлажденную до 4°C поверхность высокоориентированного пиролитического графита. Образец помещали в закрытую чашку Петри, на дне которой находилась большая (0.3 мл) капля воды, и ставили в холодильник на 4–24 ч. Затем поверхность несколько раз промывали охлажденной дистиллированной водой для удаления избытка несвязавшегося материала. Перед наблюдением в АСМ избыток воды удаляли, а образец подсушивали в открытой посуде на льду. АСМ-изображения получали при начальной температуре образца 4–8°C и 70–90%-ной относительной влажности.

Разработанная методика позволяет детально изучать процессы, протекающие при взаимодействии протеолипосом с гидрофобной поверхностью графита в условиях медленного испарения воды.

В основе работы атомно-силового микроскопа лежит измерение силы взаимодействия между точечным острием зонда и исследуемой поверхностью. Острие расположено на конце микроконсоли (кантилевера). Когда острие приближается к поверхности, между ними возникает сила взаимодействия и кантилевер отклоняется на пропорциональную ей величину. Сила взаимодействия зависит от свойств поверхности образца и расстояния между ней и зондом. Для измерения величины отклонения кантилевера используется оптическое детектирование.

В зависимости от того, является ли контакт между зондом АСМ и образцом постоянным или прерывистым, различают контактный режим и режим прерывистого контакта. В настоящей работе все изображения получены в контактном режиме, который может быть реализован в двух вариантах. 1. В топографическом режиме система обратной связи поддерживает постоянным вертикальное отклонение кантилевера, а значит и сила взаимодействия зонда с образцом остается постоянной. Таким образом, при сканировании острие описывает контуры исследуемой поверхности, а по данным сигнала обратной связи компьютер восстанавливает исходную топографию. 2. В режиме силы трения вместо вертикального отклонения кантилевера регистрируется его торсионное (крутильное) смещение, пропорциональное силе трения между зондом и исследуемой поверхностью.

Эксперименты проводили на атомно-силовом микроскопе Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) с D-сканером (поле обзора 14 × 14 мкм²). Использовались коммерческие кантилеверы из кремния с константой механической жесткости 0.06 Н/м (Nanoprobe™, Digital Instruments, Santa Barbara, USA). Острие кантилеве-

ра представляет собой кристалл Si₃N₄ в форме пирамиды с углами при вершине 35° и 45°; радиус закругления острия не превышает 10 нм. Для обработки изображений, их графического представления и построения сечений использовали программу ФемтоСкан-001 [6]. На сечениях указано расстояние в нанометрах между вертикальными линиями.

Специфика исследуемого объекта заключается в том, что высота гигантских агрегатов протеолипосом более чем на порядок превышает вертикальный масштаб деталей рельефа их поверхности. В связи с этим в топографическом режиме очень сложно в общей вертикальной шкале показать всю структуру целиком и детали рельефа поверхности. Поэтому в целях наглядности для некоторых образцов приведены АСМ-изображения, полученные в режиме силы трения. В ряде случаев к топографическим изображениям применяли так называемую боковую подсветку ФемтоСкан-001. Все указанные высоты измерены по топографическим изображениям. Из-за большой высоты исследуемых объектов (0.3–0.5 мкм) на их краях сильно сказывается влияние формы острия кантилевера, поэтому изображение краев квазикристаллов нельзя считать истинным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным [7], исходные липосомы в суспензии имеют диаметр 80–200 нм. Протеолипосомы такого размера действительно удалось наблюдать в условиях нашего эксперимента (частичное удаление воды) в том случае, когда они были получены из высокоплавкого липидного экстракта мембран *Chlorophlexus aurantiacus* с температурой фазового перехода около 45°C (рис. 1).

Протеолипосомы из природного лецитина (температура фазового перехода 20–23°C) в использованных экспериментальных условиях четко зарегистрировать не удается. В то же время наблюдаются “продукты” их трансформации, часто имеющие размеры 0.7–1.5 мкм. Это позволяет предположить существование стадии агрегации протеолипосом [8, 9]. Необходимо подчеркнуть, что гидрофобная поверхность подложки, используемой в АСМ-экспериментах, играет существенную роль в этих превращениях. Полученные результаты позволяют выделить два основных пути трансформации предполагаемых агрегатов протеолипосом, которые демонстрируют ослабление белок-липидных взаимодействий в составе протеолипосом в условиях частичной дегидратации последних.

Первый путь – пространственное разделение белка и липида. Это – “вытекание” липида на поверхность графита и агрегация белка, оставшего-

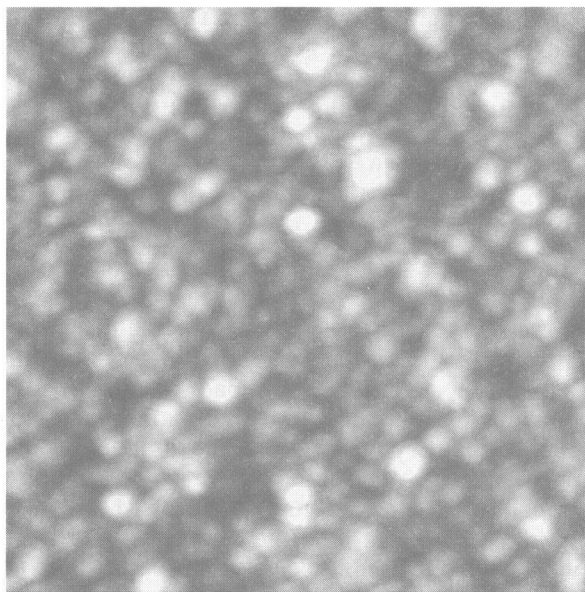


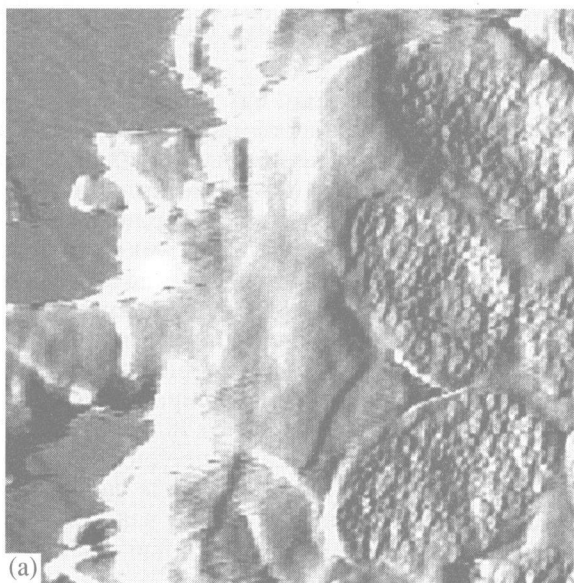
Рис. 1. Протеолипосомы из высокоплавкого липида ($t_{пл} = 45^\circ\text{C}$), содержащие АТФ-синтетазный комплекс F_1F_0 , выделенный из термофильных бактерий *Clostrorhlexus aurantiacus*. Соотношение белок : липид равно 1 : 20. Размер кадра $3.5 \times 3.5 \text{ мкм}^2$. АСМ-изображение получено в топографическом режиме.

ся на месте распавшихся кластеров (рис. 2а) с образованием тетрамеров. Тетрамерные кластеры ориентированы одинаково и состоят из 4 субъединиц. Мы предполагаем, что каждая из них является белковым комплексом F_1F_0 , возможно, в липидном окружении (рис. 2б). Расстояние между центрами соседних субъединиц тетрамера превы-

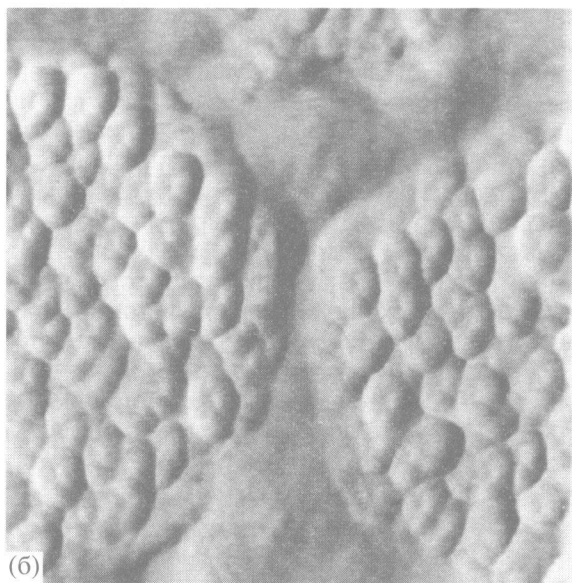
шает диаметр отдельной молекулы F_1F_0 и равно 25 нм.

Второй путь трансформации агрегатов протеолипосом наблюдается при более высоких температурах, увеличении продолжительности эксперимента или частичной экстракции органическим растворителем частично дегидратированных протеолипосом. При этом удается наблюдать три типа структур, образованных комплексом F_1F_0 .

Белковые кластеры типа “цепочка”. Если дегидратацию суспензии протеолипосом с весовым соотношением белок : липид, равным 1 : 20, проводить в течение трех суток при температуре 15–18°C, на поверхности графита образуются одномерные белковые кластеры типа “цепочка” (рис. 3). При этом на поверхности одновременно формируется липидный бислой толщиной 7 нм. Белковые молекулы плотно упакованы в цепочки, причем цепочки, расположенные рядом, ориентированы параллельно друг другу. В некоторых местах наблюдается объединение соседних цепочек с образованием двумерных структур. Высота выступающей над липидным бислоем части белковых молекул составляет 6–7 нм, а диаметр отдельной цепочки, измеренный на половине высоты выступающей части, равен 25 нм (рис. 3, сечение (б)). Разрешение, достигаемое на АСМ-изображениях, позволяет видеть, что цепочки состоят из отдельных глобул, выстроенных в ряд. Расстояние между центрами соседних глобул составляет 17–18 нм (рис. 3, сечение (а)). Измеренный таким образом диаметр цепочки оказывается завышенным из-за практически неизбежного в зондовой микроскопии эффекта уширения, вы-



(а)



(б)

Рис. 2. Образование тетрамеров АТФ-синтетазного комплекса F_1F_0 после “вытекания” липида на поверхность графита: (а) – общий вид, (б) – тетрамеры. Размер кадра: (а) – $2.8 \times 2.8 \text{ мкм}^2$ (б) – $270 \times 270 \text{ нм}^2$. К топографическим АСМ-изображениям применена боковая подсветка.

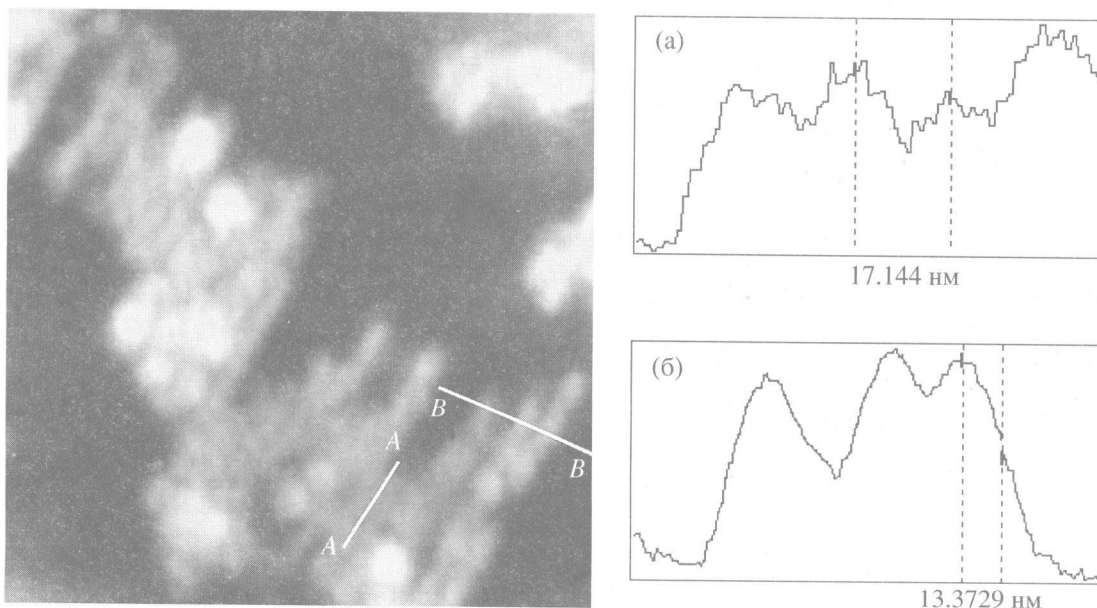


Рис. 3. АСМ-изображение (в топографическом режиме) кластеров АТФ-синтетазного комплекса F_1F_0 типа “цепочка” на поверхности липидного бислоя на графите. Размер кадра – $600 \times 600 \text{ нм}^2$. На сечениях вертикальной и горизонтальной осей соответствуют высота и протяженность объекта. Сечение (а) выполнено вдоль цепочки по линии А–А; расстояние между центрами соседних молекул F_1F_0 – 17 нм. Сечение (б) сделано перпендикулярно цепочкам по линии В–В; высота части белковых молекул, выступающей над бислоем – 7 нм, измеренный диаметр на половине высоты выступающей части – 25 нм.

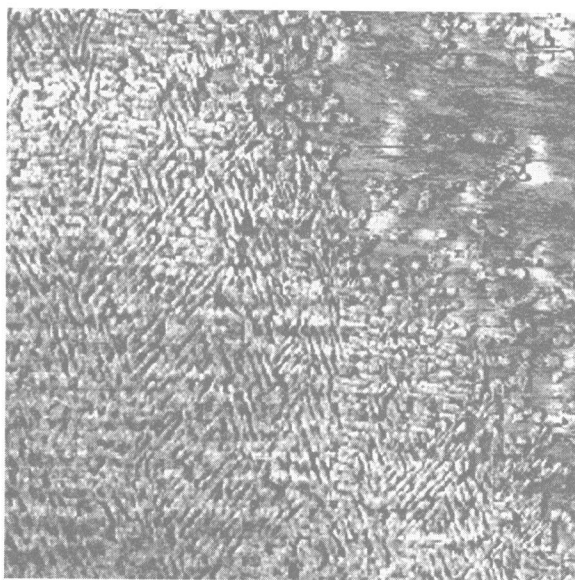


Рис. 4. АСМ-изображение стержнеобразных липид-белковых кластеров на поверхности графита, полученное в режиме силы трения. Размер кадра $5.2 \times 5.2 \text{ мкм}^2$. Толщина кластеров составляет 40–50 нм, их высота – 14 нм. Размеры вычислены по соответствующим изображениям, полученным в топографическом режиме.

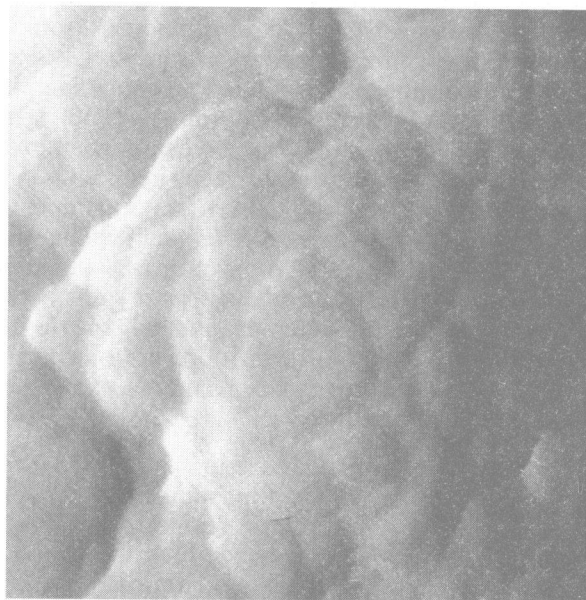
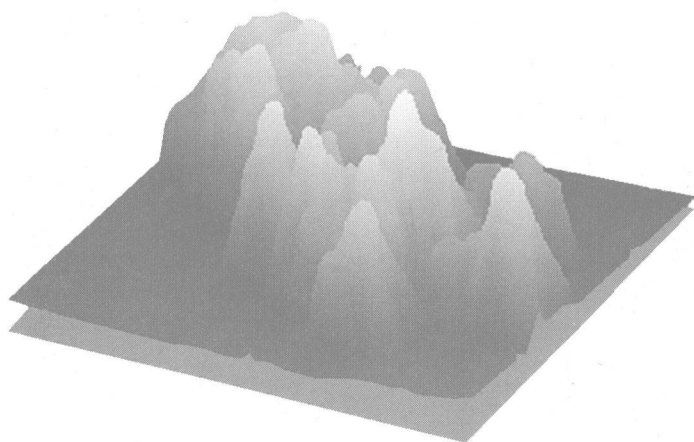


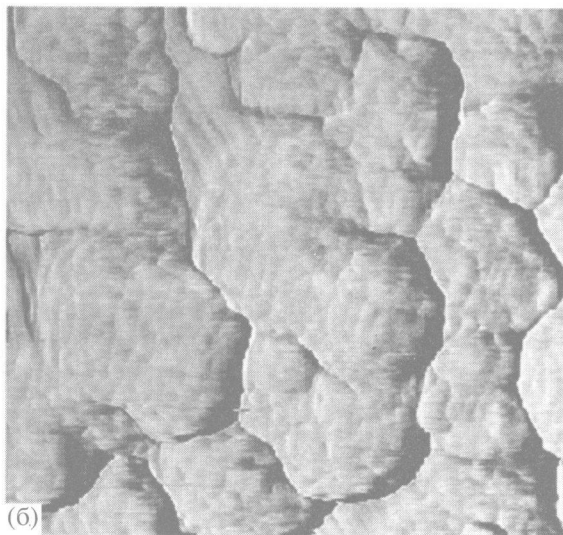
Рис. 5. Круговой кластер, образовавшийся при экстракции фосфолипида смесью хлороформа с метанолом (1 : 1) из образца, содержащего агрегаты протеолипосом с соотношением белок : липид, равным 1 : 20. Диаметр кластера на половине высоты – 250 нм. Высота – 150 нм. Размер структурной единицы – 40–50 нм. Размер кадра $525 \times 525 \text{ нм}^2$; к изображению применена боковая подсветка.

званного конечными размерами острия зонда [10]. Простой геометрический расчет с учетом размеров острия позволяет оценить истинный диаметр цепочки как равный 15 нм, что близко к

диаметру отдельной F_1 -субъединицы [11]. Предположительно, F_0 -субъединицы погружены в липидный бислой, а F_1 -субъединицы выступают наружу.



(a)



(б)

Рис. 6. Трехмерные квазикристаллы, образовавшиеся на поверхности графита после разбавления водой раствора АТФ-синтазы F_1F_0 в водном растворе $C_{12}E_8$. Трехмерное изображение квазикристаллов, полученное в топографическом режиме (а); высота структур (0.7–1.0 мкм) превышает их диаметр (0.3–0.5 мкм). Изображение структуры торцевой поверхности, полученное в режиме силы трения (б). Размер кадра: (а) – 5.5×5.5 мкм², (б) – 1.2×1.2 мкм².

Стержнеобразные липид-белковые кластеры.

При нагревании образца суспензии протеолипосом с соотношением белок : липид, равным 1 : 5, полученных при 4°C, до 45°C в течение 20 мин на поверхности графита образуются стержнеобразные кластеры (рис. 4). Углы между направлениями ориентации кластеров составляют 60°, что совпадает с углами кристаллической решетки графита. Толщина такого кластера несколько изменяется по его длине (40–50 нм), и, как в предыдущем случае, ее реальное значение оказывается несколько меньше из-за описанного выше эффекта уширения. Высота таких структур на периферии нанесенного препарата равна 14–15 нм. Однако в центральной части образца она вдвое больше – 28–30 нм, тогда как толщина кластеров остается неизменной.

Круговые кластеры. После щадящей обработки (экстракции) исходных образцов смесью (1 : 1) хлороформа с метанолом при температуре 5–8°C в течение 20–40 мин образуются трехмерные квазикристаллические круговые кластеры диаметром 200–300 нм (рис. 5). Размер их отдельной структурной единицы составляет 40–50 нм. Высота таких кластеров равна 150–200 нм. В экстрактах белковые компоненты обнаружены не были.

Была предпринята попытка получения трехмерных наноструктур непосредственно из раствора F_1F_0 , в отсутствие липида. При нанесении на графит раствора комплекса F_1F_0 в водном растворе неионогенного поверхностно-активного вещества $C_{12}E_8$ (монододециловый эфир октаэтиленгликоля, Fluka) и последующем разбавлении избытком дистиллированной воды образовыва-

лись трехмерные квазикристаллические структуры (рис. 6). Интересно отметить, что их высота (0.7–1.0 мкм) превышает диаметр (0.3–0.5 мкм). Предположительно, они имеют форму, близкую к цилиндрической. Боковая поверхность структуры имеет крутой наклон к плоскости подложки, в результате чего определяющее влияние на формирование АСМ-изображения оказывает геометрия зонда (полосы на рис. 6 являются артефактами). Определить топографию боковой поверхности с помощью АСМ не представилось возможным. Торцевая поверхность квазикристаллов сложена из плотноупакованных частиц размером 40 нм. Описанные в предыдущем разделе круговые структуры отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подобраны условия приготовления образцов протеолипосом, позволяющие наблюдать образование белок-липидных кластеров на поверхности графита методом АСМ. В таких условиях медленной дегидратации можно предположить существование стадий кластеризации протеолипосом. Первая – образование метастабильных кластеров. Вторая – резкое ослабление белок-липидного взаимодействия, приводящее к частичному или полному разделению белка и липида. Экстракция липида или его изначальное отсутствие в растворе приводят к формированию трехмерных квазикристаллических структур. Таким образом, показано, что молекулы АТФ-синтазного комплекса F_1F_0 взаимодействуют друг с другом по нескольким совершенно различным механизмам. Существенное влияние на тип агрегации оказы-

вает фосфолипид. В трехмерных структурах присутствие липида приводит к круговой упаковке белковых кластеров. Отмечено одновременное возникновение на поверхности графита фосфолипидного бислоя и белковых кластеров типа "цепочка".

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 97-03-32778а и 96-04-49882) и программой "Университеты России" (проект 5060).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch.* // *Phys. Rev. Lett.* 1986. V. 56. № 9. P. 930.
2. *Meyer G., Amer N.M.* // *Appl. Phys. Lett.* 1990. V. 57. № 20. P. 2089.
3. *Neff D., Tripathi S., Middendorf K. et al.* // *J. Structural Biology.* 1997. V. 119. P. 139.
4. *Киселёва О.И., Яминский И.В.* // *Коллоид. журн.* 1999. Т. 61. № 1. С. 1.
5. *Yanushin M.F.* // *FEBS Letters.* 1993. V. 335. № 1. P. 85.
6. *Филонов А.С., Яминский И.В.* Полный программный пакет управления и обработки данных для сканирующей зондовой микроскопии "Фемтоскан-001". М.: Центр перспективных технологий, 1999. С. 40.
7. *Rigand S.L., Pitard B., Levy D.* // *Biophys. Biochem. Acta.* 1995. V. 1231. № 3. P. 223.
8. *Киселёва О.И., Ягужинский Л.С., Яминский И.В., Янюшин М.Ф.* // Тез. докл. Российской конференции по электронной микроскопии. Черногловка, 1998. С. 59.
9. *Киселёва О.И., Ягужинский Л.С., Яминский И.В., Янюшин М.Ф.* // *Поверхность.* 1999. № 7. С. 109.
10. *Stemmer A., Engel A.* // *Ultramicroscopy.* 1990. V. 34. P. 129.
11. *Graber P., Bottcher B., Boekema E.J.* In: *Bioelectrochemistry III* / Eds. Milazzo G., Blank M. New York: Plenum, 1990. P. 247.