

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОДИСКОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКС СЕНСОРНОГО РОДОПСИНА II С РОДСТВЕННЫМ БЕЛКОМ-ТРАНСДЮСЕРОМ ИЗ *Natronomonas pharaonis*

© 2016 г. Д.В. Багров, Н. Воскобойникова*, Г.А. Армеев, В. Мосслей*, Г.С. Глухов, Т.Т. Исмагулова, А.Я. Мулкиджанян*, М.П. Кирпичников, Х.-Ю. Штайнхофф*, К.В. Шайтан

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: dbagrov@gmail.com

*Физический факультет Оснабрюкского университета, 49069, Оснабрюк, Barbarastrasse 7, Германия

E-mail: nvoskobo@uni-osnabrueck.de

Поступила в редакцию 04.02.16 г.

Описаны получение и свойства липодисков – фрагментов липидной мембраны диаметром ~10 нм, которые стабилизированы молекулами амфифильных синтетических полимеров. Были исследованы липодиски из полярных липидов *Escherichia coli*. Проведено сравнение липодисков, содержащих светочувствительный белковый комплекс рецепторного белка родопсина II с родственным белком-трансдюсером из архейной галобактерии *Natronomonas pharaonis*, с пустыми липодисками без белка. Липодиски были охарактеризованы с использованием методов динамического светорассеяния, просвечивающей электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии. Показано, что встраивание белковых комплексов не влияет на диаметр липодисков, что делает их перспективной платформой для исследований мембранных белков методами одномолекулярной дифракции.

Ключевые слова: мембранные белки, родопсин, липодиски, просвечивающая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия.

В последние годы активно развиваются новые методы изучения структуры мембранных белков, связанные с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах (XFEL) [1–4] и новых подходов к кристаллизации гидрофобных структур [5,6]. Развитие этих методов и подходов, особенно в применении к плохо или совсем не кристаллизующимся объектам, имеет особенности, связанные с приготовлением образцов, стабилизацией структуры, протоколами проведения эксперимента, а также обработкой картины рассеяния рентгеновского излучения для получения информации о пространственной структуре макромолекул [7–10]. Вопрос о выборе оптимальных молекулярных и надмолекулярных объектов для проведения структурно-динамических экспериментов в этом контексте становится весьма актуальным. В этой связи представляет интерес использование липидных наночастиц – нанодисков и липоди-

сков – в качестве контейнеров (носителей) для единичных молекул мембранного белка.

Традиционно мембранные белки стабилизируют в детергенте или протеолипосомах. Используют также бицеллы (частицы, состоящие из липида с длинным углеводородным фрагментом и детергента или липида с коротким углеводородным фрагментом) [11], плоские липидные слои [12], нано- и липодиски – фрагменты липидной мембраны с диаметром ~10 нм. Нанодиски скрепляются (опоясываются) молекулами амфифильных белков [13,14], липодиски отличаются тем, что стабилизированы при помощи амфифильных синтетических полимеров [15–23]. В качестве амфифильного белка для получения нанодисков обычно используется белок MSP (Membrane Scaffold Protein) – рекомбинантный аналог липопротейна A [14], а в качестве амфифильного полимера при получении липодисков – сополимер стирола и малеиновой кислоты (Styrene Maleic Acid, SMA) [23]. Молекулы SMA и рекомбинантного аналога липопротейна A защищают гидрофобные части липидов, находящихся на краю липидного диска, от контакта с водой. В центральной

Сокращения: XFEL – рентгеновский лазер на свободных электронах, SMA – сополимер стирола и малеиновой кислоты, ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия, АСМ – атомно-силовая микроскопия.

части липидного нанодиска может располагаться мембранный белок. При этом вся система будет стабильна в водном окружении. Таким образом, липодиски и нанодиски могут рассматриваться как перспективные контейнеры для отдельных молекул мембранных белков.

Нанодиски активно используются для получения водорастворимых препаратов мембранных белков в экспериментах по исследованию структуры методами ядерного магнитного резонанса [24–26], криоэлектронной микроскопии [27] и электронного парамагнитного резонанса [28]. Липодиски, содержащие отдельные молекулы белка, пока не получили большого распространения и относительно мало изучены. Однако преимущество липодисков состоит в том, что они не требуют применения детергента при сборке и позволяют сохранить интактное липидное микроокружение белка, что в ряде случаев может оказаться важным для сохранения его нативной конформации [21].

В данной работе исследованы липодиски, состоящие из полярных липидов мембран *Escherichia coli*, стабилизированные сополимером SMA. В липодиски встраивали фотоактивный мембранный белок и сравнивали размеры липодисков с белком и пустых липодисков.

В качестве объекта исследования был выбран комплекс светочувствительного рецепторного белка родопсина II (*NpSRII*) с родственным белком-трансдюсером (*NpHtrII*) из архейной галобактерии *Natronomonas pharaonis*. *NpSRII*, будучи структурно и функционально родственными активируемым светом ионным насосом бактериородопсину и галородопсину [29–31], опосредует фотофобный ответ галобактерий при освещении их нежелательным синим цветом. В мембранах *NpSRII* образует прочный комплекс с белком-трансдюсером *NpHtrII* (трансдюсер родопсинов галобактерий) [32] в стехиометрии 2:2 [33]. После активации светом белка *NpSRII* сигнал переносится на *NpHtrII*, который передает сигнал дальше на внутриклеточную сигнальную систему, модулирующую плавательное поведение клетки. Большинство предыдущих исследований комплекса фоторецептор/трансдюсер из *N. pharaonis* (*NpSRII/NpHtrII*) в липидной модельной системе были выполнены с использованием пурпурных мембран. При этом возможна кластеризация комплексов в пурпурных мембранах [34], что делает практически невозможным исследование функциональных свойств единичного комплекса *NpSRII/NpHtrII*.

В настоящей работе мы охарактеризовали липодиски, состоящие из полярных липидов мембран *Escherichia coli* и сополимера SMA, и

провели встраивание комплекса *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇ (белок-трансдюсер обрезан по 157-й аминокислоте) в липодиски, сравнивая размер и форму пустых и загруженных наночастиц. Полученные липопротеиновые наночастицы были охарактеризованы с использованием методов динамического светорассеяния, просвечивающий электронной микроскопии (ПЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и очистка комплекса *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇. В целях очистки белки содержали С-концевой 6xHis-тег. Белки *NpSRII*-His и *NpHtrII*₁₅₇-His (конструкция трансдюсера, которая была обрезана в положении аминокислотного остатка 157) экспрессировали в клетках *E. coli* BL21 (DE3) в соответствии с работами [35–37], с небольшими модификациями. Клетки выращивали при 37°C в среде LB (с добавлением 50 мг/мл канамицина) до величины оптической плотности OD_{580} , равной 0,8–1,0, сверхэкспрессию индуцировали добавлением 0,5 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом. После индукции клетки инкубировали в течение 3 ч при 37°C. Далее клетки собирали центрифугированием (3000 g, 15 мин, 4°C), затем промывали один раз и ресуспендировали в буфере для промывки клеток (25 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, содержащий 150 мМ NaCl и 2 мМ ЭДТА; 1/100 объема культуры) и разрушали ультразвуком на приборе Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corporation, США). Мембранную фракцию отделяли центрифугированием (50000 g, 1 ч, 4°C), мембранные белки солюбилизировали в течение ночи (4°C) в буфере А (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 300 мМ NaCl, 2% (масса/объем) *n*-додецил-β-D-мальтозида). Солюбилизованные мембранные белки отделяли центрифугированием (50000 g, 1 ч, 4°C) и инкубировали в течение 2 ч с металл-хелатным сорбентом Ni-NTA superflow (Qiagen, Германия), уравновешенным буфером В (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0, 300 мМ NaCl, 0,05% (масса/объем) *n*-додецил-β-D-мальтозида) в присутствии 15 мМ имидазола. Неспецифически связанные белки были удалены промывкой буфером В, содержащим 30 мМ имидазола. His-меченные белки элюировали буфером В, содержащим 200 мМ имидазола. Из фракций, содержащих желаемый белок, имидазол удаляли диализом против раствора, содержащего 10 мМ трис/HCl pH 8,0, 500 мМ NaCl, 0,05% (масса/объем) *n*-додецил-β-D-мальтозида. Растворы

белков в виде аликвот хранили до использования при -80°C .

Подготовка сополимера стирола и малеиновой кислоты. Соплимер стирола и малеиновой кислоты, с молярным соотношением стирол/малеиновая кислота, равным 3:1 (молекулярная масса 9500 Да, поставляется в виде водного раствора натриевой соли SMA 3000 HNa), был предоставлен фирмой Cray Valley (США). Для экспериментов по реконструкции липодисков был использован раствор SMA с концентрацией 5% (масса/объем), полученный после диализа против буфера С (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl).

Получение липосом и протеолипосом. Использовали экстракт полярных липидов мембран *E. coli* в хлороформе (Avanti Polar Lipids, Inc., США). Липиды переносили в стеклянную колбу, хлороформ удаляли сушкой в токе азота. После испарения хлороформа липидную пленку сушили в вакууме в течение не менее 1 ч, а затем гидратировали в буфере С при перемешивании в течение приблизительно 30 мин. Суспензию гидратированных липидов подвергали пяти циклам замораживания/оттаивания (с использованием жидкого азота и водяной бани при 37°C) и, если не использовали непосредственно, хранили в виде аликвот при -80°C . Для получения липосом полученную суспензию липидов экструдировали по меньшей мере 11 раз с помощью мини-экструдера (Avanti Polar Lipids, Inc., США) через поликарбонатные мембраны (Whatman, США) с диаметром пор 400 нм или 200 нм.

Реконструкцию белкового комплекса *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇ в липосомы осуществляли с использованием полистирольных гранул Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad Laboratories, Германия). Сначала *NpSRII* и *NpHtrII*₁₅₇ смешивали в молярном соотношении 1:1 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембранные белки смешивали с липосомами в молярном соотношении белок:липид, равном 1:172. Для извлечения *n*-додецил- β -D-мальтозида смесь инкубировали с гранулами Bio-Beads SM-2 (50 мг гранул/мг детергента) в течение 16 ч при 4°C . Гранулы Bio-Beads SM-2 подвергали тщательной предварительной отмывке метанолом и водой. Протеолипосомы осаждали центрифугированием (15 мин, 15800 g, 4°C), а затем ресуспендировали в буфере С.

Приготовление пустых липодисков и липодисков, содержащих белковый комплекс. Для формирования липодисков, содержащих комплекс *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇, а также пустых липодисков 5%-й (масса/объем) раствор сополимера SMA в буфере С по каплям добавляли к су-

спензии протеолипосом или липосом соответственно для получения конечного соотношения по массе липида к SMA, равного 1:2,5, полученную смесь оставляли для уравнивания в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем в течение 16 ч при 4°C . Полученный раствор липодисков со встроенным в них комплексом *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇ или раствор «пустых» липодисков центрифугировали (50000 g, 30 мин, 4°C), чтобы удалить нерастворившиеся белки.

Измерение размеров методом динамического светорассеяния. Измерения методом динамического светорассеяния проводились на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) при 25°C . Приводятся усредненные данные по трем сериям экспериментов, каждая из которых включала 14 измерений длительностью по 10 с. Распределение частиц по размерам было получено с помощью пакета программного обеспечения ZETASIZER Ver. 7.02. в предположении, что липодиски имеют шаровидную форму.

Измерение размеров методом просвечивающей электронной микроскопии. Раствор пустых липодисков или липодисков, содержащих комплекс *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇, наносили на сетки Ted Pella, обработанные в тлеющем разряде на установке Emitech K100X. Раствор инкубировали в течение 1–2 мин, затем сетки обрабатывали 1%-м раствором уранилацетата в течение 1 мин и высушивали. Исследование проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Размер частиц измеряли с помощью программы ImageJ [38].

Измерение размеров методом атомно-силовой микроскопии. Раствор липодисков или липодисков, содержащих комплекс *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇, разводили буфером (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂) и наносили на свежий скол слюды. Раствор инкубировали в течение 5 мин, затем, не высушивая, слюду промывали 1 мл буфера, и помещали в жидкостную ячейку атомно-силового микроскопа. Измерения проводили на микроскопе Solver PRO (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия) с использованием кантилеверов MSCT-AUHW в полуконтактном режиме в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl. Изображения обрабатывали с помощью программы FemtoScan Online.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая схема экспериментов представлена на рис. 1. Эксперименты включают в себя вы-

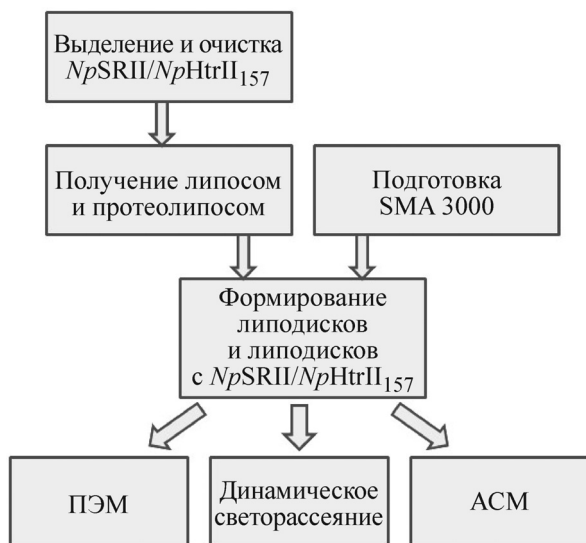


Рис. 1. Общая схема экспериментов.

деление и очистку белкового комплекса $NpSRII/NpHtrII_{157}$, формирование липосом и протеолипосом, формирование пустых (контрольных) липодисков и липодисков, содержащих $NpSRII/NpHtrII_{157}$, и исследование полученных липодисков тремя аналитическими методами.

Белки $NpSRII$ и $NpHtrII_{157}$ из *N. pharaonis* были получены гетерологичной экспрессией в клетках *E. coli* с последующей очисткой с использованием аффинной хроматографии, проводимой на металл-хелатном сорбенте Ni-NTA. Комплекс $NpSRII/NpHtrII_{157}$ (в молярном соотношении 1:1) встраивали в липосомы из полярных мембранных липидов *E. coli*, полученные протеолипосомы подвергали воздействию сополимера SMA с массовым соотношением липид : полимер, равным 1:2,5.

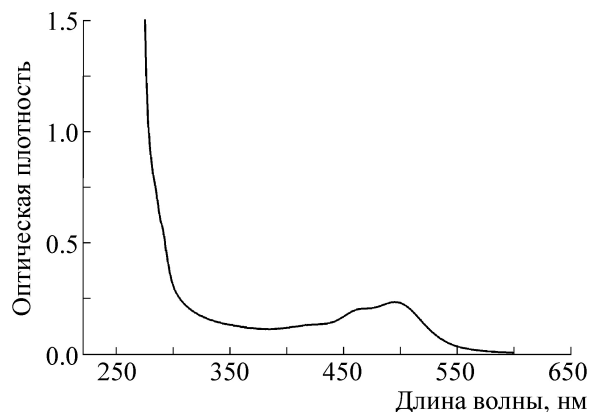


Рис. 2. Спектр поглощения комплекса $NpSRII/NpHtrII_{157}$, встроенных в липодиски.

На рис. 2 приведен спектр поглощения образца липодисков с комплексом $NpSRII/NpHtrII_{157}$. Спектр имеет максимум поглощения при 500 нм, обусловленный поглощением хромофорной группы (ретиная) сенсорного родопсина $NpSRII$, что свидетельствует о присутствии в образце этого белка. Константа диссоциации K_d гетерогенного комплекса $NpSRII/NpHtrII_{157}$ составляет 240 нМ [39]. Объемная концентрация сенсорного родопсина в данном образце составляла около 9 мкМ. В пересчете на объем только липидной фазы концентрация $NpSRII$ будет на несколько порядков выше. Соответственно, белки $NpSRII$ и $NpHtrII_{157}$ должны были присутствовать в липодисках в виде комплексов.

Распределение липодисков по размерам было исследовано методом просвечивающей электронной микроскопии. На рис. 3 представлены изображения пустых липодисков и липодисков, содержащих комплекс $NpSRII/NpHtrII_{157}$. Распределения по размерам, показанные на рис. 4,

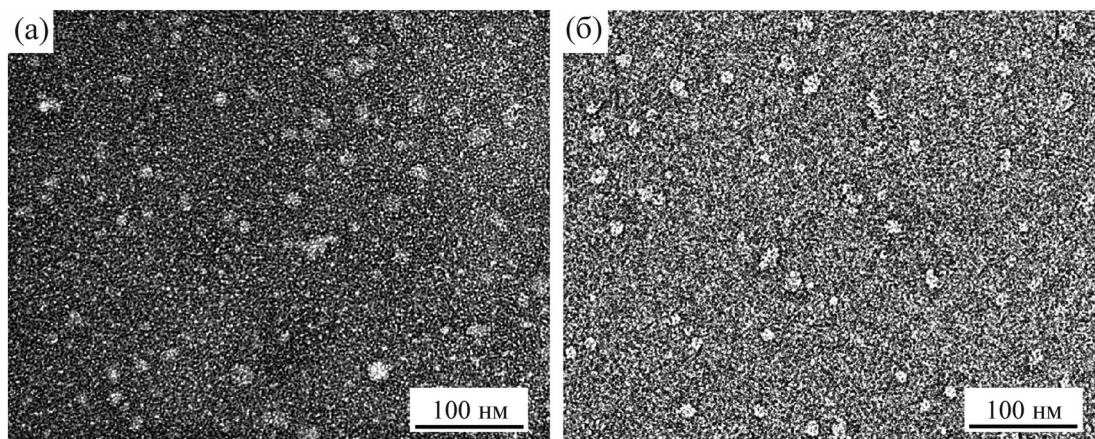


Рис. 3. Изображения пустых липодисков (а) и комплекса $NpSRII/NpHtrII_{157}$ в липодисках (б).

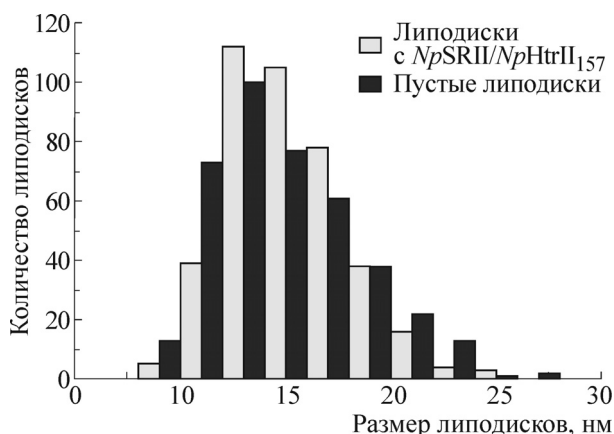


Рис. 4. Гистограммы распределений по размерам для пустых липодисков и липодисков, содержащих комплекс *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇, согласно данным, полученным методом ПЭМ.

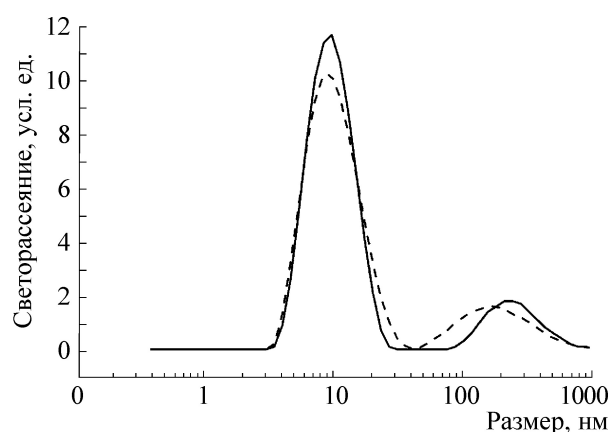


Рис. 5. Распределения по размерам для пустых липодисков (сплошная линия) и липодисков, содержащих комплекс *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇ (пунктирная линия), по данным динамического светорассеяния.

были получены путем измерения размеров 200 липодисков (измеряли по два размера для каждого, т.е. объем каждой выборки $N = 400$). Распределения имеют по одному максимуму, но не являются гауссовыми. По критерию Манна–Уитни они статистически не различаются, т.е. пустые липодиски и липодиски, содержащие комплекс *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇, имеют один и тот же средний размер 15 ± 3 нм. Размер частиц, которые встречаются наиболее часто, лежит в диапазоне 12,8–13,0 нм. Полученные нами значения практически совпадают с размерами липодисков, измеренными методом ПЭМ другими авторами [15,23]. Мы не наблюдали бимодального распределения по размерам [23].

Препараты липодисков были изучены также методом динамического светорассеяния. В экспериментах получали распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц для липодисков, содержащих белковый комплекс, и пустых липодисков (рис. 5). В обоих образцах липодиски, большей частью, имели средний размер около 10,0 нм. Малый пик в области 150–220 нм соответствовал, по-видимому, агрегатам из липида и SMA. Они больше одиночных липодисков, и поэтому интенсивнее рассеивали свет. В то же время такие агрегаты сравнительно малочисленны – при исследовании методом ПЭМ они практически не встречались. Аналогичное распределение наблюдали в работе [15]. Таким образом, значения, полученные методом динамического светорассеяния, меньше значений, полученных при использовании ПЭМ (15 ± 3 нм). Это расхождение может быть связано с различиями в физических свойствах объектов, которые были фактически измерены этими методами, а именно, гидродина-

мический диаметр наночастиц в растворе не соответствует диаметру, определяемому из размеров площади проекции адсорбированных наночастиц при использовании метода ПЭМ.

Для измерения толщины липодисков использовали метод атомно-силовой микроскопии. При выборе способа приготовления образцов для АСМ мы использовали протокол, который ранее был применен для нанодисков [40–42]. Изображение липодисков, полученное методом АСМ, приведено на рис. 6. Средняя высота липодисков над подложкой составляет $3,3 \pm 0,3$ нм. Это меньше, чем ожидаемая толщина липидного бислоя (4–5 нм). Утончение мембраны может быть объяснено взаимодействием с подложкой и сжатием силой, которая действует на них со стороны кантилевера.

Некоторые липодиски имеют удвоенную высоту. Пример такого объекта показан на рис. 6, где через него проведено сечение. Предположительно, это два липодиска, слипшихся друг с другом плоскостями.

Латеральный размер липодисков составляет не менее 23 нм, он больше истинного размера за счет известного эффекта латерального уширения, связанного с конечным радиусом кривизны кантилевера. В данной работе мы использовали кантилеверы из нитрида кремния с радиусом кривизны острья до 20 нм (по описанию производителя). Эффект латерального уширения можно снизить, если использовать сверхострые кантилеверы с радиусом острья 1–3 нм.

Получить изображения комплекса *NpSRII/NpHtrII*₁₅₇ в липодисках методом АСМ не удалось – в процессе сканирования частицы отрывались от подложки. Возможно, эту пробле-

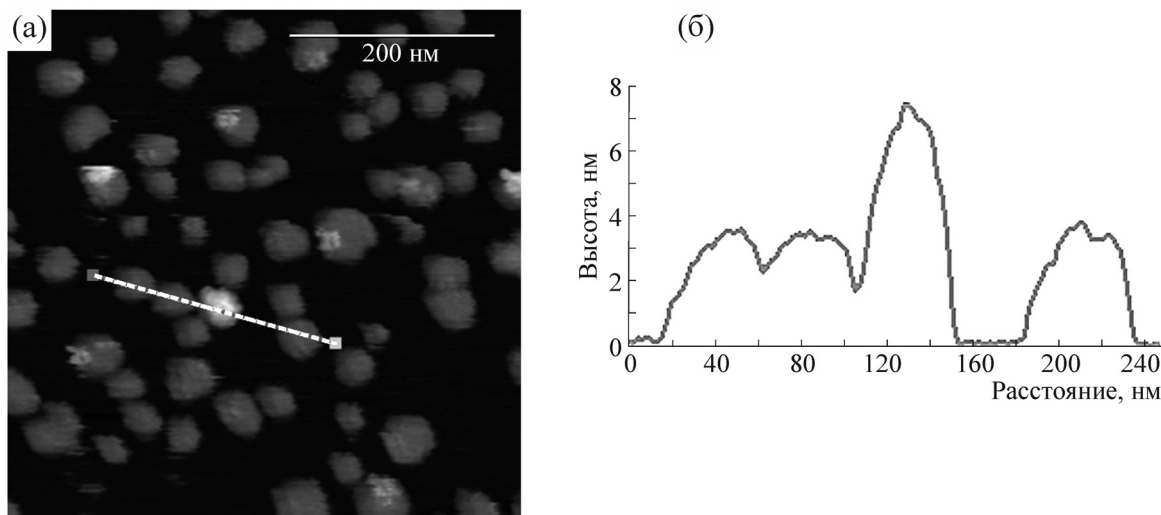


Рис 6. Изображение липодисков, полученное методом АСМ (а) и график сечения вдоль выбранной линии (б).

му удастся решить при дополнительной оптимизации состава буфера (рН и ионной силы) и модификации подложки для увеличения адгезии.

Оценим количество молекул липида, входящих в состав одного липодиска. Для того чтобы стабилизировать мембранные диски, сополимер должен закрыть боковую поверхность их гидрофобных липидных хвостов от контакта с водой. Толщина гидрофобной части мембраны меньше толщины бислоя. В данной работе использовали экстракт полярных липидов *E. coli*, он более чем наполовину состоит из липидов, содержащих насыщенные жирные кислоты, имеющие по 16 атомов углерода в углеводородном фрагменте [43]. Толщина гидрофобной части мембраны, построенной из таких липидов, составляет $h_{hp} = 2,6 \pm 0,1$ нм [44].

Исходя из представления о липодиске как о цилиндрическом участке липидного бислоя, окруженного сополимером стирола и малеиновой кислоты, можно оценить объем молекул сополимера как

$$V_{SMA} = \pi R_{LD}^2 h_{hp} - \pi R_{lip}^2 h_{hp},$$

где R_{LD} – радиус липодиска, R_{lip} – радиус липидной составляющей липодиска. В данной работе применяли сополимер со средней молекулярной массой 3800, что соответствует приблизительно 27 звеньям стирола и 9 звеньям малеиновой кислоты (при их отношении 3:1). Ван-дер-ваальсов объем такого сополимера составляет $V_{VDW} \sim 3,7$ нм³ (рассчитан в Molinspiration Property Calculation Service, www.molinspiration.com). Однако реальный объем пространства, занимаемый полимером, должен

быть больше, в силу неплотной упаковки и гидратации сополимера:

$$V_{SMA} = \alpha N V_{VDW},$$

где N – число молекул сополимера, приходящихся на один липодиск, α – объемный коэффициент, описывающий отличия реального объема молекулы от теоретического. Исходя из этого, число молекул липидов в одном липодиске можно оценить как

$$N_{lip} = \frac{2\pi R_{LD}^2}{S_{lip}} - \frac{2\alpha N V_{VDW}}{S_{lip} h_{lip}},$$

где $S_{lip} = 0,66$ нм² является площадью, приходящейся на один липид [44]. Эта формула учитывает, что липиды уложены в два слоя.

Согласно измерениям методом ПЭМ средний радиус липодиска составляет 7,5 нм. Контурная длина молекулы используемого сополимера составляет $\sim 9,3$ нм (в приближении длин связей и валентных углов для алканов), что значительно меньше периметра липодиска (около 47 нм). Таким образом, можно ожидать, что липодиски содержат не менее пяти молекул SMA.

Оценим вариацию количества молекул липидов на липодиск с радиусом 7,5 нм в зависимости от числа молекул SMA при $\alpha = 1,5$: $N_{lip} = 502$ при $N = 5$, $N_{lip} = 470$ при $N = 10$, $N_{lip} = 406$ при $N = 20$. Сравнение этих значений с литературными данными (180–200 липидов на липодиск с радиусом 6 нм из DMPC [18]) подтверждает предположение об участии нескольких молекул SMA в стабилизации одного липодиска. Для сравнения, в формировании на-

Сопоставление результатов измерений размеров липодисков с литературными данными

Липидный состав, используемый SMA	Встроенный белок	Ссылка	Метод динамического светорассеяния	Метод ПЭМ	Комментарии
Экстракт <i>E. coli</i> , SMA 3:1	<i>NpSRII/NpHtrII</i> ₁₅₇	Данная статья	~ 10 нм	15 ± 3 нм	Показана принципиальная возможность визуализации липодисков методом АСМ
DPPC, SMA 3:1 и 2:1	Бактериородопсин и пальмитоилтрансфераза	[22]	Средний размер 9,0 ± 1,1 нм для бактериородопсина в липодисках и 11,0 ± 1,4 нм для пальмитоилтрансферазы в липодисках	Размер бактериородопсина в липодисках 10,2 нм	На одну молекулу бактериородопсина в липодиске приходится ~11 молекул липида
Смеси липидов из клеток нескольких линий: НЕК, High Five, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> и H69AR, SMA 3:1 и 2:1	Несколько белков из класса АТФ-связывающих кассетных транспортеров. Все белки с His-тагами	[46]	–	Крио-ПЭМ. Построена 3D-модель белка Pgp (P-glycoprotein; ABCB1)	На одну молекулу белка Pgp в липодиске приходится ~17 молекул липида
POPC/POPG в соотношении 9:1, SMA 3:1	Исследовали пустые липодиски	[16]	Размер зависит от соотношения липида и SMA, минимум 15 нм	Использовали ПЭМ, чтобы подтвердить данные светорассеяния	
DMPC, SMA 3:1	Исследовали пустые липодиски	[15]	Средний размер 9 нм	Средний размер 9 нм, разброс 5–15 нм	
DMPC, SMA 3:1	Бактериородопсин	[18]	Средний размер 12±2 нм	–	В пустом липодиске 180–200 молекул липида
Экстракт <i>E. coli</i> (из лизированных клеток), SMA 2000, 2:1	KcsA – тетрамерный калиевый канал из <i>Streptomyces lividans</i> , экспрессированный в <i>E. coli</i>	[21]	–	Средний размер 10±2 нм	
Экстракт <i>E. coli</i> (из лизированных клеток), SMA3000, 3:1	ЕТК-FL – белок с внедренной меткой 19F. ЕТК (<i>E. coli</i> tyrosine kinase), метка в цитоплазматическом домене	[17]	–	При недостаточной концентрации SMA получались объекты с размером 100 нм. При достаточной размер был 10–20 нм	

Липидный состав, используемый SMA	Встроенный белок	Ссылка	Метод динамического светорассеяния	Метод ПЭМ	Комментарии
Липиды митохондриальных мембран <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SMA 3:1	Белки, встроенные во внутреннюю мембрану митохондрий, в частности, Complex IV (цитохром <i>c</i> -оксидаза)	[20]	–	Выбирали монодисперсную фракцию с помощью ГПХ, размер ~12 нм	
DMPC, SMA 2:1	Исследовали пустые липодиски	[23]	–	Бимодальное распределение, максимумы $11,1 \pm 3,3$ нм и $16,0 \pm 3,0$ нм	Методом малоуглового рассеяния нейтронов получили размер 9,8 нм
Экстракт <i>E. coli</i> (из лизированных клеток), соотношение звеньев SMA не указано	Белок AcrB из <i>E. coli</i> – антипорт, который участвует в выведении некоторых лекарств	[47]	–	Получена 3D-структура белка AcrB	

нодиска участвуют ровно две молекулы аполипептида А (или его рекомбинантного аналога) [13,14]. В отличие от нанодисков, для липодисков нет причин ожидать, что количество опоясывающих молекул SMA будет фиксировано.

Сравнение полученных нами результатов с имеющимися литературными данными приведено в таблице. Как было отмечено выше, АСМ ранее не использовали для исследования липодисков. При измерении размеров липодисков методы ПЭМ и динамического светорассеяния обычно дают близкие результаты.

Приведенные данные о свойствах липодисков показывают, что эти структуры являются монодисперсными наноразмерными носителями для мембранных белков. При проведении экспериментов методом XFEL неизбежно теряется информация о размерах исследуемых объектов [45]. В дифракционных экспериментах эту информацию дают рентгеновские кванты, рассеянные на малые углы, но на XFEL их практически невозможно зарегистрировать вблизи основного недифрагированного луча. Для построения начального приближения необходимо иметь информацию о размерах и форме исследуемого объекта. При использовании нано- и липодисков в качестве носителей для белков в структурно-динамических экспериментах на XFEL необходимо иметь информацию об их размерах, полученную независимыми аналити-

ческими методами, такими как динамическое светорассеяние, ПЭМ и АСМ. Первый из этих методов наиболее быстрый, он востребован, прежде всего, для контроля процесса сборки (формирования) липодисков. ПЭМ с негативным контрастированием и крио-ПЭМ могут использоваться не только для измерения размеров, но и для построения трехмерных распределений электронной плотности для анализа с низким разрешением структуры белков, стабилизированных в липодисках [46,47].

В данной работе мы использовали липодиски, чтобы стабилизировать структуру светочувствительного белкового комплекса *NpSRII/NpHtrII₁₅₇*. По данным ПЭМ, пустые липодиски и липодиски, содержащие комплекс *NpSRII/NpHtrII₁₅₇*, имеют один и тот же средний размер 15 ± 3 нм, наиболее часто встречаются частицы с размером 12,8–13,0 нм. Это близко к значению, полученному методом динамического светорассеяния (~10 нм).

Исследование липодисков методом АСМ, по аналогии с нанодисками [40,48,49], дает значения толщины липодиска $3,3 \pm 0,3$ нм, что несколько меньше ожидаемой толщины липидного бислоя (4–5 нм). Это может быть связано с деформацией липодисков сжимающей силой со стороны кантилевера.

Как видно из таблицы, до настоящего времени липодиски использовали для стабилизации лишь немногих мембранных белков. В то

же время нано- и липодиски уже сейчас являются ценными инструментами для структурной биологии, и мы ожидаем, что их популярность будет расти.

Оценка размеров сополимера SMA и липидной составляющей липодисков свидетельствует о том, что каждая частица должна содержать несколько молекул SMA. Для количественного определения числа молекул SMA требуется проведение дополнительных экспериментов и создание молекулярных моделей.

Исследование проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №15-54-12385) и DFG (STE640/14).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. M. Waldrop, *Nature* **505**, 604 (2014).
2. J. Hajdu, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 569 (2000).
3. H. N. Chapman, P. Fromme, A. Barty, et al., *Nature* **470**, 73 (2011).
4. К. В. Шайтан, М. П. Кирпичников, В. С. Ламзин и др., *Вестн. РФФИ* **4**, 38 (2014).
5. A. Deniaud, E. Moiseeva, V. Gordeliy, et al., in *Membrane Protein Structure Determination*, Ed. by J.-J. Lacarriere, (Humana Press, 2010), pp. 79–103.
6. V. Cherezov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 559 (2011).
7. U. Weierstall, J. C. Spence, and R. B. Doak, *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 035108 (2012).
8. R. Fung, V. Shneerson, D. K. Saldin, et al., *Nature Physics* **5**, 64 (2009).
9. A. Barty, J. Kupper, and H. N. Chapman, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **64**, 415 (2013).
10. К. В. Шайтан, Г. А. Армеев и А. К. Шайтан, *Биофизика* **61**, (2016).
11. J. A. Whiles, R. Deems, R. R. Vold, et al., *Bioorg. Chem.* **30**, 431 (2002).
12. M. Jamshad, Y. P. Lin, T. J. Knowles, et al., *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 813 (2011).
13. J. Borch and T. Hamann, *Biol. Chem.* **390**, 805 (2009).
14. T. H. Bayburt and S. G. Sligar, *FEBS Lett.* **584**, 1721 (2010).
15. M. C. Orwick, P. J. Judge, J. Procek, et al., *Angewandte Chemie-International Edition* **51**, 4653 (2012).
16. R. F. Zhang, I. D. Sahu, L. S. Liu, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* **1848**, 329 (2015).
17. D. Li, J. Li, Y. L. Zhuang, et al., *Protein & Cell* **6**, 229 (2015).
18. M. Orwick-Rydmark, J. E. Lovett, A. Graziadei, et al., *Nano Lett.* **12**, 4687 (2012).
19. D. Yu, *Honors Scholar Theses* **316** (2013).
20. A. R. Long, C. C. O'Brien, K. Malhotra, et al., *BMC Biotechnology* **13** (2013).
21. J. M. Dorr, M. C. Koorengel, M. Schafer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 18607 (2014).
22. T. J. Knowles, R. Finka, C. Smith, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **131**, 7484 (2009).
23. M. Jamshad, V. Grimard, I. Idini, et al., *Nano Res.* **8**, 774 (2015).
24. E. N. Lyukmanova, Z. O. Shenkarev, A. S. Paramonov, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **130**, 2140 (2008).
25. Z. O. Shenkarev, E. N. Lyukmanova, A. S. Paramonov, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **132**, 5628 (2010).
26. A. Z. Kijac, Y. Li, S. G. Sligar, et al., *Biochemistry* **46**, 13696 (2007).
27. E. P. Gogol, N. Akkaladevi, L. Szerszen, et al., *Prot. Sci.* **22**, 586 (2013).
28. I. Orban-Glass, N. Voskoboynikova, K. B. Busch, et al., *Biochemistry* **54**, 349 (2015).
29. A. Royant, P. Nollert, K. Edman, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10131 (2001).
30. H. Luecke, B. Schobert, J. K. Lanyi, et al., *Science* **293**, 1499 (2001).
31. V. I. Gordeliy, J. Labahn, R. Moukhametzianov, et al., *Nature* **419**, 484 (2002).
32. J. P. Klare, I. Chizhov, and M. Engelhard, *Results Probl. Cell Differ* **45**, 73 (2008).
33. A. A. Wegener, I. Chizhov, M. Engelhard, et al., *J. Mol. Biol.* **301**, 881 (2000).
34. V. D. Trivedi and J. L. Spudich, *Biochemistry* **42**, 13887 (2003).
35. I. P. Hohenfeld, A. A. Wegener, and M. Engelhard, *FEBS Lett.* **442**, 198 (1999).
36. N. Mennes, J. P. Klare, I. Chizhov, et al., *FEBS Lett.* **581**, 1487 (2007).
37. K. Shimono, M. Iwamoto, M. Sumi, et al., *FEBS Lett.* **420**, 54 (1997).
38. C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, *Nature Methods* **9**, 671 (2012).
39. J. Kriegsmann, M. Brehs, J. P. Klare, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 522 (2009).
40. C. D. Blanchette, J. A. Cappuccio, E. A. Kuhn, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* **1788**, 724 (2009).
41. T. H. Bayburt, J. W. Carlson, and S. G. Sligar, *Langmuir* **16**, 5993 (2000).
42. T. H. Bayburt and S. G. Sligar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6725 (2002).
43. H. G. Yuk and D. L. Marshall, *Appl. Environm. Microbiol.* **69**, 5115 (2003).
44. B. A. Lewis and D. M. Engelman, *J. Mol. Biol.* **166**, 211 (1983).
45. S. Marchesini, H. He, H. N. Chapman, et al., *Phys. Rev. B* **68** (2003).
46. S. Gulati, M. Jamshad, T. J. Knowles, et al., *Biochem. J.* **461**, 269 (2014).
47. V. Postis, S. Rawson, J. K. Mitchell, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1848**, 496 (2015).
48. T. H. Bayburt and S. G. Sligar, *Prot. Sci.* **12**, 2476 (2003).
49. B. A. Chromy, E. Arroyo, C. D. Blanchette, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **129**, 14348 (2007).

Characterization of Lipodisc Nanoparticles Containing Sensory Rhodopsin II and Its Cognate Transducer from *Natronomonas pharaonis*

D.V. Bagrov*, N. Voskoboynikova**, G.A. Armeev*, W. Mosslehy**,
G.S. Gluhov*, T.T. Ismagulova*, A.Y. Mulkidjanian**, M.P. Kirpichnikov*,
H.-J. Steinhoff**, and K.V. Shaitan*

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

**Department of Physics, University of Osnabruck, Barbarastrasse 7, Osnabruck, 49069 Germany

We describe the preparation and properties of lipodisc nanoparticles – lipid membrane fragments with a diameter of about 10 nm, stabilized by amphiphilic synthetic polymer molecules. We used the lipodisc nanoparticles made of *Escherichia coli* polar lipids and compared lipodisc nanoparticles that contained the photosensitive protein complex of the sensory rhodopsin II with its cognate transducer from the halobacterium *Natronomonas pharaonis* with empty lipodisc nanoparticles that contained no protein. The lipodisc nanoparticles were characterized by dynamic light scattering, transmission electron microscopy and atomic force microscopy. We found that the diameter of lipodisc nanoparticles was not affected by incorporation of the protein complexes, which makes them a prospective platform for single-molecule studies of membrane proteins.

Key words: membrane proteins, rhodopsin, lipodisc nanoparticles, transmission electron microscopy, atomic force microscopy