

УДК 577.322.7'352.42

Аномально высокий потенциал закрытия канала порина OmpF из *Yersinia ruckeri*: роль заряженных остатков и внутримолекулярных связей

Д. К. Чистюлин^{1**}, О. Д. Новикова¹, Е. А. Зелепуга^{1**}, В. А. Хоменко¹, Г. Н. Лихацкая¹,
О. Ю. Портнягина¹, Ю. Н. Антоненко²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

*E-mail: cdk27@mail.ru; zel@piboc.dvo.ru

#Авторы внесли равный вклад в работу.

Поступила в редакцию 11.04.2019

Принята к печати 17.05.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-89-98

РЕФЕРАТ Электрофизиологические эксперименты на бислойных липидных мембранах показали, что изолированный основной порин наружной мембраны бактерии *Yersinia ruckeri* (YrOmpF) обладает типичной для поринов грамотрицательных бактерий активностью, образуя каналы со средней проводимостью 230 пСм (в 0.1 М КСl) и небольшой асимметрией по отношению к приложенному потенциалу. Не выявлено существенного уменьшения суммарной проводимости встроенного в бислой канала YrOmpF при закислении среды (вплоть до pH 3.0). От поринов других бактерий исследуемый канал существенно отличают высокие значения критического потенциала закрытия (V_c): при pH 7.0 $V_c = 232$ мВ, при pH 5.0 $V_c = 164$ мВ. Для объяснения этих свойств с помощью теоретической модели пространственной структуры YrOmpF проанализировано распределение зарядов в устье и внутри канала, а также дана количественная оценка связей между аминокислотными остатками, локализованными в петле L3 и на внутренней стенке барреля. Проведено сравнение характеристик YrOmpF и классического порина OmpF *Escherichia coli*. Результаты электрофизиологических экспериментов и теоретического анализа обсуждаются с точки зрения механизма потенциал-зависимого закрытия пориновых каналов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Yersinia ruckeri*, бислойные липидные мембраны, критический потенциал закрытия, по-рообразующие белки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ YrOmpF – порин OmpF *Yersinia ruckeri*; EcOmpF – порин OmpF *Escherichia coli*; V_c – критический потенциал закрытия; НМ – наружная мембрана; АК – аминокислотный; МД – молекулярная динамика; БЛМ – бислойные липидные мембраны; РОЕ – *n*-октилполиоксиэтилен; DPhPC – дифитаноил-фосфатидилхолин; YrOmpF – порин OmpF *Yersinia pseudotuberculosis*.

ВВЕДЕНИЕ

Yersinia ruckeri – грамотрицательная бактерия, вызывающая иерсиниоз у рыб, преимущественно лососевых. Подобно другим иерсиниям, этот патоген обладает способностью выживать и сохранять вирулентность в различных условиях окружающей среды и в достаточно широком диапазоне температур. У рыб, культивируемых в условиях аквакультуры, *Y. ruckeri* вызывает вспышки заболевания, ежегодно приводящие к большим экономическим потерям [1–4].

Известно, что порины, наряду с липополисахаридом, представляют собой количественно доминантный компонент наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий и играют большую роль в адаптации микроорганизмов к изменению условий окружающей среды. Как трансмембранные белки, они образуют систему каналов для пассивного транспорта низкомолекулярных гидрофильных соединений через НМ бактерий. Основной функциональной единицей порина является гомотример [5, 6]. Мономер белка представляет собой эллипсообраз-

ный бета-складчатый цилиндр (баррель), состоящий из антипараллельных бета-тяжей, соединенных участками (наружными петлями) с альфа-спиральной или неупорядоченной структурой. Внутренняя часть канала мономера порина образована гидрофильной поверхностью бета-барреля, а внешняя – прилегающими участками петель (зона устья и вестибюля поры). Непосредственно к вестибюлю поры примыкает также участок петли L2 соседнего барреля, поскольку она направлена в сторону от «своего» мономера. В центре канала находится самая длинная петля L3, которая, в отличие от остальных, выходящих за пределы барреля, погружена в полость поры до середины, ограничивая тем самым ее размер и образуя сужение, так называемую зону констрикции, или «глазок поры». Стенка барреля сформирована преимущественно положительно заряженными аминокислотными (АК) остатками, а петля L3, напротив, содержит большое количество кислых АК-остатков. Пространственная конфигурация заряженных АК-остатков такова, что внутри канала формируется электростатическое поле, которое обуславливает селективность канала по отношению к зарядам проникающих ионов и гидрофильных соединений [7].

Электрофизиологические эксперименты, выполненные на неспецифических поринах *Escherichia coli*, показали, что большую часть времени канал белка OmpF пребывает в открытом состоянии, обеспечивая поступление ионов и гидрофильных молекул в клетку. Однако большинство поринов обладает способностью переходить в стабильное закрытое состояние, например, при увеличении кислотности среды и/или под действием приложенного внешнего потенциала (потенциал-зависимое закрытие) [8–14].

Существуют различные гипотезы в отношении биологической функции, связанной со свойствами каналов. В частности, это может быть следствием закрытия каналов неправильно встроенных белков, а также быть защитной (при понижении pH среды) или даже регуляторной транспортной функцией поринов (например, у белков с очень низким критическим потенциалом закрытия канала, V_c) [15, 16]. Однако все выдвигаемые объяснения недостаточно убедительны и, возможно, это свойство может рассматриваться лишь как необычный артефакт [17].

Разные предположения высказываются и о механизме потенциал-зависимого закрытия пориновых каналов (механизма стробирования). На основании данных молекулярной динамики (МД) в качестве возможного стробирующего механизма предложена модель «подвижной» петли L3, изменение положения которой приводит к блокированию канала [18]. Однако, поскольку это петля имеет много взаимодействий со стенкой барреля (солевые мостики, сеть во-

дородных связей), эта идея кажется маловероятной. Кроме того, показано, что процесс закрытия канала не сопровождается существенными изменениями в положении петли: не обнаружено заметных отличий в этом свойстве у OmpF *E. coli* с модифицированной с помощью дисульфидных мостиков петель L3 [19, 20]. Данный факт говорит в пользу того, что возможной причиной перекрытия канала становятся локальные изменения в третичной структуре некоторых участков петли L3. Исследование пертурбаций с помощью МД позволило предположить, что по крайней мере часть петли L3 порина из *R. capsulatus* является гибкой [21]. Эта часть вполне может соответствовать области сразу за консервативным мотивом последовательности PEEGG, обнаруженным в OmpF кишечной палочки. Действительно, замена двух остатков глицина в PEEGG привела к изменению функциональной характеристики канала [22]. Стоит отметить, что гипотезы, объясняющие явление потенциал-зависимого закрытия каналов порообразующих белков, достаточно противоречивы, как и факты, на которых они основаны. Известно, например, что сильное влияние на величину V_c оказывают заряженные АК-остатки, находящиеся внутри барреля и формирующие электростатическое поле. При этом замена отрицательных и положительно заряженных остатков оказывает различное действие на порины разных типов. Так, PhoE *E. coli*, селективный по отношению к отрицательным ионам, реагирует на замену в петле L3 кислых остатков на нейтральные – понижением V_c , в то время как катион-селективный OmpF *E. coli* – его повышением. Напротив, замена основных остатков в барреле приводит к повышению V_c у PhoE и понижению V_c у OmpF [23].

Тем не менее, исходя из гипотезы о «гибкой» петле L3, противоречивость экспериментальных фактов можно объяснить двойкой ролью заряженных АК-остатков. С одной стороны, эти остатки через водородные и ионные связи с соседними АК-остатками принимают участие в формировании третичной структуры канала и соответственно в стабилизации его открытого состояния. С другой стороны, они являются сенсорами электрического поля и способствуют переходу канала в закрытое состояние. В этом случае их чувствительность по отношению к изменению потенциала на мембране в сочетании с локализацией в длинной и достаточно подвижной петле L3 может вызвать изменение конформации петли L3. Это объясняется тем, что движение молекул через пору сопровождается перераспределением молекул воды (или противоионов) внутри канала и связанной с ним переориентацией боковых цепей АК-остатков в канале. В результате внутри петли L3 могут осущест-

вляться локальные перемещения, приводящие к закрытию поры [13, 24].

В настоящей работе, используя искусственные бислойные липидные мембраны (БЛМ), мы охарактеризовали электрофизиологические свойства каналов порина OmpF из *Y. ruckeri* (YrOmpF) и OmpF из *E. coli* (EcOmpF), а именно, определили величины проводимостей одиночных каналов этих белков и значения критических потенциалов закрытия в нейтральной и слабокислой средах. Исследовано также изменение суммарной проводимости каналов при ступенчатом изменении pH среды до значения pH 3.0. С помощью пространственных моделей YrOmpF и EcOmpF мы провели сравнительный анализ распределения заряженных АК-остатков в устье, вестибуле и внутри канала обоих белков, количественно оценили внутримолекулярные связи петли L3. Учитывая определяющее значение этих данных для характеристики функциональных свойств пориновых каналов, такое сравнение представляло особый интерес, поскольку порин OmpF *Y. ruckeri* отличается по содержанию кислых АК-остатков в петле L3 от классического OmpF *E. coli*. Применение расчетных данных позволило обнаружить более жесткую конформацию петли L3 в YrOmpF, что, очевидно, влияет на стабильность открытого состояния его канала и обуславливает более высокое значение V_c .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Микроорганизмы

В работе использован штамм КММ 821 *Y. ruckeri*. Микроорганизмы культивировали в среде 2×YT при 6°C, как описано в работе [25], и отбирали на логарифмической фазе роста. Затем суспензию клеток центрифугировали при 5000 g, полученный осадок дважды промывали физиологическим раствором.

Получение фракции пептидогликан-ассоциированных белков, выделение и очистка порина YrOmpF

Бактерии *Y. ruckeri* разрушали ультразвуком с помощью дезинтегратора (УЗДН-2Т, Россия) при 44 МГц на ледяной бане (10 раз по 1 мин с перерывом на 1–2 мин для охлаждения смеси). Неразрушенные клетки удаляли центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин, супернатант центрифугировали при 20000 g в течение 1 ч. Полученную в виде осадка фракцию «сырых» мембран обрабатывали 0.5% неионным детергентом октилполиоксиэтиленом (РОЕ) в 10 мМ фосфатном буфере pH 8.5 (буфер А) по методу Гаравито [26]. Наличие целевого белка в экстрактах определяли по данным денатуриру-

ющего электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-ПААГ-электрофореза) [27]. Фракции, содержащие максимальное количество YrOmpF в олигомерной форме, объединяли и очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе CL6B, белок элюировали в буфере А, содержащем 0.1% Zwittergent 3-14, используя градиент NaCl 0.137–0.5 М. Гомогенный электрофоретически чистый YrOmpF элюировался при 0.4 М NaCl, что подтверждено с помощью SDS-ПААГ-электрофореза. Данный образец использовали в электрофизиологических экспериментах.

Электрофизиологические эксперименты

БЛМ формировали по методу Мюллера–Рудина [28] из раствора дифитаноилфосфатидилхолина (DPhPC) в *n*-гептане (5 мг/мл) в тefлоновых ячейках, разделенных перегородкой с отверстиями диаметром 1 мм для суммарного тока и 0.25 мм для одиночных каналов. Водная фаза содержала 0.1 или 1 М KCl в буфере следующего состава: 10 мМ Трис-HCl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланина (pH 7.0, 5.0 и 2.8). Для детекции ионного тока использовали пару электродов Ag/AgCl в режиме фиксации напряжения. Электрод на цис-стороне от мембраны был заземлен, на транс-стороне – подключен к усилителю BC-525C (Warner Instruments, США). Измерения проводили при комнатной температуре. Раствор белка добавляли с цис-стороны ячейки и, поднимая напряжение до 200 мВ, добивались встраивания каналов. Суммарный ток через БЛМ фиксировали при концентрации YrOmpF 50–500 нг/мл, одиночные каналы белка получали при концентрации 5–20 нг/мл. Изменение тока через БЛМ фиксировали в присутствии белка, растворенного в буфере с нейтральным или кислым значением pH и при различных значениях потенциала на мембране (от 50 до 150 мВ).

Теоретический анализ внутримолекулярных связей

Для построения теоретической модели пространственной структуры OmpF *Y. ruckeri* использовали АК-последовательность порина E2FHC9 из базы данных Uniprot [29], а координаты атомов порина OmpF *E. coli* (2OMF PDB ID) использовали в качестве прототипа. Гомологичные модели генерировали с помощью программы МОЕ как описано ранее [30]. Для оптимизации моделей использовали программу МОЕ 2018.0101 и силовое поле Amber10:ЕНТ [31]. Согласно карте Рамачандрана в построенных моделях каналов YrOmpF и EcOmpF порядка 96.4% остатков локализованы в благоприятной конформации, а 3.6% в допустимой. Это указывает на возможность использования данных моделей для дальнейшего исследования.

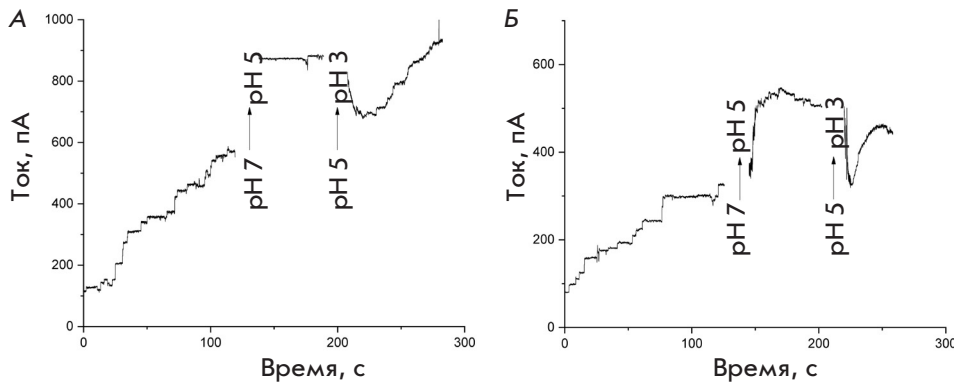


Рис. 1. Проводимость пориновых каналов YrOmpF и EsOmpF, титруемых от pH 7.0 до pH 3.0. Водная фаза: 0.1 М KCl, 10 мМ Трис-HCl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланин, 100 нг/мл белка. Мембранный потенциал 50 мВ. А – OmpF *E. coli*, Б – OmpF *Y. ruckeri*

Энергетический вклад внутримолекулярных нековалентных взаимодействий в формирование структуры порина анализировали и оценивали также с использованием программы MOE 2018.0101 [31]. Оценку геометрических и физико-химических характеристик интерьера поры выполняли с использованием удаленного ресурса MOLE online [32].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофизиологические свойства YrOmpF в нейтральных и кислых средах

На рис. 1 приведены записи изменения суммарной электрической проводимости плоской бислоидной мембраны из DPhPC, находящейся под действием потенциала ± 50 мВ, в присутствии YrOmpF или EsOmpF при различных значениях pH среды. Запись флуктуаций тока (первый отрезок кривых) иллюстрирует активное ступенчатое увеличение проводимости мембраны при введении поринов в концентрации 100 нг/мл в водную фазу (буфер с pH 7.0). Данный эффект, характерный для поринов грамотрицательных бактерий, отображает встраивание функционально активных белковых тримеров.

Для того чтобы оценить возможное влияние кислотности среды на функциональную активность встроенного в липидный бислой YrOmpF, водную фазу, находящуюся в обеих частях ячейки, в ходе эксперимента последовательно подкисляли до значений pH 5.0 и 3.0. Кривые записи тока, представленные на рис. 1Б (второй и третий отрезки), говорят о том, что при уменьшении значения pH среды проводимость мембраны увеличивается. При этом показано, что проводимость одиночного канала не изменяется, значит, данный эффект иллюстрирует резкую активацию встраивания белка в мембрану.

При pH среды 3.0 (третий отрезок на кривой) величина общей проводимости канала YrOmpF резко уменьшалась, постепенно восстанавливаясь в дальнейшем. Запись тока в этих условиях характеризовалась повышенным шумом, что типично для кана-

лов поринов в экстремально кислых условиях среды и связано с быстрым открытием-закрытием каналов.

Следует отметить, что при кратковременной инкубации (в течение мин) белка при низких значениях pH мы не наблюдали снижения суммарной проводимости канала. Однако длительное выдерживание белка в буфере с pH 3.0 перед реконструкцией в БЛМ приводило к потере функциональной активности YrOmpF, которая не восстанавливалась даже после нейтрализации среды (данные не приведены). Вероятно, молекулы исследуемого порина при экстремально кислых значениях pH среды претерпевают значительные конформационные изменения, лишаящие их способности образовывать в мембране проводящие каналы. Очевидно, липидное окружение предохраняет белок от подобных изменений в пространственной структуре, способствует стабилизации их функционально активной конформации, что в результате приводит к сохранению функциональной активности большинства уже встроенных каналов.

Чтобы проследить влияние pH на проводимость одиночного канала YrOmpF и его асимметрию, белок (10 нг/мл) встраивали в мембрану в буфере при pH 7.0 в 0.1 М KCl, затем одновременно подкисляли буфер в обеих ячейках. В ходе этого эксперимента обнаружено, что канал порина обладает небольшой асимметрией проводимости (12%), которая сохранялась и при закислении среды до pH 5.0. Величина проводимости каналов при закислении увеличивалась в среднем на 12% ($n = 4$). Следует сказать, что аналогичная асимметрия канала наблюдалась и в случае порина OmpF *E. coli* [14].

Гистограммы проводимости одиночных каналов YrOmpF и EsOmpF в нейтральной и кислой среде (рис. 2) получали в 0.1 М KCl. Заранее проинкубированные в буферных растворах с различными значениями pH (7.0 и 5.0) образцы белка добавляли с цис-стороны ячейки до конечной концентрации (100 нг/мл) и прикладывали потенциал от 50 до 150 мВ. В ходе эксперимента проанализиро-

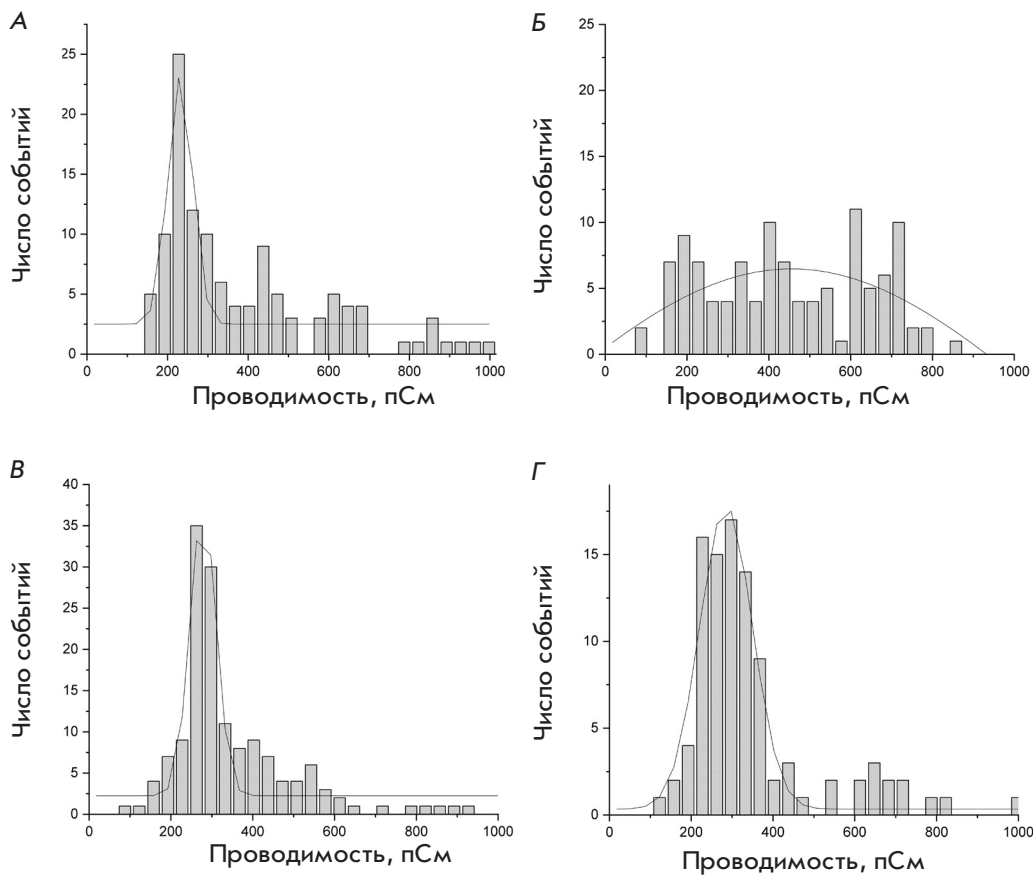


Рис. 2. Распределение уровней проводимости одиночных каналов YrOmpF (A, B) и EcOmpF (B, Г), образованных в БЛМ из DPhPC при реконструкции белка в нейтральной pH 7.0 (A, B) и кислой pH 5.0 (B, Г) среде. Водная фаза: 0.1 М KCl, 10 мМ Трис-HCl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланин, 100 нг/мл белка. Мембранный потенциал 50–150 мВ

ваны данные сотни событий ступенчатого встраивания исследуемых белков.

Показано, что, встраиваясь в модельную мембрану из DPhPC как в нейтральной, так и в кислой среде, YrOmpF образует гетерогенную по проводимости популяцию пор. При pH 7.0 в 0.1 М KCl наибольшее число каналов имеет проводимость в области 230 пСм (рис. 2А), при этом на гистограмме видны минорные пики с кратной проводимостью, соответствующие, очевидно, агрегатам тримеров белка (460 и 690 пСм). С уменьшением значения pH среды до 5.0 (рис. 2Б) гетерогенность каналов YrOmpF по уровню проводимости еще более увеличивалась. На гистограмме появлялись дополнительные пики, а также возрастала доля каналов с проводимостью, кратной основной.

По сравнению с YrOmpF канал EcOmpF обладает меньшей гетерогенностью популяции пор с пиком 276 пСм при pH 7.0 и 285 пСм при pH 5.0. Однако в кислой среде наблюдается более широкое распределение уровней проводимости каналов белка EcOmpF.

Как показано нами ранее, порины иерсиний, особенно непатогенных [33], характеризовались широким разбросом уровней проводимости каналов по сравнению с OmpF *E. coli*. В случае YrOmpF это

может быть связано с тем, что данный порин является белком дикого типа, полученным из мембраны с помощью неионного детергента POE, более мягко действующего на конформацию порина при выделении, нежели ионный детергент SDS. Вследствие этого в образце YrOmpF могут сохраняться ассоциаты тримеров белка с более высоким уровнем проводимости. Описанные выше изменения функциональных свойств YrOmpF под влиянием pH среды обнаруживали и каналы OmpF *Y. pseudotuberculosis* (YrOmpF). Нами показано, что в водном растворе при pH 7.0 этот белок находится преимущественно в виде тримеров, тогда как при pH 3.0 – в мономерной форме [34]. Основные нарушения пространственной организации YrOmpF в кислой среде связаны с уменьшением плотности упаковки бета-барреля и изменением микроокружения ароматических хромофоров в молекуле белка. При низких значениях pH изменения в электростатическом потенциале поверхности белковой молекулы сопровождаются значительными структурными перестройками, что приводит к диссоциации тримеров порина на мономеры [34]. Кроме того, как показано нами ранее, обе молекулярные формы белка (тример и мономер) имели высокое сродство к мембране, но только связывание

тримеров приводило к формированию поринового канала в липидном бислое [35].

Таким образом, на основании экспериментальных данных, полученных на YrOmpF и EcOmpF, а также с учетом результатов более ранних исследований, проведенных на близкородственном порине псевдотуберкулезного микроба, можно сделать следующий вывод. Экстремально низкие значения pH среды приводят к необратимому изменению способности исследуемых поринов встраиваться в модельную мембрану с образованием каналов. Тем не менее, подобные условия не снижают проводимость уже встроенных каналов. Поэтому тенденция пориновых каналов к закрыванию при понижении pH вряд ли способна играть значимую роль в регуляции ионного потока через бактериальную мембрану.

Потенциал-зависимое закрытие каналов YrOmpF

Одно из свойств каналов порообразующих белков грамотрицательных бактерий – их способность переходить в закрытое состояние при увеличении прикладываемого к мембране потенциала. Такое закрытие происходит ступенчато и отражает поочередное закрывание каналов мономеров в тримере белка.

Поскольку каналы YrOmpF проявляли слабую тенденцию к закрыванию, а высокие значения потенциала на мембране (более 220 мВ) часто приводили к значительной активации их встраивания, снятие классических вольт-амперных характеристик представляло определенные экспериментальные сложности. Поэтому способность каналов YrOmpF закрываться под действием потенциала была изучена на уровне одиночных каналов. С этой целью образец YrOmpF в концентрации 5 нг/мл добавляли в ячейку с цис-стороны и повышали потенциал на мембране до 250 мВ, ожидая события встраивания одиночного канала. Затем напряжение сбрасывали до 100 мВ и повышали ступенчато со скоростью 10 мВ/мин. Значение потенциала, которое приводило к стабильному закрытию хотя бы одного мономера, считали критическим потенциалом закрытия (V_c). Подобным образом проанализированы 10 каналов YrOmpF при pH 7.0 и 15 – при pH 5.0, что позволило определить значение V_c в этих условиях. Данную методику определения значения V_c мы использовали и в случае каналов EcOmpF. Полученные значения приведены в таблице.

Характерные записи тока, иллюстрирующие разницу в потенциалах закрытия каналов двух белков, приведены на рис. 3 (не все каналы на приведенных записях являются одиночными).

В ходе эксперимента обнаружено, что каналы YrOmpF имеют необычно высокие значения критического потенциала закрытия по сравнению с кана-

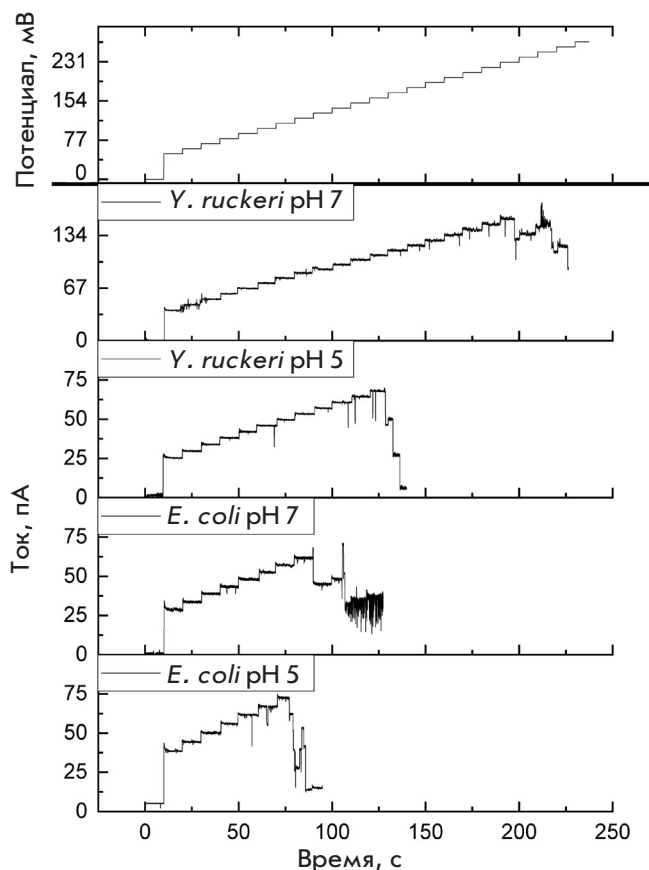


Рис. 3. Проводимость пориновых каналов YrOmpF и EcOmpF при ступенчатом повышении мембранного потенциала. Водная фаза: 0.1 М KCl, 10 мМ Трис-НСl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланин, 10 нг/мл белка. Мембранный потенциал 0, 50–250 мВ

Значения критических потенциалов закрытия исследуемых поринов

Порин	V_c , мВ	
	pH 7.0	pH 5.0
<i>E. coli</i> OmpF	124 ± 6 (n = 10)	103 ± 10 (n = 15)
<i>Y. ruckeri</i> OmpF	232 ± 7 (n = 10)	164 ± 8 (n = 15)

лами EcOmpF (таблица). Кроме того, установлена зависимость этой характеристики канала YrOmpF от кислотности среды, поскольку понижение pH электролита до значения 5.0 приводило к уменьшению V_c . Таким образом, pH-зависимость проводимости каналов исследуемого белка подобна таковой каналов OmpF *E. coli* [36]. Значения V_c , полученные нами для образца EcOmpF, используемого нами, также соответствуют данным [36].

Как известно, функциональные характеристики пориновых каналов определяются, в основном,

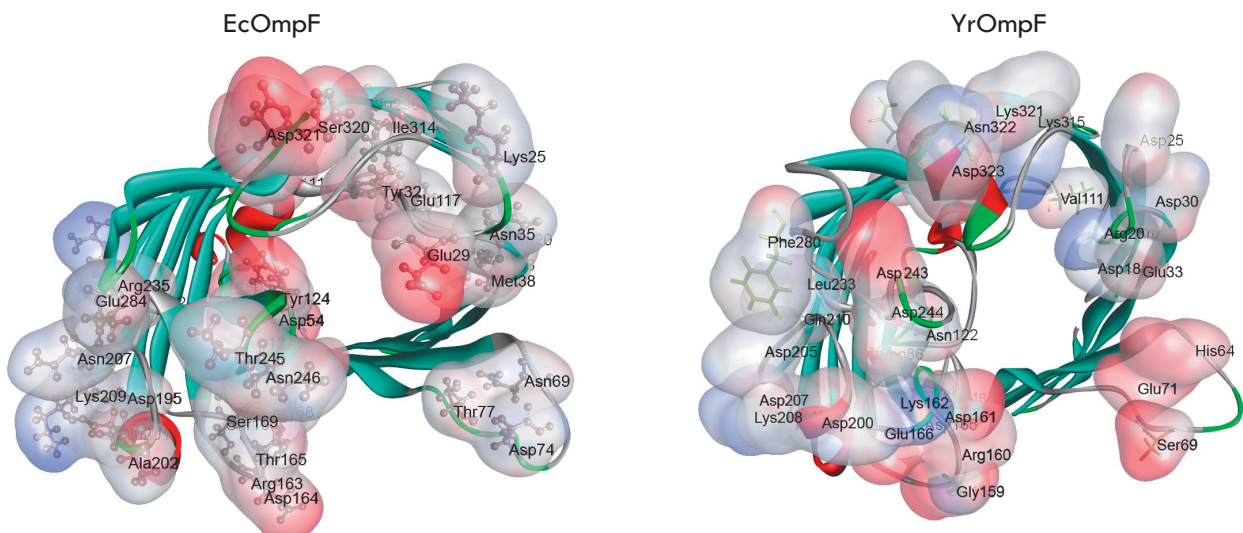


Рис. 4. Диаграмма распределения основных и кислых АК-остатков в переменных областях молекул поринов. Структура белков представлена в виде ленточной диаграммы мономера. Переменные АК-остатки представлены в виде полупрозрачных поверхностей и окрашены согласно заряду: основные – синим, кислые – красным. Боковые цепи АК-остатков EcOmpF и YrOmpF приведены в шаро-стержневом и стержневом представлении соответственно

структурой его зоны сужения, где диаметр бета-барреля существенно уменьшается [7]. Необычная организация зоны констрикции поры с двумя полукольцами противоположного заряда, расположенными друг напротив друга в ограниченном пространстве, генерирует интенсивное электростатическое поле в поре, которое управляет потоком растворенного вещества через канал и соответственно определяет поровую активность конкретного белка.

Катионный кластер на внутренней стенке барреля OmpF *E. coli* сформирован тремя остатками аргинина (Arg42, Arg82 и Arg132), которые фланкированы остатком лизина (Lys16). Во внутренней части барреля OmpF поринов иерсиний, как показано нами ранее [37], как и у OmpF *E. coli*, присутствует положительно заряженный кластер. В YrOmpF этот аргининовый кластер представлен тремя остатками (Arg37, Arg76 и Arg127). Однако в высококонсервативном у поринов участке PEFGG петли L3 [38] кислый остаток Glu117 (присутствующий в OmpF *E. coli*), как и у остальных иерсиний, заменен на нейтральный Val111. Помимо этого, в данной петле в случае YrOmpF отсутствует еще один заряженный остаток: вместо Asp127 (в OmpF *E. coli*) находится Asn122. В итоге вместо шести кислых остатков, локализованных в петле L3 OmpF *E. coli*, YrOmpF содержит только четыре остатка, заряд которых может изменяться в кислой среде.

Известно, что замена заряженных остатков в петле L3 и на противоположных участках бета-барреля в АК-последовательности OmpF *E. coli* приводила к значительным вариациям в величинах V_c . Так, более высокие значения V_c получены для мутантов OmpF *E. coli* с заменами кислых остатков в петле L3 на нейтральные [23]. Таким образом, структурные различия в функционально важных участках петли L3, обнаруженные при сравнительном анализе АК-последовательностей YrOmpF и OmpF *E. coli*, могут быть причиной различий в значениях V_c этих двух белков.

Анализ внутримолекулярных взаимодействий, исходя из теоретических моделей поринов

Чтобы объяснить более высокое значение V_c порина OmpF *Y. ruckeri*, полученное экспериментально, чем у классического OmpF *E. coli*, мы использовали сравнительный анализ распределения зарядов в устье, вестибуле и внутри поры в теоретической модели пространственной структуры этих двух белков, построенной методом гомологичного моделирования.

При выравнивании АК-последовательностей исследуемых белков обнаружено, что первичная структура баррельной части их молекул имеет высокую степень гомологии, однако внешние петли отличаются длиной и АК-составом. Здесь наблюдаются как включения дополнительных остатков, так и делеции. Так, в YrOmpF петля L1 короче на два остатка,

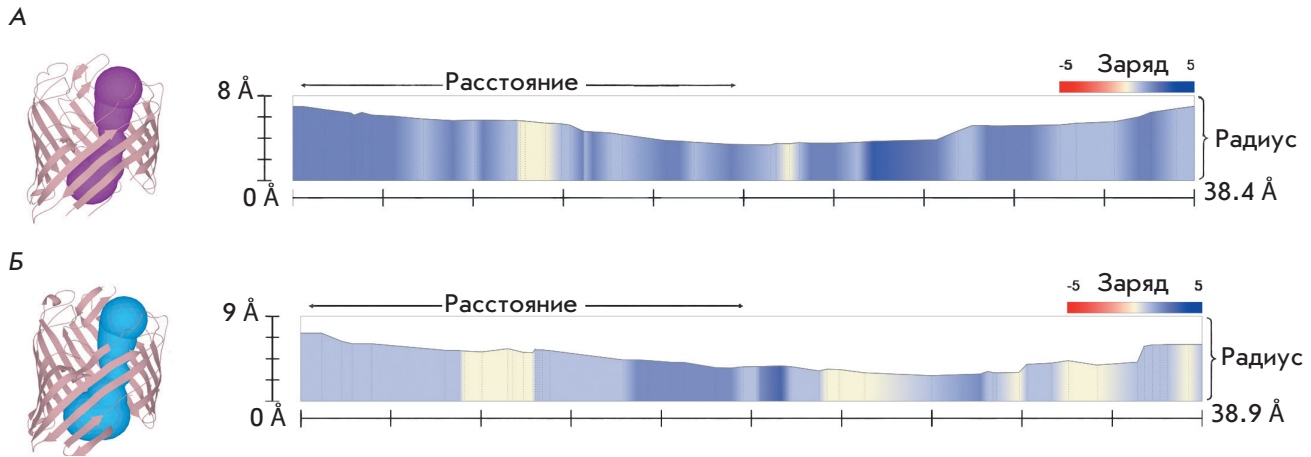


Рис. 5. Геометрические характеристики поры (длина, радиус) и распределение зарядов в интерьере поры. А – EcOmpF; Б – YrOmpF. Слева приведены модели пространственных структур мономеров соответствующих поринов

а петли L4 и L8 содержат соответственно два и четыре дополнительных остатка по сравнению с соответствующими петлями в EcOmpF. Помимо различий в количестве АК-остатков в петлях, формирующих вход в канал, оказалось, что число основных остатков в этой области молекулы EcOmpF заметно меньше, чем у YrOmpF (данные не приведены).

Детальный анализ распределения зарядов, выполненный методом MOLE, выявил существенные различия в количестве и локализации основных и кислых АК-остатков как в области наружных петель, так и внутри поры исследуемых белков (рис. 4 и 5). Так, у EcOmpF в области входа в канал сосредоточено большее количество кислых АК-остатков (рис. 4) и соответственно эта область заряжена более отрицательно по сравнению с YrOmpF. В то же время участки, составляющие внешний вестибуль и зону сужения канала EcOmpF, содержат больше основных АК-остатков и, следовательно, несут более сильный положительный заряд по сравнению с YrOmpF (рис. 5).

Кроме того, несмотря на соизмеримую длину пор (38.9 Å у YrOmpF и 38.4 Å у EcOmpF) исследуемые порины существенно различаются распределением зарядов во внутренней части их каналов. Так, интерьер EcOmpF характеризуется более тонкой структурной организацией с точки зрения чередования положительно и отрицательно заряженных остатков вдоль поры, в то время как на внутренней поверхности канала YrOmpF выявляются более протяженные заряженные участки (рис. 5).

Эти факты вполне могут служить одной из причин различий в величинах потенциалов закрытия рассматриваемых белков. Известны примеры, когда по-

рины Omp-Pst1 и Omp-Pst2 *Providencia stuartii*, имеющие близкое структурное сходство, из-за сильных различий в картине распределения зарядов вдоль стенки их каналов и соответственно силы электростатического взаимодействия внутри поры обладали не только противоположной ион-селективностью, но и существенно различались величиной потенциала закрытия [16].

С другой стороны, известно, что степень конформационной подвижности петли L3 определяется сетью водородных связей и солевых мостиков, существующих между вершиной и основанием L3 и соседней стенкой барреля [39]. Именно сила этих связей влияет на чувствительность поринового канала к напряжению на мембране [16]. Таким образом, особенности внутримолекулярных взаимодействий, связанных с L3, могут играть существенную роль не только в проводимости поры, но и в процессе включения-выключения канала под действием напряжения. Как сказано выше, среди существующих объяснений закрытия пориновых каналов под действием потенциала одной из наиболее обоснованных выглядит гипотеза «гибкой» петли L3. Благодаря способности к значительным флуктуациям, эта петля может изменять пространственную ориентацию под действием приложенного к мембране напряжения, что приводит к перекрытию потока ионов. Если эта гипотеза верна, то различие в величине потенциала закрытия у поринов YrOmpF и EcOmpF должно зависеть от степени стабильности конформации петли L3. А это у обоих белков определяется контактами и связями, которые существуют между конкретными АК-остатками в петле L3 и остатками в составе других петель и стенке барреля.

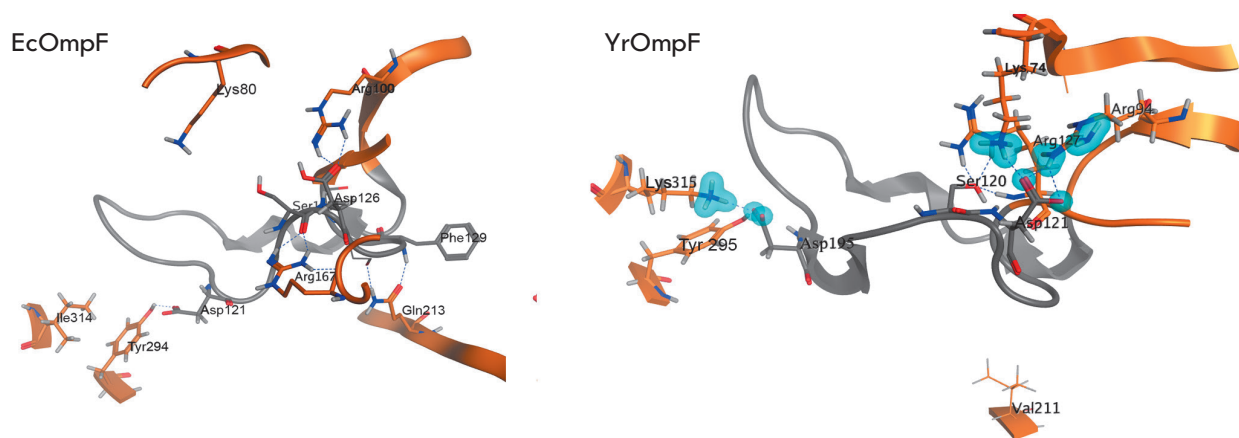


Рис. 6. Внутримолекулярные нековалентные взаимодействия функционально важных остатков петли L3 поринов EcOmpF и YrOmpF. Элементы вторичной структуры представлены в виде ленточной диаграммы, функционально важные АК-остатки приведены в стержневом представлении. Элементы петли L3 окрашены серым, β -тяжей и других петель – коричневым. Водородные связи представлены синей пунктирной линией, ионные взаимодействия – голубыми контурами

В ходе анализа внутримолекулярных взаимодействий между остатками петель L3 у рассматриваемых поринов установлено, что общее их число значительно различается. Так, в EcOmpF положение этой петли стабилизируют 23 нековалентных взаимодействия с общим энергетическим вкладом -63.8 ккал/моль, в то время как конформацию петли L3 YrOmpF определяют 35 взаимодействий, энергия которых имеет величину порядка -131.6 ккал/моль.

Согласно расчетным данным, в порине *E. coli* между вариабельными остатками Arg167 (Val163 в YrOmpF) и Gln213 (Ala215 в YrOmpF), локализованными соответственно в петле L4 и тяже β 10, и консервативными остатками Ser125 (Ser120 в YrOmpF) и Phe129 (Phe123 в YrOmpF) в петле L3 существуют водородные связи (рис. 6). Их наличие приводит к такой конформации боковой цепи консервативного остатка Asp126 в EcOmpF, которая препятствует образованию как солевых мостиков (с боковыми цепями Lys80), так и возникновению дополнительных водородных связей с Arg100 (образуются только две водородные связи). В то же время консервативный остаток Asp121 в петле L3 YrOmpF, соответствующий Asp126 в EcOmpF, образует пять солевых мостиков и четыре водородные связи с Arg94 в тяже β 5 (соответствует Arg100 в EcOmpF) с общим вкладом порядка -17.563 ккал/моль. Кроме того, между Asp121 и Lys74 в тяже β 4 порина *Y. ruckeri* (Lys80 в EcOmpF) образуется еще одна водородная связь с вкладом -13.8 ккал/моль (рис. 6).

На другом участке петли L3 замена Ile314 (в EcOmpF) на Lys315 (в YrOmpF) приводит к изме-

нению паттерна взаимодействий консервативного остатка Asp115 (соответствует Asp121 в EcOmpF) в петле L3 порина YrOmpF. В результате, помимо консервативных для данных поринов взаимодействий связи Asp115 с Tyr295 (-38.27 ккал/моль), Asp115 в YrOmpF образует сеть очень энергоемких водородных связей и ионных взаимодействий (-10, -6.355 и -2.652 ккал/моль) с боковой цепью Lys315 в тяже β 15, отсутствующих в EcOmpF (рис. 6).

Таким образом, расчетные данные свидетельствуют о том, что петля L3 YrOmpF имеет более стабильную конформацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов электрофизиологических экспериментов обнаружено аномально высокое значение критического потенциала закрытия канала OmpF *Y. ruckeri* по сравнению с порином *E. coli*. Теоретический анализ распределения зарядов в участках пространственной структуры поринов, важных для канальной проводимости, а также количественная оценка внутримолекулярных связей внутри пор YrOmpF и EcOmpF позволили выявить существенные различия в полярных взаимодействиях между АК-остатками петли L3 и барреля. В случае YrOmpF конформационная подвижность петли L3 значительно более ограничена, что может быть причиной необходимости приложения дополнительного (по сравнению с порином *E. coli*) потенциала для перехода канала YrOmpF в закрытое состояние.

Полученные результаты вносят вклад в изучение молекулярных механизмов проводимости каналов

неспецифических поринов грамотрицательных бактерий. В качестве биологических нанопор эти белки представляют интерес для применения в нанотехнологии и наномедицине. Основой этого служит их способность изменять проводимость в ответ на любое внешнее воздействие и/или присутствие аналита. В связи с этим детальное изучение структурных основ функционирования порообразующих белков

позволит более осмысленно подходить к конструированию биологических сенсоров с заданными свойствами. ●

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00318).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ross A.J., Rucker R.R., Ewing W.H. // Can. J. Microbiol. 1966. V. 12. № 4. P. 763–770.
- Rucker R.R. // Bull. Off Int. Epizoot. 1966. V. 65. № 5. P. 825–830.
- Hunter V.A., Knittel M.D., Fryer J.L. // J. Fish Dis. 1980. V. 3. № 6. P. 467–472.
- Coquet L., Cosette P., Junter G.A., Beucher E., Saiter J.M., Jouenne T. // Colloids and Surfaces B. 2002. V. 26. P. 373–378.
- Nikaido H. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 6. P. 3905–3908.
- Koebnik R., Locher K.P., van Gelder P. // Mol. Microbiol. 2000. V. 37. № 2. P. 239–253.
- Cowan S.W., Schirmer T., Rummel G., Steiert M., Ghosh R., Paupit R.A., Jansonius J.N., Rosenbusch J.P. // Nature. 1992. V. 358. № 6389. P. 727–733.
- Xu G., Shi B., McGroarty E.J., Ti Tien H. // Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes. 1986. V. 862. № 1. P. 57–64.
- Lahey J.H., Pattus F. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 186. № 1–2. P. 303–308.
- Morgan H., Lonsdale J.T., Alder G. // Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes. 1990. V. 1021. P. 175–181.
- Todt J.C., McGroarty E.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992. V. 189. № 3. P. 1498–1502.
- Jones C.M., Taylor D.M. // Thin Solid Films. 1996. V. 284–285. P. 748–751.
- Delcour A.H. // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 151. № 2. P. 115–123.
- Nestorovich E.M., Rostovtseva T.K., Bezrukov S.M. // Biophys. J. 2003. V. 85. № 6. P. 3718–3729.
- Nikaido H. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. № 4. P. 593–656.
- Song W., Bajaj H., Nasrallah C., Jiang H., Winterhalter M., Colletier J.-P., Xu Y. // PLoS Comput. Biol. 2015. V. 11. № 5. P. e1004255.
- Sen K., Hellman J., Nikaido H. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 3. P. 1182–1187.
- Watanabe M., Rosenbusch J.P., Schirmer T., Karplus M. // Biophys. J. 1997. V. 72. № 5. P. 2094–2102.
- Phale P.S., Schirmer T., Prilipov A., Lou K.L., Hardmeyer A., Rosenbusch J.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. № 13. P. 6741–6745.
- Bainbridge G., Mobasher H., Armstrong G.A., Lea E.J., Lakey J.H. // J. Mol. Biol. 1998. V. 275. № 2. P. 171–176.
- Soares C.M., Björkstén J., Tapia O. // Protein Eng. 1995. V. 8. № 1. P. 5–12.
- van Gelder P., Saint N., Boxtel R., Rosenbusch J.P., Tommassen J. // Protein Eng. 1997. V. 10. № 6. P. 699–706.
- van Gelder P., Saint N., Phale P., Eppens E.F., Prilipov A., van Boxtel R., Rosenbusch J.P., Tommassen J. // J. Mol. Biol. 1997. V. 269. № 4. P. 468–472.
- Eppens E.F., Saint N., van Gelder P., van Boxtel R., Tommassen J. // FEBS Lett. 1997. V. 415. № 3. P. 317–320.
- Чистюлин Д.К., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Хоменко В.А., Вакорина Т.И., Ким Н.Ю., Исаева М.П., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. // Биол. мембраны. 2012. Т. 29. № 3. С. 156–164.
- Garavito R.M., Rosenbusch J.P. // Methods Enzymol. 1986. V. 125. P. 309–328.
- Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
- Mueller P., Rudin D.O., Ti Tien H., Wescott W.O. // Nature. 1962. V. 194. P. 979–980.
- Stenkova A.M., Isaeva M.P., Shubin F.N., Rasskazov V.A., Rakin A.V. // PLoS One. 2011. V. 6. № 5. P. e20546.
- Лихацкая Г.Н., Чистюлин Д.К., Ким Н.Ю., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д. // Биофизика. 2016. Т. 61. № 6. С. 1088–1097.
- Chemical Computing Group (CCG) <http://www.chemcomp.com> [Molecular Operating Environment (MOE)], 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018.
- Pravda L., Sehnal D., Toušek D., Navrátilová V., Bazgier V., Berka K., Svobodová Vařeková R., Koča J., Otyepka M. // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. № W1. P. W368–W373.
- Вострикова О.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Гузев К.В., Вакорина Т.И., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. // Биоорганическая химия. 2006. Т. 32. № 4. С. 371–383.
- Новикова О.Д., Ким Н.Ю., Лукьянов П.А., Лихацкая Г.Н., Емельяненко В.И., Соловьева Т.Ф. // Биол. мембраны. 2007. Т. 24. № 2. С. 159–168.
- Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Naberezhnykh G.A., Khomenko V.A., Gorbach V.I., Firsov A.M., Zelepuga E.A., Antonenko Yu.N., Novikova O.D. // Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes. 2016. V. 1858. № 4. P. 883–891.
- Saint N., Lou K.L., Widmer C., Luckey M., Schirmer T., Rosenbusch J.P. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 34. P. 20676–20680.
- Likhatskaya G.N., Solov'eva T.F., Novikova O.D., Issaeva M.P., Gusev K.V., Kryzhko I.B., Trifonov E.V., Nurminski E.A. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2005. V. 23. № 2. P. 163–174.
- Jeanteur D., Lakey J.H., Pattus F. // Mol. Microbiol. 1991. V. 5. № 9. P. 2153–2164.
- Karshikoff A., Spassov V., Cowan S.W., Ladenstein R., Schirmer T. // J. Mol. Biol. 1994. V. 240. № 4. P. 372–384.