

УДК 541.64:547.96

ФОРМИРОВАНИЕ ФИБРИЛЛ ЛИЗОЦИМА НА ТВЕРДОЙ ПОДЛОЖКЕ¹ В УСЛОВИЯХ, ПРИ КОТОРЫХ ОНИ НЕ ОБРАЗУЮТСЯ В РАСТВОРЕ¹

© 2007 г. Е. В. Украинцев*,***, Г. А. Киселев*,***,
А. А. Кудринский**, Г. В. Лисичкин**, И. В. Яминский*,***

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.
Физический* и химический** факультеты
119992 Москва, Ленинские горы

***Общество с ограниченной ответственностью "Академия биосенсоров"
119311 Москва, ул. Строителей, 4-5-47

Поступила в редакцию 20.04.2006 г.

Принята в печать 24.08.2006 г.

С помощью атомно-силового микроскопа ФемтоСканTM исследовано формирование фибрилл лизоцима на твердой подложке. Обнаружено, что при комнатной температуре и pH 3 буферного раствора, т.е. в условиях, при которых агрегация в растворе не происходит, на поверхности может наблюдаться образование фибрилл. Установлено, что близость молекул лизоцима к поверхности графита способствует их агрегации. Физическая сорбция лизоцима на поверхность золота не приводит к его агрегации, а химическая прививка лизоцима к поверхности золота способствует образованию фибрилл. На Атомных весахTM измерена сила взаимодействия молекул лизоцима, иммобилизованных на золотой поверхности кантилевера.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование агрегации лизоцима в растворе было проведено несколькими группами ученых [1, 2]. Агрегация молекул лизоцима, как и амилоид-β-пептида, является следствием перехода молекул белка в состояние с неправильной укладкой, который происходит при понижении pH среды [3]. Некоторые заболевания, такие как амилоидозы, синдромы Альцгеймера и Паркинсона, связаны с тем, что молекулы белка, утратившие под влиянием разных факторов нативную трехмерную структуру, собираются в стабильные, упорядоченные, состоящие из волокон агрегаты, называемые амилоидными фибриллами [4]. Для разработки методов предупреждения и лечения таких заболеваний важно установление механизма и факторов, влияющих на взаимодействие между молекулами полипептидов. Цель настоящей работы – изучение влияния pH, типа поверхности и химической прививки на межмолекулярные взаимодействия между молеку-

лами лизоцима. Показано, что ковалентная прививка лизоцима по использованной в работе методике не препятствует агрегации. Напротив, агрегация иммобилизованного белка протекает быстрее и в более мягких условиях, чем в растворе; физическая сорбция также способствует агрегации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Иммобилизация лизоцима

Очистку кремниевых кантилеверов fpC01 (Научно-исследовательский институт физических проблем им. Ф.В. Лукина, длина 350 мкм, ширина 35 мкм, $k = 0.03$ Н/м), с одной стороны покрытых золотом, производили смесью равных объемов концентрированной серной кислоты и 30%-ного водного раствора пероксида водорода.

Для иммобилизации лизоцима из белка куринных яиц на золотой поверхности кантилевер обрабатывали последовательно раствором 4-амино-тиофенола в метаноле (50 ммоль/л) в течение 17 ч, 5%-ным водным раствором глутарового альдегида в течение 2 ч и раствором лизоцима (10 мг/мл) в ацетатном буферном растворе (150 ммоль/л, pH 4.5) в течение 1 ч. Для блокировки непрореагировавших альдегидных групп кан-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 04-03-32472-а) и Фонда содействия развитию малых предприятий в научно-технической сфере (код проекта 4994).

E-mail: ukrainsts@polly.phys.msu.ru (Украинцев Егор Владиславович).

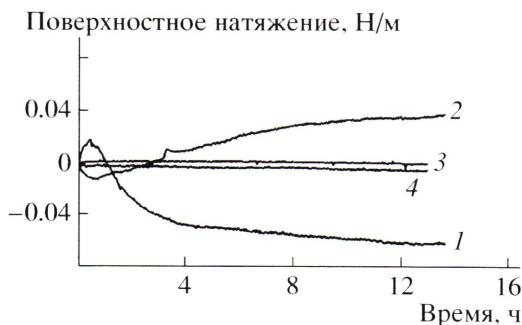


Рис. 1. Временна́я зависимость поверхностного натяжения пленки лизоцима, находящейся на золотой (1) и кремниевой (2) поверхности кантилевера; 3, 4 – результаты соответствующих контрольных экспериментов, в которых кантилевер не обрабатывали лизоцимом.

тилевер обрабатывали буферным раствором на основе *трикс*-гидроксиметиламинометана ($\text{pH} 4.5$) в течение 1 ч.

Для иммобилизации лизоцима на кремниевой поверхности кантилевер модифицировали раствором 3-аминопропилсилатрана в воде (167 мкмоль/л) в течение 1 ч [5], а затем растворами глутарового альдегида и лизоцима и *трикс*-гидроксиметиламинометана, как описано выше.

Иммобилизацию лизоцима на свежесколотой поверхности слюды и на слюде с напыленным на ней золотом проводили аналогично модификации кантилевера. Тонкую золотую пленку толщиной ~30 нм напыляли на свежесколотую поверхность слюды при помощи ионного напылителя Eiko IB-3.

Физическую сорбцию лизоцима с концентрацией 1 мг/мл из глицинового буферного раствора с $\text{pH} 3.0$ на свежесколотую поверхность графита, слюды, слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана и золота осуществляли в течение 7 дней.

Измерение поверхностного натяжения пленки на поверхности кантилевера

Для определения поверхностного натяжения пленки на поверхности кантилевера использовали устройство Атомные весы™ [6], представляющее собой тефлоновую измерительную ячейку объемом 200 мкл, в которую помещается кантилевер, и оптическую систему, состоящую из лазера и фотодиода; с ее помощью регистрировали

отклонение кантилевера. Поверхностное натяжение пленки рассчитывали по формуле Стони [7]:

$$\Delta\sigma = \frac{Ed^2}{3(1-\nu)l^2}\Delta z,$$

где $\Delta\sigma$ – разница сил поверхностного натяжения между верхней плоскостью кантилевера, имеющей специфическое покрытие, и его нижней поверхностью, на которой покрытие отсутствовало; l и d – длина и толщина прямоугольного кантилевера соответственно; ν и E – коэффициент Пуассона и модуль Юнга материала кантилевера соответственно; Δz – величина отклонения кантилевера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование поверхностного натяжения пленок лизоцима

Из анализа спектров кругового дихроизма раствора лизоцима известно, что при $\text{pH} < 3.8$ при повышенной температуре нативная структура лизоцима разрушается и молекулы белка переходят в состояние с неправильной укладкой [2]. Поэтому влияние кислотности среды на агрегацию лизоцима было исследовано при значениях $\text{pH} 3.0$ и 4.5 , т.е. соответственно выше и ниже pH конформационного перехода белка. Все эксперименты проводили при комнатной температуре.

Кантилевер с иммобилизованным на золотой поверхности лизоцимом был помещен в глициновый буферный раствор (150 ммоль/л, $\text{pH} 3.0$). На рис. 1 показано изменение поверхностного натяжения пленки лизоцима на кантилевере. Целиком процесс изгиба кантилевера в сторону золота при комнатной температуре занял несколько часов. Наблюдаемое явление объясняется тем, что при помещении кантилевера в буферный раствор соседние молекулы белка начинают взаимодействовать друг с другом, поверхностное натяжение пленки увеличивается, и кантилевер изгибается в сторону золотой поверхности, покрытой лизоцимом. Через некоторое время большинство молекул объединяется в агрегаты. После этого процесс изгиба кантилевера происходит медленнее, при этом, по данным атомно-силовой микроскопии, на поверхности кантилевера начинают образовываться фибрillы. В контролльном эксперименте, в котором отсутствовал этап модификации кантилевера раствором лизоцима, было установлено, что кан-

тилевер не изменяет свою форму. Следовательно, деформация кантителевера связана с взаимодействием молекул белка на поверхности.

Из данных по изгибу кантителевера была оценена сила взаимодействия между двумя молекулами лизоцима. Усредненная сила поверхностного натяжения σ пленки лизоцима, иммобилизованного на золотой поверхности, равна $0.065 \pm 0.010 \text{ Н/м}$. Результирующая сила взаимодействия, приходящаяся на одну молекулу белка и дающая вклад в поверхностное натяжение, составляет $F_1 = \sigma h = 195 \pm 40 \text{ пН}$. Расстояние между отдельными мономерными звеньями было принято равным высоте отдельного звена, $h = 3.0 \pm 0.2 \text{ нм}$. При расчете силы взаимодействия двух молекул F_2 учитывалось, что при образовании плотнейшего монослоя, состоящего из белковых глобул, каждая молекула взаимодействует с шестью соседними. Из принятой модели гексагональной упаковки следует, что результирующую силу F_1 можно разложить по базису сил парных взаимодействий молекул (рис. 2), тогда

$$F_2 = \frac{F_1}{2 \cos(\pi/6)} = 113 \pm 24 \text{ пН}.$$

Полученная сила значительно меньше, чем сила взаимодействия между покрытыми лизоцимом слюдой и кантителевером при pH 3.0, которая составила 1100 пН [2]. Вероятно, это объясняется тем, что в данных экспериментах было исследовано адгезионное взаимодействие между образцом и кантителевером, которое не связано с взаимодействием между отдельными молекулами белка, так как оно появляется и при отсутствии белка на поверхности [3]. Полученное нами значение силы очень близко к силе ($F_{T4} = 64 \pm 16 \text{ пН}$), которую нужно приложить к агрегату, состоящему из нескольких мономерных звеньев лизоцима T4, чтобы разорвать связь между 21 и 124 остатками одного звена и увеличить тем самым контурную длину агрегата на $36 \pm 5 \text{ нм}$ [8].

При помещении кантителевера с лизоцимом, иммобилизованным на золотой поверхности, в ацетатный буферный раствор с pH 4.5 в течение 8 ч изгиба кантителевера не наблюдалось. При этом после замены ацетатного буферного раствора на глициновый с pH 3.0 кантителевер деформировался в сторону золота. Изгиб кантителевера при pH 3.0 и отсутствие изгиба при pH 4.5 согласуется с тем, что при понижении кислотности среды ниже 3.8 в лизоциме наблюдается конформационный переход из нативного состояния в состояние с неправиль-

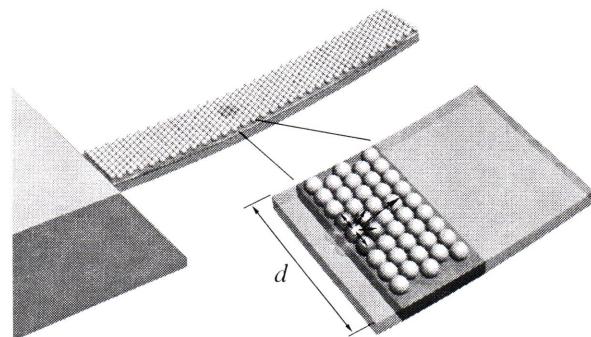


Рис. 2. Модель структуры слоя лизоцима. d – ширина кантителевера. Короткие стрелки – направление сил межмолекулярных взаимодействий, длинная стрелка – направление результирующей силы.

ной укладкой, скорее всего, сопровождающейся увеличением вероятности образования связи между двумя молекулами лизоцима и их агрегацией.

Для изучения влияния способа иммобилизации на агрегацию белок был ковалентно закреплен на кремниевой поверхности кантителевера. При помещении такого кантителевера в глициновый буферный раствор с pH 3.0, не содержащий лизоцима, происходил изгиб кантителевера в сторону кремния (рис. 1), а при pH 4.5 изгиба не наблюдалось.

Таким образом, лизоцим, иммобилизованный с помощью глутарового альдегида на различных аминированных поверхностях, агрегирует при комнатной температуре при pH 3.0, причем процесс агрегации сопровождается усилением межмолекулярных взаимодействий в слое белка. Вместе с тем утверждается [2], что прикрепление молекул белка к поверхности предотвращает их агрегацию. Это может быть справедливо для поверхности с расстоянием между иммобилизованными белковыми молекулами 10–30 нм [2, 9], которая получается при обработке слюды 3-аминопропилтриэтоксисиланом из газовой фазы [9]. При последовательной обработке поверхности водными растворами 3-аминопропилсилатрана и глутарового альдегида плотность прививки лизоцима, скорее всего, выше, и иммобилизация лизоцима на поверхности золота не препятствует его агрегации. Напротив, на поверхности кантителевера процесс агрегации протекает быстрее и в более мягких условиях (~12 ч при комнатной температуре), чем в растворе, где процесс образования фибрилл осуществляется только при повышенной температуре (57°C) и занимает несколько суток [1, 2].

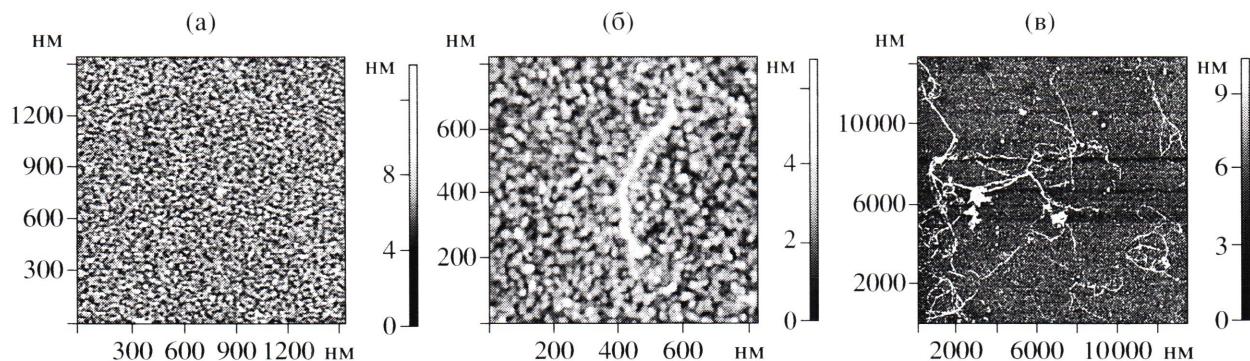


Рис. 3. Изменение формы агрегатов лизоцима на поверхности золота в течение 1 мин (а), 4.5 (б) и 12 ч (в).

Из спектров кругового дихроизма известно, что в растворе при комнатной температуре при pH 3.0 лизоцим находится в нативном состоянии [1], и, следовательно, не должен агрегировать. Действительно, агрегации лизоцима в глициновом буферном растворе при комнатной температуре за 14 суток не происходит (данные не приведены). В то же время эксперименты показывают, что белок, закрепленный на поверхности, в таких условиях агрегирует. Возможной причиной агрегации иммобилизованного лизоцима может быть переход белка при иммобилизации на поверхности из нативной конформации в состояние с неправильной укладкой. Такое состояние, при комнатной температуре неустойчивое в растворе, на поверхности может стабилизироваться ковалентными связями белка с поверхностью. Кроме того, ковалентное закрепление лизоцима через аминогруппы уменьшает суммарный положительный заряд молекулы белка при pH 3.0. При этом силы элек-

тростатического отталкивания между молекулами лизоцима также уменьшаются, что является дополнительным фактором, способствующим агрегации. Для проверки этой гипотезы необходимо проведение дополнительных экспериментов по изучению конформации иммобилизованного лизоцима.

Исследование топографического рельефа поверхности с помощью атомно-силового микроскопа

Для получения дополнительной информации об агрегации лизоцима, иммобилизованного на поверхности, были проведены исследования поверхности с помощью атомно-силового микроскопа ФемтоСканTM.

Три образца позолоченной слюды с нанесенным на нее лизоцимом, находившиеся в глициновом буферном растворе с pH 3.0 в течение 1 мин, 4.5 и 19 ч, исследовали на воздухе в режиме прерывистого контакта [10]. На них обнаружены фибриллы длиной до 10 мкм и высотой 2–10 нм. Поверхностная плотность фибрилл составляла 0, 0.1 и 1 мкм⁻² соответственно (рис. 3).

Также были исследованы три образца слюды с нанесенным на нее лизоцимом, находившиеся в глициновом буферном растворе с pH 3.0. Отличие этих результатов от предыдущих состоит в том, что процесс агрегации лизоцима на слюде происходил медленнее, чем на золоте, что согласуется с кинетическими данными агрегации лизоцима на поверхностях кантилевера (рис. 1).

Как показали эксперименты, в процессе агрегации большую роль играют два фактора: близость поверхности и химическая прививка. Для изучения влияния близости поверхности и химической прививки на агрегацию лизоцима были

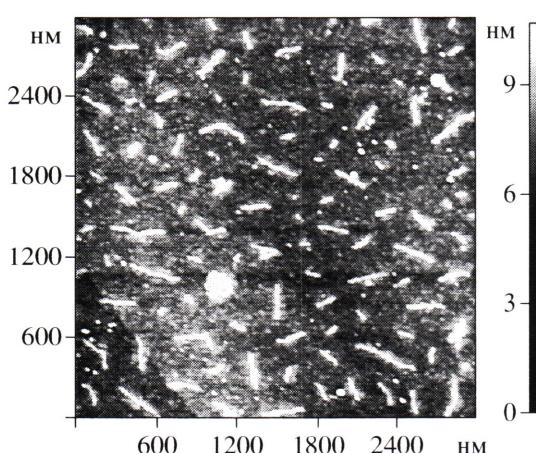


Рис. 4. Фибриллы лизоцима на поверхности графита, образовавшиеся вследствие физической адсорбции белка на поверхность.

проводены эксперименты по физической сорбции лизоцима на свежесколотую поверхность графита, слюды, слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана и золота. Через 7 дней на поверхности графита появились фибриллы длиной 300 и высотой 2 нм с поверхностной плотностью около 10 мкм^{-2} (рис. 4). Похожие результаты были получены в экспериментах с амилоид- β -пептидом [11].

Однако на поверхностях слюды, слюды со слоем 3-аминопропилсилатрана и золота поверхностная плотность фибрилл составила всего 0.01 мкм^{-2} . Сравнение этих результатов с данными, полученными ранее на слюде и золоте с химически привитым лизоцимом, свидетельствует о том, что химическая прививка играет большую роль в агрегации лизоцима, находящегося на поверхности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Промоделировано влияние близости поверхности и химической прививки на конформацию и поведение белков, склонных к агрегации. Обнаружена агрегация лизоцима, иммобилизованного на поверхности золота, слюды, кремния и графита, происходящая в условиях, при которых агрегация белка в растворе не наблюдается (рН 3.0, комнатная температура). На поверхности молекулы лизоцима объединяются в фибриллы, причем за более короткое время и при более низкой температуре, чем при агрегации в растворе. Оценена сила взаимодействия двух молекул лизоцима, иммобилизованных на золотой и кремниевой поверхностях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnaudov L.N., de Vries R. // Biophys J. 2005. V. 88. P. 515.
2. McAllister C., Karymov M., Kawano Y., Lushnikov A.Y., Mikheikin A., Uversky V.N., Lyubchenko Y.L. // J. Molec. Biology. 2005. V. 354. № 5. P. 1028.
3. Kransnoslobodtsev A., Shlyakhtenko L.S., Ukrantsev E., Zaikova T.O., Keana J.F.W., Lyubchenko Y.L. // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2005. V. 1. P. 300.
4. Uversky V.N. // Cell. Mol. Life Sci. 2003. V. 60. P. 1852.
5. Shlyakhtenko L.S., Potaman V.N., Sinden R.R., Gall A.A., Lyubchenko Y.L. // Nucleic Acids Research. 2000. V. 28. № 18. P. 3472.
6. Киселев Г.А., Багров Д.В., Горелкин П.В., Яминский И.В. // Сенсор. 2005. № 4. С. 22.
7. Stoney G.G. // Proc. Roy. Soc. London. A. 1909. V. 82. P. 172.
8. Yang G., Cecconi C., Baase W.A., Vetter I.R., Breuer W.A., Haack J.A., Matthews B.W., Dahlquist F.W., Bustamante C. // Proc. National Academy of Sciences. 2000. V. 97. № 1. P. 139.
9. Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 496.
10. Филонов А.С., Гаврилко Д.Ю., Яминский И.В. Программное обеспечение для обработки трехмерных изображений "ФемтоСкан Онлайн". М.: Центр перспективных технологий, 2005. 89 с. (<http://www.nanoscopy.net>).
11. Kowalewski T., Holtzman D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 3688.

Formation of Lysozyme Fibrils on a Solid Support under Conditions When They Are Not Formed in Solution

E. V. Ukrantsev^{a,c}, G. A. Kiselev^{a,c}, A. A. Kudrinskii^b, G. V. Lisichkin^b, and I. V. Yaminskii^{a,c}

^a Faculty of Physics, Moscow State University,
Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia

^b Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia

^c OOO Academy of Biosensors,
ul. Stroitelei 4, Moscow, 119311 Russia
e-mail: ukrants@polly.phys.msu.ru

Abstract—The formation of lysozyme fibrils on a solid support was studied using a FemtoScanTM atomic force microscope. It is found that, at room temperature and pH 3, i.e., under conditions when the aggregation in solution is absent, the fibrils can be formed on the surface. It is shown that the proximity of lysozyme molecules to the surface favors their aggregation. The physical sorption of lysozyme on the gold surface does not result in its aggregation, and the chemical grafting of lysozyme to the gold surface is favorable for the fibril formation. The force of interaction of lysozyme molecules immobilized on the gold surface of a cantilever was measured on an Atomic BalanceTM.