

УДК 57.011

РОЛЬ КАРДИОЛИПИНА В СБОРКЕ ПОРИНА OMPF E.COLI**Иванова В.В., Невзорова Т.А., Богданов М.В.***ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,
Казань, e-mail: jassyra@mail.ru*

Роль фосфолипидного окружения в системе транслокации и фолдинга неспецифических транспортеров не известна. Выявлено, что кардиолипид как один из структурных элементов биологических мембран *E.coli* необходим для сборки порина OmpF, оказывая стабилизирующее действие на организацию данного мембранного белка. Отсутствие кардиолипина приводит к распаду тримерной нативной формы порина на отдельные мономеры. Очевидно, что функция порина OmpF в данных условиях нарушена, что приводит к ослаблению энергетического баланса мутантных клеток, транспорта веществ через мембрану. При этом мутант, не имеющий кардиолипина в мембране, может отличаться по своим иммунологическим и патогенным свойствам. Регуляция липидного микроокружения бактерий может способствовать вариации в стабильности их мембранных белков, что имеет большое практическое применение.

Ключевые слова: *E.coli*, кардиолипид, OmpF, SecYEG**THE ROLE OF CARDIOLIPIN IN THE ASSEMBLY OF PORIN OMPF E.COLI****Ivanova V.V., Nevzorova T.A., Bogdanov M.V.***Kazan (Volga Region) federal university, Kazan, e-mail: jassyra@mail.ru*

The role of phospholipids in the environment of translocation system and folding of nonspecific transporters is still not known. It was found that cardiolipin as one of the structural components of biological membranes is required for OmpF porin assembly, exerting a stabilizing effect on organization of that membrane protein. Absence of cardiolipin leads to disintegration of the native trimeric form of OmpF into individual monomers. It is obvious that function of porin OmpF is disrupted under these conditions resulting in energy balance decline of mutant cells and transport through the membrane. And mutants with absence of cardiolipin in the membranes may differ in immunological and pathogenic properties. Regulation of bacterial lipid microenvironment might contribute to variations in stability of membrane proteins that is great practical use.

Keywords: *E.coli*, cardiolipin, OmpF, SecYEG

Неспецифические транспортеры, или порины, грамотрицательных бактерий, в том числе и *E.coli*, являются основными белками наружной мембраны и образуют каналы для диффузии низкомолекулярных соединений (Achoiak и соавт., 2001).

Порины относятся к β -структурированным мембранным белкам, которые в наружных мембранах грамотрицательных бактерий существуют в виде тримеров, устойчивых к действию денатурирующих агентов и протеолитических ферментов (Garavito и Rosenbusch, 1986).

Кардиолипид входит в состав бактериальных мембран и является важным звеном многих биологических процессов, таких как трансляция, транслокация и фолдинг белков, а также энергетический и ионный обмен, являясь структурным и функциональным компонентом многих белковых комплексов (Gold и соавт., 2010).

В настоящее время также существуют данные, полученные *in vitro*, о том, что анионный дифосфатидилглицерин, или кардиолипид, может принимать участие в работе транслокона SecYEG, необходимого для дальнейшего фолдинга и транспортировки пробелков и поринов к наружной мембране *E. coli*, в том числе и порина OmpF.

Целью настоящего исследования было изучение роли кардиолипина в сборке и транслокации порина OmpF *in vivo*.

Материалы и методы исследования*Штаммы*

Объектом исследования были выбраны: дикий тип *E.coli* W3110, происходящий от штамма K12, и его мутант BKT12 с делециями кардиолипинсинтаз *clsA*, *clsB*, *clsC*, полученный методом трансформации (Klebba и соавт., 1990).

Клетки W3110 и BKT12 были рассеяны из глицеринового столбика на чашки с агаризованной средой Лурия–Бертани (ЛБ) и выращивались в течение 24 ч при 37°C, затем инокулированы на жидкую среду ЛБ и выращены до середины лог-фазы при 37°C и постоянном покачивании 250 грт до OD₆₀₀ 0.7–1, и осажены центрифугированием при 5,000 об/мин (ротатор JLA-8.1000) 5 минут, осадок клеток хранили при –80°C (Varma и Jacobsson, 2004).

Экстракция фосфолипидов E.coli

Для определения фосфолипидного состава штаммы выращивали в жидкой среде ЛБ с добавлением радиоактивной метки ³²P в конечной концентрации 10 мКи/мл в течение 18 ч при 30 или 37°C и постоянном покачивании 250 грт до стационарной фазы роста. Далее клетки осаждали центрифугированием при 5,000 об/мин (ротатор JLA-8.1000) 5 минут и отмывали один раз для удаления избытка радиоактивности буфером 0,1М Трис, 0,7% K₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% цитрат натрия, 0,1% (NH₄)₂SO₄, pH = 7,5.

Экстракцию фосфолипидов из клеток производили по стандартной методике (Varma и Jacobsson, 2004). Экстракт хранили при –20°C.

Для разделения фосфолипидов использовали систему растворителей хлороформ-метанол-вода-аммиак (60:37,5:3:1). Для активации силикагелевые пластинки (ВЭТСХ силикагель 60, Whatman) выдерживали минуту в 1,2% борной кислоте в 48% этано-

ле. Высушивали 15 минут на воздухе и прокаливали при 190°C в течение 60 минут. Затем охлаждали в потоке сухого воздуха и наносили образцы на расстоянии 1,5 см от края пластинки, в количестве, равном по степени радиоактивности до достижения линии фронта растворителем 5 мм от края пластинки. Далее высушивали пластинку в потоке сухого воздуха и подвергали экспозиции, используя Phosphor screen от Bio-Rad. Измерение, визуализацию и обработку результатов проводили, используя Molecular Imager® Gel Doc™ XR System и Quantity one software (Bio-Rad).

Экстракция мембранных белков

Экстракцию проводили при 4°C. Клеток (1 г) были суспендированы в 20 мл холодного буфера (100 mM HEPES, 25 mM MgCl₂, 1,1 mM PMSF). Клеточные стенки разрушали French press (Glen Mills, USA) при 8000 psi. Неразрушенные осаждали центрифугированием при 30000 g 20 минут 4°C (ротатор SS-34). Для осаждения мембран супернатант центрифугировали 1 час при 200000 g 4°C (ротатор Beckman Ti 50.2). Осадок ресуспендировали в буфере 10 mM HEPES, 25 mM MgCl₂, 1,1 mM PMSF. Гомогенат перенесли в микроцентрифужные пробирки по 50 мкл и хранили при -20°C.

SDS-ПААГ и Вестерн блот

Концентрацию белка определяли методом на бикарбонксовую кислоту (BCA protein assay kit, Pierce). Солубилизованные 2% дигитонином образцы мембранных белков смешивали с готовым LSB буфером (Laemmli sample buffer), затем встряхивали 15 минут, инкубировали 15 мин при 37°C и снова встряхивали 15 минут на вортексе. Центрифугировали 5 минут при 14000 об/мин и супернатант наносили на 4–16% градиентный ПААГ (Bio-Rad). После разделения белки переносили на нитроцеллюлозную бумагу (Immun-Blot PVDF, Bio-Rad) в буфере 250 mM трис, 1,92 M глицин, 0,2% SDS, pH 8,3 в течение 1 часа 45 минут 45 В при 4°C. После переноса мембраны блокировали в течение 18 ч в TBS буфере 10 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl, 5% BSA, pH 7,4. Мембраны отмывали в TBS буфере, содержащем 0,5% NP-40, один раз 10 мин и инкубировали 3 часа при покачивании с первичными мышиными антителами против OmpF фрагментов (мономеры и тримеры) наружной мембраны *E. coli*, любезно предоставленными лабораторией Hiroshi Nikado. Затем 3 раза по 10 минут на качалке отмывали в TBS буфере, содержащем 0,5% NP-40, инкубировали час со вторичными анти-мышиными антителами, мечеными пероксидазой хрена, отмывали 3 раза по 10 минут в TBS буфере, содержащем 0,5% NP-40 и один раз в TBS в течение 5 минут, далее проявляли набором для хемолюминесцентного определения (ECL detection kit, Thermo Sc.). Блоты детектировали с помощью Molecular Imager® Gel Doc™ XR System и Quantity one software (BioRad).

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлена хроматограмма ТСХ, где подтвердили абсолютное отсутствие кардиолипина в мутантах BKT12 относительно дикого типа W3110 *E. coli*, следовательно, ввиду отсутствия генов *clsA*, *clsB*, *clsC* и соответственно экспрессии кардиолипинсинтаз в случае BKT12

кардиолипин не может вмешиваться в работу транслокона SecYEG и сборку порина OmpF.

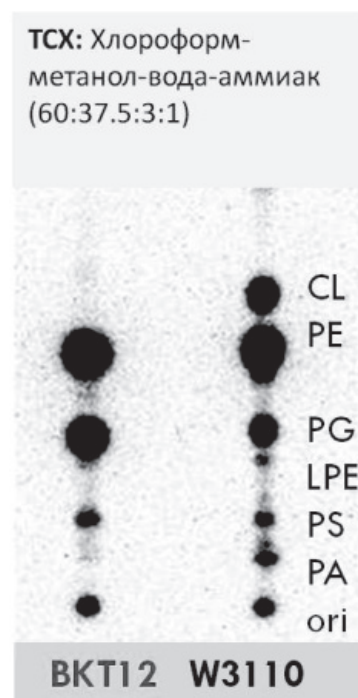


Рис. 1. Одномерная ТСХ ³²P-радио меченых фосфолипидов штаммов *E. coli* в %:
CL – кардиолипин,
PE – фосфатидилэтаноламин,
PG – фосфатидилглицерин,
LPE – лизофосфатидилэтаноламин,
PS – фосфатидилсерин, PA – фосфатидная кислота, ori – исходное пятно

Трансмембранный порин OmpF наружной мембраны граммотрицательных бактерий функционирует в виде тримера с молекулярной массой ~100 кДа, тогда как индивидуальный мономер имеет молекулярную массу ~39 кДа (Новикова и соавт., 1993).

Существует предположение, что транслокон SecYEG задействован в фолдинге и доставке пробелков, в том числе и OmpF к наружной мембране для дальнейшей сборки этих поринов (Новикова и соавт., 1993). Также *in vitro* показано, что кардиолипин может поддерживать функциональную структуру самого транслокона, являясь структурным компонентом, необходимым для его нативной конформации (Tan и соавт., 2012).

Нами проверена экспрессия и наличие тримеров и мономеров порина OmpF в экстракте мембранных белков мутантов BKT12 с отсутствием кардиолипина в сравнении с диким типом W3110 *in vivo*, где кардиолипин в среднем составляет 5–15%

от всех мембранных фосфолипидов (Klebba и соавт., 1990).

Пространственная организация белков зависит от метода выделения и используемого солюбилизирующего агента и температуры, при которой проводится диссоциация комплекса пептидогликан-порин (Новикова и соавт., 1993). В связи с этим для получения поринов в конформации, максимально приближенной к таковой в наружной мембране, большое значение имеет подбор условий извлечения этих белков

из бактерий. Была проведена оптимизация различных методов выделения мембранных белков, был выбран описанный ранее метод выделения и солюбилизации мембранных белков.

На рис. 2 представлен типичный вестерн-блот SDS-ПААГ мембранных белков после инкубации с моноклональными мышиными антителами к порину OmpF, выделенными по стандартной методике, после ECL проявления и использования Quantity one software (BioRad).

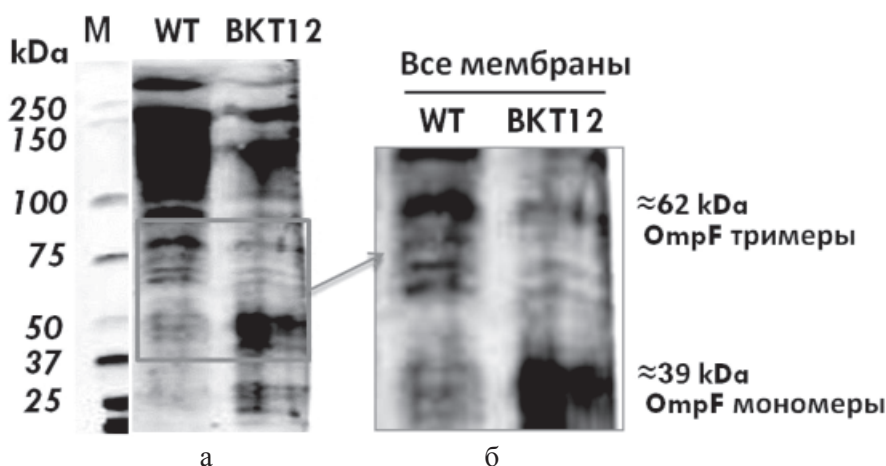


Рис. 2. Вестерн-блоттинг порина OmpF. WT – штамм W3110

В образцах мембранных белков мутанта BKT12 (рис. 2, А) с делециями всех кардиолипсинтаз обнаружены только OmpF мономеры в отличие от дикого типа W3110, где присутствует большое количество тримеров и их спонтанных агрегатов, следовательно, мы показали *in vivo*, что в мутантах в отличие от дикого типа не произошла транслокация и сборка OmpF мономеров в тримеры.

Можно предположить, что из-за отсутствия кардиолипина как необходимого структурного элемента и последующего нарушения работы транслокона SecYEG OmpF мономер не принял нужную конформацию для дальнейшего фолдинга и не достиг наружной мембраны *E.coli* для последующей сборки (рис. 2, б).

Следующим этапом будет исследование активности и стабильности комплекса самого транслокона SecYEG в присутствии и в отсутствии кардиолипина *in vivo*.

Известно, что особенности структуры поринов и их локализация на поверхности клеток бактерий обуславливает наличие у этой группы белков не только транспортных функций. С одной стороны, порины выступают как эффекторы патогенеза, пода-

вляя защитные реакции организма-хозяина, с другой – они являются высокоиммуногенными компонентами наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Антитела к ним обнаруживаются как после вакцинации, так и при естественном развитии инфекции (Achouak и соавт., 2001). Таким образом, уже на данном этапе исследований мутант BKT12 представляет самостоятельный интерес для изучения его биологических свойств, так как возможное отсутствие OmpF тримера во внешней мембране может повлечь за собой изменение иммуногенности и патогенности штамма, так как порины связаны нековалентной связью с нерастворимым слоем пептидогликана, разделяющего наружную и цитоплазматическую мембраны.

Список литературы

1. Влияние способа экстракции порообразующего белка из *Yersinia pseudotuberculosis* на его макромолекулярную организацию / О.Д. Новикова, Л.И. Федорева, В.А. Хоменко, О.Ю. Портнягина, И.М. Ермак, Г.Н. Лихацкая, С.В. Мороз, Т.Ф. Соловьева, Ю.С. Оводов // Биоорган. химия. – 1993. – Т. 19, № 5. – С. 536–547.

2. Achouak W., Heulin T., Pages J.M. Multiple facets of bacterial porins // FEMS Microbiol.Lett. – 2001. – Vol. 199. – P. 1–7.

3. Baars L. Protein targeting, translocation and insertion in *Escherichia coli*. Proteomic analysis of substrate-pathway relationships // Doctoral thesis. Stockholm. – 2007. – P. 1–55
4. Garavito R.M. and Rosenbusch J.P. Isolation and crystallization of bacterial porin // *Methods Enzymol.* – 1986. – Vol. 125. – P. 309–328.
5. Gold V.A.M., Robson A., Bao H., Romantsov T., Duong F., Collinson I. The action of cardiolipin on the bacterial translocon // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 107(22). – P. 10044–10049.
6. Tan B., Bogdanov M., Zhao J., Dowhan W., Raetz C., Guan Z. Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates / *PNAS.* – 2012. – Vol. 109(41). – P. 16504–16509.
7. Klebba P.E., Benson S.A., Bala S., Abdullah T., Reid J., Singh S.P., Nikaido H. Determinants of OmpF porin antigenicity and structure // *J Biol Chem.* – 1990. – Vol. 265(12). – P. 6800–6810.
8. Varma S. and Jakobsson E. Ionization States of Residues in OmpF and Mutants: Effects of Dielectric Constant and Interactions between Residues // *Biophysical Journal.* – 2004. – Vol. 86. – P. 690–704.

References

1. Vlijanie sposoba jekstrakcii poroobrazujushhego belka iz *Yersinia pseudotuberculosis* na ego makromolekuljarnuju organizaciju / O.D. Novikova, L.I. Fedoreeva, V.A. Homenko, O.Ju. Portnjagina, I.M. Ermak, G.N. Lihackaja, S.V. Moroz, T.F. Solov'eva, Ju.S. Ovodov // *Bioorgan. himija.* 1993. T. 19, no. 5. pp. 536–547.
2. Achouak W., Heulin T., Pages J.M. Multiple facets of bacterial porins // *FEMS Microbiol.Lett.* 2001. Vol. 199. pp. 1–7.

3. Baars L. Protein targeting, translocation and insertion in *Escherichia coli*. Proteomic analysis of substrate-pathway relationships // Doctoral thesis. Stockholm. 2007. pp. 1–55
4. Garavito R.M. and Rosenbusch J.P. Isolation and crystallization of bacterial porin // *Methods Enzymol.* 1986. Vol. 125. pp. 309–328.
5. Gold V.A.M., Robson A., Bao H., Romantsov T., Duong F., Collinson I. The action of cardiolipin on the bacterial translocon // *Biochemistry.* 2010. Vol. 107(22). pp. 10044–10049.
6. Tan B., Bogdanov M., Zhao J., Dowhan W., Raetz C., Guan Z. Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates / *PNAS.* 2012. Vol. 109(41). pp. 16504–16509.
7. Klebba P.E., Benson S.A., Bala S., Abdullah T., Reid J., Singh S.P., Nikaido H. Determinants of OmpF porin antigenicity and structure // *J Biol Chem.* 1990. Vol. 265(12). pp. 6800–6810.
8. Varma S. and Jakobsson E. Ionization States of Residues in OmpF and Mutants: Effects of Dielectric Constant and Interactions between Residues // *Biophysical Journal.* 2004. Vol. 86. pp. 690–704.

Рецензенты:

Абрамова З.И., д.б.н., профессор кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань;

Канарский А.В., д.т.н., профессор кафедры пищевой биотехнологии Казанского национального исследовательского технологического университета, г. Казань.

Работа поступила в редакцию 07.06.2013.