# ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ БЕЛКОВ ПРЕРЫВИСТО-КОНКТАКТНЫМ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Н.В. Малюченко<sup>1</sup>, А.Г. Тоневицкий<sup>1</sup>, М.Н. Савватеев<sup>2</sup>, В.А. Быков<sup>2</sup>, М.М Мойсенович<sup>1</sup>, И.И. Агапов<sup>1</sup>, Н.В. Козловская<sup>1</sup>, В.С. Архипова<sup>1</sup>, С.Г. Егорова<sup>1</sup>, М.П. Кирпичников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет, МГУ, 119992, Москва, Воробьевы горы д.1, кор. 12 <sup>2</sup>НТ-МДТ, НИИ физических проблем, 124482, Москва, Зеленоград, кор. 317 А, РО 158

# РЕЗЮМЕ

В ходе данной работы отработаны оптимальные режимы сканирования белков прерывисто-контактным методом атомно-силовой микроскопии. Для изучения структурных особенностей белков использовали белки с различными молекулярными массами (950 кДа - 11,5 кДа), различающиеся пространственной организацией. Наиболее отчетливые изображения белков получены при начальной амплитуде колебаний кантилевера 5-15 нм и с рабочей амплитудой в режиме отталкивания зонда от образца. Метод позволил четко различать структурные детали молекул иммуноглобулина IgM, IgG1 и агглютинина рицина. Острота используемых в работе зондов ограничивала выявление особенностей строения белков с молекулярной массой 60 кДа и менее. В данной работе продемонстрированы возможности дифференцировки IgG1, агглютинина рицина и рицина на основе количественной оценки геометрических параметров молекул.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, прерывисто-контактный метод, IgG1, IgM, рицин, агглютинин рицина, эглин.

Принятые сокращения: ACM – атомно-силовая микроскопия; PБ - рекомбинантный белок эглин C со встроенным фрагментом молекулы β1-адренорецептора; PCA – рентгеноструктурный анализ; монАт – моноклональные антитела.

#### введение

Атомно-силовая микроскопия (ACM) в настоящее время становится одним из перспективных методов изучения структурных особенностей макромолекул, поскольку позволяет получать изображения объектов с высоким разрешением, сопоставимым с уровнем рентгеноструктурного анализа, в условиях, при которых макромолекулы не подвергаются жесткой обработке и проявляют свою природную активность [1-6]. Кроме того, атомно-силовая микроскопия дает возможность не только визуализировать объекты на молекулярном уровне, но и изучать свойства индивидуальных макромолекул: распределение поверхностных зарядов, подвижность отдельных участков, конформационные изменения в зависимости от условий, силу специфического взаимодействия между молекулами [7-9]. С помощью атомно-силовой микроскопии можно наблюдать в реальном времени за сборкой макромолекулярных комплексов, распределением белков на поверхности клетки, особенностями внутриклеточного транспорта макромолекул и т.д. [10-13].

Целью данной работы была разработка подходов для изучения структуры белков с помощью атомно-силовой микроскопии с использованием прерывисто-контактного метода. В качестве объектов исследования были выбраны белки с различными молекулярными массами: иммуноглобулины IgM изотипа – 950 кДа, иммуноглобулины IgG1 – 150 кДа, агглютинин рицина – 120 кДа, рицин – 60 кДа, связывающая субъединица рицина – 30 кДа и рекомбинантный белок эглин С (РБ) со встроенным фрагментом молекулы β1-адренорецептора – 11,5 кДа. В ходе работы проводили измерения геометрических параметров молекул, которое позволило отличать по размеру молекулы рицина от молекул антител и агглютинина рицина.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Материалы

IgM был любезно предоставлен С.П. Домогатским (IMTEK, Россия). IgG1 против рицина был получен в группе Тоневицкого (Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова). Агглютинин рицина, рицин, В-субъединицу рицина получали по опубликованным методам [14]. Рекомбинантный белок эглин С с фрагментом молекулы β1адренорецептора человека (11,5 кДа), был получен ранее [15].

## Атомно-силовая микроскопия

Измерения макромолекул производили на зондовом микроскопе Solver P47H (NT-MDT, Mockва) согласно рекомендациям фирмы-разработчика [http://www.ntmdt.ru]. Для получения высокого разрешения использовали приставку AA110 (NT-MDT) и зондовые датчики серии NSG11S (NT-MDT), типичный радиус кривизны острия которых был менее 10 нм. Для приготовления образцов исходный раствор белков разводили до концентрации 0.5-2 мкг/мл. Каплю раствора белка наносили на свежесколотую слюду и инкубировали в течение 1 минуты. Затем отмывали образец в деонизованной воде. Перед сканированием образцы обдували сжатым воздухом. Величину начальной и рабочей амплитуд колебаний зонда выбирали экспериментально. Сканирование проводили с частотой 3,5 Гц с разрешением 512x512 точек.

#### "Grain analysis"

Программное обеспечение зондовых микроскопов компании NT-MDT содержит в меню программу "Grain analysis", предназначенную для статистической обработки изображения поверхности, состоящей из плоскости и выступающих над ее уровнем объектов. С помощью данной программы определяли эффективный размер объектов (Dv), равный <sup>3</sup>√V (V–произведение линейных размеров по координатам XYZ)

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отработка оптимального режима измерения белковых молекул

Для визуализации молекул использовали прерывисто-контактный метод атомносиловой микроскопии. При использовании этого метода зонд колеблется на резонансной частоте кантилевера с заданной амплитудой (начальная амплитуда). При приближении зонда к поверхности амплитуда колебаний уменьшается. При сканировании в каждой точке система обратной связи удерживает амплитуду колебаний зонда на величине, заданной оператором (рабочая амплитуда), перемещая зонд по нормали к поверхности, тем самым, отображая рельеф. Для определения оптимальных параметров сканирования удобно использовать амплитудную кривую – зависимость амплитуды колебаний зонда от расстояния между зондом и поверхностью. Типичная амплитудная зависимость, снятая на участке слюды, свободном от молекул, показана на рисунке 1А. До расстояния, равного начальной амплитуде колебаний, зонд не чувствует поверхность, и амплитуда не меняется. Начиная с этого расстояния, по мере приближения зонда к поверхности амплитуда уменьшается линейно. На определенной высоте происходит скачок амплитуды. При дальнейшем приближении зонда амплитуда уменьшается до нуля. Наличие скачка амплитуды связано с наличием двух режимов взаимодействия кантилевера с поверхностью – режима притяжения и режима отталкивания. В верхнем участке кривой взаимодействие определяется силами притяжения, в нижнем – силами отталкивания [16, 17]. Такая форма кривой характерна для чистого зонда и незаряженного образца. В случае, если зонд пачкается, вследствие залипания молекул образца, то переход либо исчезает совсем, либо становится плавным (данные не представлены). Если образец или зонд оказываются заряженными, то взаимодействие зонда с образцом начинается гораздо раньше и амплитуда колебаний начинает плавно убывать с большого расстояния (данные не представлены). В таком случае производить измерения удается, только используя очень малую рабочую амплитуду.

Существенно влияет на разрешение начальная амплитуда. При больших амплитудах зонд обладает большей энергией и при ударе о мягкую молекулу

деформирует ее (данные не представлены). Оптимальной оказалась амплитуда в диапазоне 5-15 нм. Величина этой амплитуды определяется из амплитудной кривой и корректируется изменением напряжения, подаваемого на пьезовибратор.

В ходе отработки оптимального разрешения молекул была изучена зависимость качества получаемого изображения от выбора значения рабочей амплитуды. Оказалось, что наиболее четкие изображения получаются в режиме отталкивания (рис 1Б1). Изображения меньшего качества получаются при выборе рабочей амплитуды в режиме притяжения (рис 1Б2). В остальных областях значений амплитуд изображение получается нестабильным и частично инвертированным (рис 1Б3).

#### АСМ изображения белков 950 кДа – 11,5 кДа

АСМ изображение молекулы иммуноглобулина изотипа IgM (950 кДа) представляет структуру, состоящую из 5 субъединиц (рис. 2 А, Б). Каждая из субъединиц имеет диаметр 10 нм и высоту 2,5 нм. Данные АСМ соответствуют представлениям о пространственной организации IgM, согласно которым IgM - молекула, состоящая из пяти Y-образных молекул, при этом C-концевые участки направлены к центру, а Fab-фрагменты располагаются на внешней стороне [18].

Увеличенное изображение молекулы IgG1 (150 кДа) позволяет различить три глобулы (рис. 2 В, Г), что соответствует представлениям о пространственной организации молекул иммуноглобулинов данного изотипа [18]. Две глобулы имеют одинаковые размеры: диаметр составляет 10 нм, а высота 1,5 нм; третья глобула несколько больше: диаметр также 10 нм, а высота превышает 2 нм. Вероятно, две сходных по размеру глобулы соответствуют Fab-фрагментам, а третья, большая, соответствует Fc-фрагменту иммуноглобулинов. [18].

Выявляемые АСМ молекулы агглютинина рицина (120 кДа) имеют структуру, состоящую из двух глобулярных блоков, вытянутых на подложке (рис. 2 Д, Е). По данным литературы агглютинин рицина представляет собой природный тетрамер ВА-АВ, с двумя А-субъединицами в центре и двумя В-субъединицами по краям [19,20]. Таким образом, выявляемые блоки агглютинина рицина соответствуют AB структуре, в которой не визуализируются отдельные субъединицы

Рицин (60 кДа) состоит из каталитической А-субъединицы, ингибирующей синтез белка и В-субъединицы, связывающей токсин с клетками [19,21]. Препарат рицина, сорбируемого на слюду, выглядит гомогенно, все молекулы имеют глобулярную форму. Каталитическая и связывающая субъединицы, составляющие данный белок, неразличимы (рис 3А, Б).

АСМ изображения молекул связывающей В-субъединицы рицина (30 кДа) и рекомбинантного белка эглина со встроенным фрагментом (11,5 кДа) β1адренорецептора человека практически не отличались. По данным АСМ белки имеют сходные размеры и организацию; детали и особенности структуры не визуализировались (рис. 3 В, Г, Д, Е).

## Оценка размеров молекул токсинов и антител

Проводили оценку геометрических размеров молекул рицина, агтлютинина рицина и антител изотипа IgG1 к рицину с помощью программы "Grain Analysis". (рисунок 4А, Б). На основе полученных данных был вычислен эффективный размер частиц, который составлял: для рицина - 4,5 ± 0,2 нм, для агглютинина - 5,4 ± 0,15 нм, для антител - 5,8 ± 0,2 нм.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из существенных преимуществ применения ACM в структурных исследованиях белков является щадящая процедура приготовления образцов. Условия жесткой фиксации и кристаллизации, применяемые в других методах, могут не соответствовать природным условиям, в которых макромолекулы проявляют свою активность.

Качество получаемых изображений зависело от ряда параметров: от величины начальной и рабочей амплитуды колебаний зонда, от остроты зонда, от статического

заряда на образце и пр. В работе использовались зонды, радиус кривизны острия которых был немногим меньше 10 нм, что задавало нижнюю границу разрешающей способности прибора [22, 23]. Было показано, что предел разрешения изображений, полученных данной модификацией метода, находится в области 7-8 нм. Белки 11,5, 30 и 60 кДа, размеры которых находились на нижней границе разрешения, по данным ACM имели практически одинаковые геометрические параметры, деталей структуры не детектировали. Для молекул >60 кДа становятся различимы структурные особенности: визуализируются отдельные составляющие блоки, их пространственная организация в макромолекуле.

Создание ультраострых зондов может существенно расширить область применения АСМ в изучении пространственной организации макромолекул [24,25]. Кроме того, возможности метода, позволяющего детектировать структурные детали молекул и одновременно проводить оценку количественных параметров большой выборки молекул, могут найти широкое применение в различных прикладных областях, например, при создании чувствительных биосенсоров [26,27].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят за оказанную помощь и советы в проведении данной работы сотрудников фирмы NT-MDT Ефимова А.Е. и Рябоконь В.Н. Исследования частично финансировались в рамках двустороннего соглашения между Министерством науки и технологий РФ и Министерством образования и научных исследований Германии (проект RUS 01/237), а также грантом РФФИ №03-04-49278.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cidade G.A., Costa L.T., Weissmuller G., Neto A.J., Roberty N.C., Moraes M.B., Prazeres G.M., Hill C.E., Ribeiro S.J., Souza G.G., Teixeira L., Moncores M., Bisch P.M. //Artif Organs. 2003. V.27. P.447-451.
- Fotiadis D., Scheuring S., Muller S.A., Engel A., Muller D.J. //Micron. 2002. V.33. P.85-97.

- Muller D.J., Janovjak H., Lehto T., Kuerschner L, Anderson K. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2002. V.79. P.1-43.
- 4. Engel A., Muller D.J. // Nat. Struct. Biol. 2000. V.7. P.715-718.
- Saal K., Sammelselg V., Lohmus A., Kuusk E., Raidaru G, Rinken T, Rinken A. // Biomol Eng. 2002. V.19. P.195-199.
- 6. Enge A., Lyubchenko Y., Muller D.// Trends Cell Biol. 1999. V.9. P.77-80.
- 7. Yang Y., Wang, H., Erie D.A. //Methods. 2003. V.29. P.175-187.
- Ouerghi O., Touhami A., Othmane A., Ouada H.B., Martelet C., Fretigny C., Jaffrezic-Renault. // N. Biomol. Eng. 2002. V.19. P.183-188.
- 9. Yang Y., Wang H., Erie D. A. // Methods 2003. V.29 P.175-187.
- 10. Muller D.J., Engel A. //Methods Cell Biol. 2002. V.68. P.257-299.
- 11. Nichols M.R., Moss M.A., Reed D.K., Lin W.L., Mukhopadhyay R, Hoh J.H., Rosenberry T.L. //Biochemistry 2002. V.41. P.6115-6127.
- 12. Sakaue M., Taniguch, K. // J. Vet. Med. Sci. 2001. V.63. P.223-225.
- 13. Kumar S., Hoh J.H. // Traffic. 2001. V.2. P.746-756.
- Tonevitsky A.G., Zhukova O.S., Mirimanova N.V., Omelyanenko VG., Timofeeva N.V., Bergelson L.D. // FEBS Lett. 1990. V. 264. P.249-252.
- Перов П.Ю., Табакьян Е.А., Рулева Н.Ю., Пфюллер У., Комолов И.С.
  //Биотехнология. 2002. V.6. P.63-67.
- 16. Paulo S.A., Garcia R. // Biophys. J. 2000. V.78. P.1599-1605.
- 17. Garcia R., Paulo S.A. // Phys. Rev. B. 1999. V.60. P.4691-4697.
- 18. Alzari P.M., Lascombe M.B., Polyak R. // Annu. Rev. Immunol. 1988. V.6. P.555-581.
- 19. Barbieri L., Battelli M.G., Stirpe F. //Biochim. Biophys. Acta. 1993. V.1154. P.237-282.
- 20. Sweeney E.C., Tonevitsky A.G, Temiakov D.E., Agapov I.I., Saward S., Palmer R.A. //Proteins. 1997. V.28. P.586-589.
- 21. Montfort W., Villafranca J.E., Monzingo A.F., Ernst S.R., Katzin B., Rutenber E, Xuong N.H., Hamlin R., Robertus J.D. // J. Biol. Chem. 1987. V.262. P.5398-5403.

- 22. Morris V.J., Kirby A.R., Gunning A.P. //Atomic force microscopy for biologists/ Imperial College Press, London, 2001. p.208
- Smith R.L. Rohrer G.S. // Scanning probe microscopy and spectroscopy/Eds D. Bonnel, Second edition, Wiley-VCH, Canada, 2001. P.155-203.
- Cheung C.L., Hafner J.H., Lieber C.M. //Proc Natl Acad Sci U S A. 2000. V. 97. P.3809-3813.
- 25. Furuno T., Sasabe H., Ikegami A. // Ultramicroscopy. 1998. V.70. P.125-131.
- 26. Ouerghi O., Touhami A., Othmane A., Ouada H.B., Martelet C., Fretigny C., Jaffrezic-Renault, N. // Biomol Eng. 2002. V.19. P.183-188.
- 27. Pereira R.S. // Biochem Pharmacol. 2001 V.62. P.975-983.

## ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

## Рисунок 1.

А. Зависимость амплитуды колебаний зонда от расстояния между острием и поверхностью, снятая на участке слюды, свободном от молекул.

Б. Изображения молекул IgG1, полученные при различных рабочих амплитудах,

соответствующих режимам, указанным стрелкой на амплитудной кривой.

Длина отрезка 10 нм.

**Рисунок 2**. АСМ изображения иммуноглобулина IgM (А,Б), иммуноглобулина IgG1 (В,Г) агглютинина рицина (Д,Е).

Длина отрезка 10 нм

**Рисунок 3.** АСМ изображения рицина (А,Б), В-субъединицы рицина (В,Г), РБ (Д,Е). Длина отрезка 10 нм.

## Рисунок 4.

A, Б – определение эффективного размера (Dv) молекул иммуноглобулина IgG1, агглютинина рицина и рицина с помощью программы «Grain analysis»





A

Б











 $\Gamma$ 



























## **INTERMITTENT-CONTACT ATOMIC FORCE MICROSCOPY FOR**

## **INVESTIGATION OF PROTEINS' STRUCTURAL FEATURES**

N.V. Maluchenko<sup>1</sup>, A.G. Tonevitsky<sup>1</sup>, M.N. Savvateev<sup>2</sup>, V.A. Bykov<sup>2</sup>, M.M. Moisenovich<sup>1</sup>, I.I. Agapov<sup>1</sup>, N.V. Kozlovskaya<sup>1</sup>, V.S. Arkhipova<sup>1</sup>, S.G. Egorova<sup>1</sup>, M.P. Kirpichnikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Vorobjovy Gory, b.1, korp12, e-mail: <u>mal\_nat@rambler.ru</u>,

<sup>2</sup>NT-MDT Co., State Research Institute of Physical Problems, Zelenograd, Moscow, 124482, korp 317 A, P O 158; e-mail: spm@ntmdt.com

# ABSTRACT

Optimal conditions of protein scanning by atomic force microscopy were worked through the present study. Proteins of various molecular masses (950 – 11,5 kDa) and different three-dimensional organization were used to investigate structural features of proteins. The most distinct images of proteins were obtained by the tip with a free amplitude in the range of 5-15 nm and with set-point amplitude in the regime of repulsion from the sample. The method allowed to differ clearly the structural details of large molecules such as immunoglobulins IgM and IgG1 and *Ricinus* agglutinin. The revealing of the structural properties of proteins with molecular masses of 60 kDa and less was limited by the sharpness of probe tips used in the present study. Potentialities to differ IgG1, *Ricinus* agglutinin and ricin from each other by quantitative analysis of molecules' geometric parameters are demonstrated in the present work.

Key words: atomic force microscopy, intermittent-contact mode, IgG1, IgM, ricin, Ricinus agglutinin, eglin.