

ПОЛУЧЕНИЕ УПОРЯДОЧЕННЫХ СТРУКТУР БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОРИНОВ В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ МОРФОЛОГИИ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2019 г. Г.А. Набережных, А.А. Карпенко*, В.А. Хоменко, Т.Ф. Соловьёва, О.Д. Новикова

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

E-mail: naber1953@mail.ru

*Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

E-mail: alex_karp@list.ru

Поступила в редакцию 02.08.2019 г.

После доработки 02.08.2019 г.

Принята к публикации 06.09.2019 г.

Формирование упорядоченных наноструктур порина OmpF из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* проводили двумя методами: из протеолипосом и прямой реконструкцией белка в предварительно нанесенный на поверхность слюды фосфолипидный бислой. Морфологию полученных структур анализировали с помощью атомно-силовой микроскопии. Показано, что эффективность формирования, степень однородности и размер доменов порина существенным образом зависят от условий эксперимента и присутствия липополисахарида в образцах порина или в бислое. Обнаружено, что при использовании протеолипосом на поверхности слюды образуются агрегаты нанодоменов порина, имеющих неравномерное распределение в бислое и большой разброс в диаметре (50–250 нм). При прямой реконструкции порина показано, что снижение pH солибилизирующего буфера способствует включению достаточно большого количества белка в виде однородных доменов со средним размером 35–40 нм, однако не приводит к формированию в бислое протяженных наноструктурных участков. Наиболее эффективное встраивание порина в липидный бислой с образованием кластеров из плотно упакованных доменов белка было достигнуто при использовании образца порина в комплексе с пептидогликаном и липополисахаридом, с которыми этот белок тесно связан в нативной бактериальной мембране.

Ключевые слова: порин, липополисахарид, фосфолипидный бислой, наноструктура, атомно-силовая микроскопия.

DOI: 10.1134/S0006302919060097

В последние годы наметился значительный прогресс в использовании наноматериалов для создания биосенсоров, в том числе с использованием белковых структур [1,2]. В настоящее время при создании биологических нанопор все чаще рассматриваются интегральные мембранные белки, имеющие прочную бета-баррельную структуру. Основные преимущества использования белковых нанопор — знание их точной структуры при атомном разрешении, возможность внедрять функциональные группы на стратегических позициях внутри канала. Подобные структуры находят широкое применение в нанобиотехнологии и наномедицине [3]. К ним относятся биогенные наночастицы терапевтического или диагностиче-

ского назначения, векторы направленной доставки лекарств, нативные или искусственно сконструированные химические и биологические сенсоры. Тем не менее, несмотря на преимущества белковых наноструктур и успешные примеры их создания, одним из постоянных ограничений является отсутствие методологии для получения жесткой белковой «арматуры», которая сохраняет свою функциональность в широком спектре условий окружающей среды.

Одними из перспективных кандидатов для конструирования биологических нанопор являются каналы неспецифических поринов наружной мембраны грамотрицательных бактерий, обеспечивающих транспорт низкомолекулярных веществ через наружную мембрану. Порины принадлежат к бета-баррельным интегральным мем-

Сокращения: ЛПС — липополисахарид, АСМ — атомно-силовая микроскопия, ОГ — β -D-октилглюкозид.

белкам, образующим в нативной мембране олигомерные структуры (чаще всего тримеры). Они состоят из антипараллельных амфифильных бета-стрендов (тяжей), гидрофобные остатки аминокислот которых экспонированы в липидный бислой, а гидрофильные — во внутреннюю часть барреля [4]. Амфифильная природа молекул поринов позволяет им легко встраиваться в липидный бислой [5]. В присутствии фосфолипидов порины в результате белок-белкового взаимодействия могут самопроизвольно формировать наноструктуры [6]. Такой метод самоорганизации двух- и трехмерных структур из наноразмерных составляющих рассматривается как простой и экономически выгодный способ получения наноматериалов. Выбор детергента и липида имеет большое значение для получения двумерных кристаллов порообразующих белков, при этом химическая структура указанных компонентов определяет параметры упорядоченных белковых структур [7,8].

Целью данной работы явилась разработка подходов к получению на основе OmpF-порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* упорядоченных наноразмерных структур, а также выяснению роли отдельных компонентов бактериальной мембраны, липополисахарида (ЛПС) и пептидогликана в качестве векторов самосборки в липидном бислое на твердой поверхности. Сравнительное исследование морфологии наноструктур, полученных в разных условиях, было проведено с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Полученные результаты предполагается использовать при создании биоматриц на основе поринов, потенциально пригодных для создания комплексных неорганических наноструктурных композиций различного назначения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование бактерий. В работе использовали штамм H-557 *Y. pseudotuberculosis* 0:1В серовара. Культивирование микроорганизмов проводили при 4°C на питательном бульоне (Махачкала, Россия) в колбах объемом 1 л с интенсивной аэрацией в течение 5 суток.

Выделение порина и его комплексов с пептидогликаном. Комплекс пептидогликан–порин получали экстракцией бактериальных клеток ионным детергентом додецилсульфатом натрия по методу Розенбуша [9]. Количество ЛПС в полученном образце определяли по методу, описанному в работе [10]. Изолированный порин, содержащий примесь ЛПС, получали по методу, описанному в работе [11]. Для очистки белка от ЛПС использовали обработку 30%-м раствором додецилсульфата натрия, как описано в работе [12]. В результате был получен образец порина, не со-

держащий ЛПС. Дальнейшую его очистку проводили гель-фильтрацией в присутствии 1%-го раствора неионного детергента β -D-октилглюкозида (ОГ) в трис-HCl-буфере (0,03 М, pH 7,5). В результате был получен образец «порин-ОГ», содержащий порин в тримерной форме и гомогенный по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Получение больших моноламелярных липосом, нагруженных карбоксифлуоресцеином. Для получения отрицательно заряженных липосом смесь, состоящую из 30 мг лецитина, 12,5 мг холестерина и 1,8 мг дицетилфосфата, растворяли в 0,3 мл хлороформа, упаривали и высушивали в вакууме в течение 3 ч. Остаток растворяли в 0,3 мл диэтилового эфира, добавляли 50 мкл воды и 50 мкл 0,2 М раствора сульфородамина Б в 0,1 М Na_2CO_3 . Смесь встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой бане (Elmi, Латвия) в течение 10 мин при 5°C и упаривали в вакууме до полного удаления эфира. Для удаления несвязавшегося сульфородамина Б суспензию липосом отмывали 0,03 М трис-цитратным буфером с pH 5,5 или 8,0, осаждавая центрифугированием при 25000 g, а затем суспендировали в соответствующем буфере. Для получения однородных по размерам липосом обе порции обрабатывали в ультразвуковой бане (Elmi, Латвия) в течение 10 мин при 5°C и десять раз пропускали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 200 нм (Nucleopore, США). Контроль за размерами липосом осуществляли методом динамического светорассеяния с использованием прибора ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) при температуре 25°C, при фиксированном угле рассеяния 173° и длине волны лазера 633 нм.

Регистрация изменения проницаемости липосомальной мембраны. Для определения порообразующей активности исследуемого белка регистрировали изменение проницаемости липосомальной мембраны. Вначале определяли фоновую флуоресценцию, добавляя 50 мкл суспензии липосом к 120 мкл 0,03 М трис-цитратного буфера с pH 5,5 или 8,0. Затем к полученной суспензии липосом добавляли 20 мкл раствора порина, выдержанного в течение 5 ч в соответствующем буфере, и фиксировали изменение флуоресценции в течение 30 мин. Для определения максимальной флуоресценции при полном лизисе к суспензии липосом добавляли 100 мкл раствора 10%-го раствора додецилсульфата натрия. Процент специфического освобождения маркера (СОМ) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{СОМ} = (F_{\text{эксп}} - F_{\text{фон}}) / (F_{\text{max}} - F_{\text{фон}}) \times 100\%,$$

где $F_{\text{эксп}}$ — флуоресценция после добавления белка, F_{max} — флуоресценция после полного лизиса

липосом, $F_{\text{фон}}$ — флуоресценция без добавления белка.

Получение образцов для исследований методом атомно-силовой микроскопии. Протеолипосомы получали методом длительного диализа (48 ч) смеси раствора образца «порин–ОГ» (1 мг/мл) и синтетического фосфолипида дидодецилфосфатидилхолина в соотношении 1:1000 (в/в) против трис-НСI-буфера (0,03 М, pH 7,5) [13]. Суспензию протеолипосом, отмытых от несвязавшегося белка, наносили на свежеосколотую пластинку слюды размером 10×10 мм.

Формирование на слюде поддерживающего липидного бислоя из дидодецилфосфатидилхолина и последующую реконструкцию образцов «порин–ОГ» и «пептидогликан–порин» в присутствии 0,3 мМ неионного детергента додецилмальтозида осуществляли по методу [14]. При включении образца «порин–ОГ» на предварительно сформированный бислой использовали два варианта. В первом случае 50 мкл порина (100 мкг/мл) в трис-НСI-буфере (0,03 М, pH 7,5) реконструировали в бислой, не содержащий ЛПС. В втором случае на липидный бислой наслаивали 50 мкл ЛПС (100 мкг/мл) из *E. coli* 055 (Sigma, США), отмывали от несвязавшегося ЛПС, а затем вводили белок в ацетатном буфере (0,05 М, pH 5,5). Образец «пептидогликан–порин», суспендированный в ацетатном буфере (0,05 М, pH 5,5), наносили на предварительно сформированный на слюде липидный бислой, не содержащий ЛПС.

Атомно-силовая микроскопия. Изображения препаратов порина, нанесенных на свежеосколотую пластинку слюды, получали с помощью атомно-силового микроскопа Bioscope Catalyst (Bruker, США) в контактном режиме в буфере, используя оригинальную разработку фирмы Bruker в режиме Scan Asyst mode. В эксперименте использовали кантилевер ScanAsyst-Fluid ($k \sim 0,7$ Н/м, радиус наконечника < 10 нм), предназначенный для работы в жидкой среде. Прижимное усилие к объекту составляли в пределах 120 пН. Наноструктурную организацию порина в полученных образцах анализировали по методике [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Неионный детергент ОГ был выбран для сольubilизации порина из *Y. pseudotuberculosis*, поскольку ранее было показано, что в растворе ОГ белок имеет пространственную структуру, максимально приближенную к его структуре в нативной мембране [15]. Для получения на поверхности слюды упорядоченных наноструктур из образца «порин–ОГ» мы использовали два подхода. Первый метод был основан на получении протеолипосом из сольubilизированного в детергенте порина в присутствии синтетического фосфоли-

пида дидодецилфосфатидилхолина. Выбор данного фосфолипида был обусловлен тем, что, согласно литературным данным, толщина гидрофобной части липидного бислоя, полученного из этого фосфолипида сопоставима с высотой бета-барреля поринов наружной мембраны [16], что обеспечивает максимальную эффективность при реконструкции мембранных белков [17]. Вторым подходом заключался в предварительном формировании на поверхности слюды поддерживающего липидного бислоя, последующего встраивания молекул порина в раствор детергента в бислой и отмытки поверхности образца буфером без детергента [14].

Как видно из рис. 1а, нанокластеры порина, полученные по первому методу, имеют высокую степень агрегации и значительный разброс в диаметре (50–250 нм). Согласно шкале интенсивности окраски, приведенной на рис. 1а, агрегаты белка выступают на 14–28 нм над липидным матриксом. Они неравномерно включены в фосфолипидный слой, образованный при взаимодействии липида протеолипосом с плоской подложкой. Большое различие в размерах наблюдаемых нанокластеров, скорее всего, обусловлено тем, что они являются результатом спонтанной агрегации молекул белка в процессе длительного диализа смеси «порин–детергент–фосфолипид» при получении протеолипосом. Следует отметить, что при сканировании поверхности этого образца в полуконтактном режиме съемки наблюдалось значительное смещение АСМ-изображения (показано в нижней части рис. 1а), что свидетельствует о подвижности агрегатов белка в составе бислоя, образованного при слиянии протеолипосом.

Предварительное формирование поддерживающего фосфолипидного бислоя путем слияния липосом на слюде обеспечивает достаточно полное покрытие ее поверхности. Тем не менее в правой части рис. 1б можно обнаружить светлую область, по-видимому соответствующую «неслитым» липосомам. Как видно на рис. 1в, высота липидного слоя составляет 4–6 нм, что коррелирует с толщиной бислоя фосфолипидов. Более темные участки на трехмерном изображении могут соответствовать частично удаленному бислою, который может быть дестабилизирован раствором детергента на стадии включения белка.

Таким образом, при использовании прямого метода реконструкции порина в предварительно сформированный поддерживающий фосфолипидный слой не происходит образования протяженных участков 2D-кристаллов белка, заметны только единичные включения. Предположительно, это может происходить по двум причинам. Во-первых, образцы порина были сольubilизированы в буфере со значением pH, близком к ней-

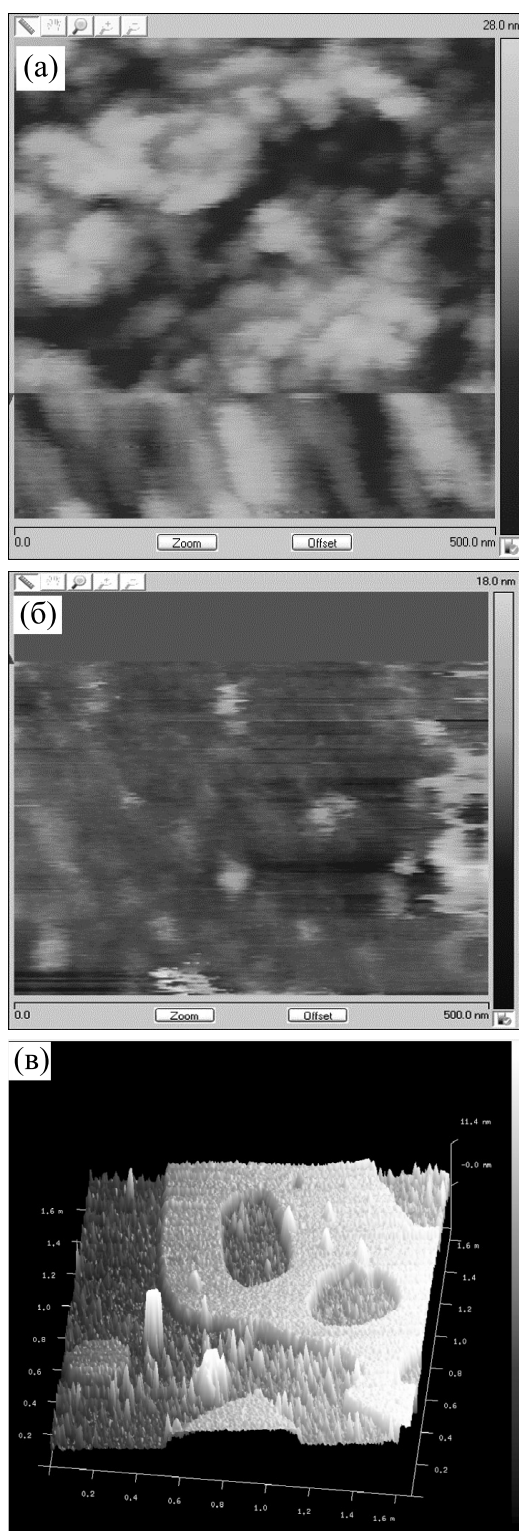


Рис. 1. АСМ-изображения наноструктур образца порина-ОГ, полученных в результате нанесения протео-липосом на сляду (а), включения белка в поддерживающий фосфолипидный бислой, предварительно сформированный на сляде (б) и его трехмерное изображение (в). Сканирование образцов проводили в 0,03 М трис-НСl-буфере, pH 7,5.

тральному (pH 7,5), и, возможно, эти условия не являются оптимальными для эффективной реконструкции порина в липидный бислой. Во-вторых, в опыте были использованы высокоочищенные образцы белка, не содержащие примесей других компонентов наружной мембраны, прежде всего ЛПС. Как известно, в нативной мембране порины существуют в виде комплексов с ЛПС, эти два основных компонента бактериальной мембраны связаны между собой прочной, но не ковалентной связью. В литературе имеются данные о том, что взаимодействие между ЛПС и порином играет существенную роль при сборке белка в наружной мембране бактериальной клетки в процессе биосинтеза [18]. Кроме того, показано, что присутствие ЛПС значительно влияет на эффективность встраивания порина в липидный бислой [5]. Что же касается pH буферного раствора, ранее нами было показано, что изменение pH среды существенным образом влияет на конформацию молекулы порина из *Y. pseudotuberculosis*, на его способность к самопроизвольной реконструкции в бислой и соответственно на проявление его функциональной активности [19].

В связи с вышесказанным, следующий этап исследования был посвящен определению оптимальных условий встраивания образца порина в липидный бислой. Для этого мы использовали метод вытекания флуоресцентной метки из отрицательно заряженных липосом при включении белка. Концентрация флуорофора сульфородамина Б внутри липосом в исходной суспензии превышала концентрацию его самотушения. Образование пор в липосомальной мембране при добавлении образца порина сопровождалось вытеканием флуорофора сульфородамина Б во внешний раствор и соответственно заметным увеличением интенсивности его флуоресценции.

Липосомы, полученные из лецитина, холестерина и дицетилфосфата, оказались достаточно стабильны к действию буфера, содержащего ОГ, в котором был солюбилизован порин. Как следует из данных на рис. 2, графики выхода сульфородамина Б из липосом при встраивании порина в буферах с кислым и слабощелочным значениями pH существенно отличаются. Наиболее эффективное встраивание порина наблюдалось при pH раствора, равном 5,5. Принимая во внимание полученные данные, для последующих экспериментов были использованы образцы белка, солюбилизованные в кислом буферном растворе, а именно в ацетатном буфере с pH 5,5.

Для экспериментальной проверки влияния ЛПС на формирование упорядоченных структур порина из *Y. pseudotuberculosis* были задействованы два образца белка, отличающихся содержанием ЛПС: (1) изолированный порин, не содержащий ЛПС («порин-ОГ»); (2) комплекс «пептидо-

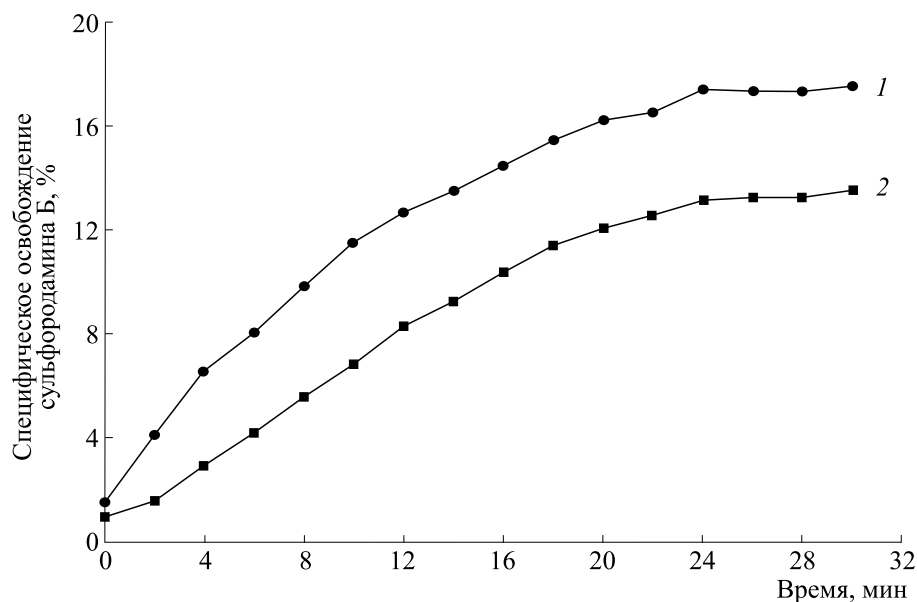


Рис. 2. Кинетика освобождения сульфобетамина Б из отрицательно заряженных липосом при добавлении образца «порин-ОГ» при различных значениях pH буферного раствора: кривая 1 – pH 5,5, кривая 2 – pH 8,0. Ось ординат – специфическое освобождение сульфобетамина Б.

гликан–порин» с содержанием ЛПС 8–10%. В первом случае (рис. 3) образец «порин-ОГ» вносили в предварительно сформированный на слое липидный бислой с включенным в него ЛПС.

Как видно из данных на рис. 3, в этих условиях (в присутствии ЛПС и в слабокислой среде) количество включенного порина в бислой значительно увеличивается по сравнению с реконструкци-

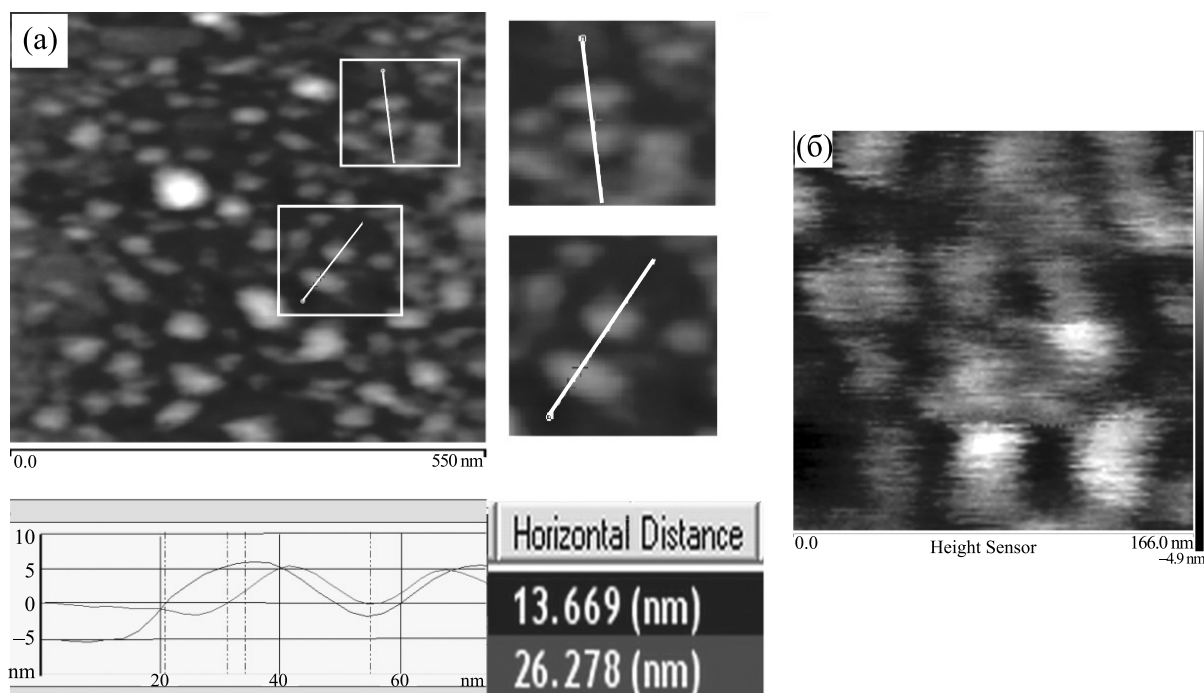


Рис. 3. АСМ-изображение образца «порин-ОГ» в поддерживающем фосфолипидном слое, содержащем ЛПС, при разных масштабах: 0,5 мкм (а) и 0,16 мкм (б). В нижней части рисунка (а) приведены профили поверхности образца вдоль линий в рамках, использованные для расчета среднего диаметра частиц. Высоту доменов, выступающих над поверхностью бислоя, определяли по шкале цветности справа от рисунка (б). Сканирование образцов проводили в 0,05 М ацетатном буфере, pH 5,5.

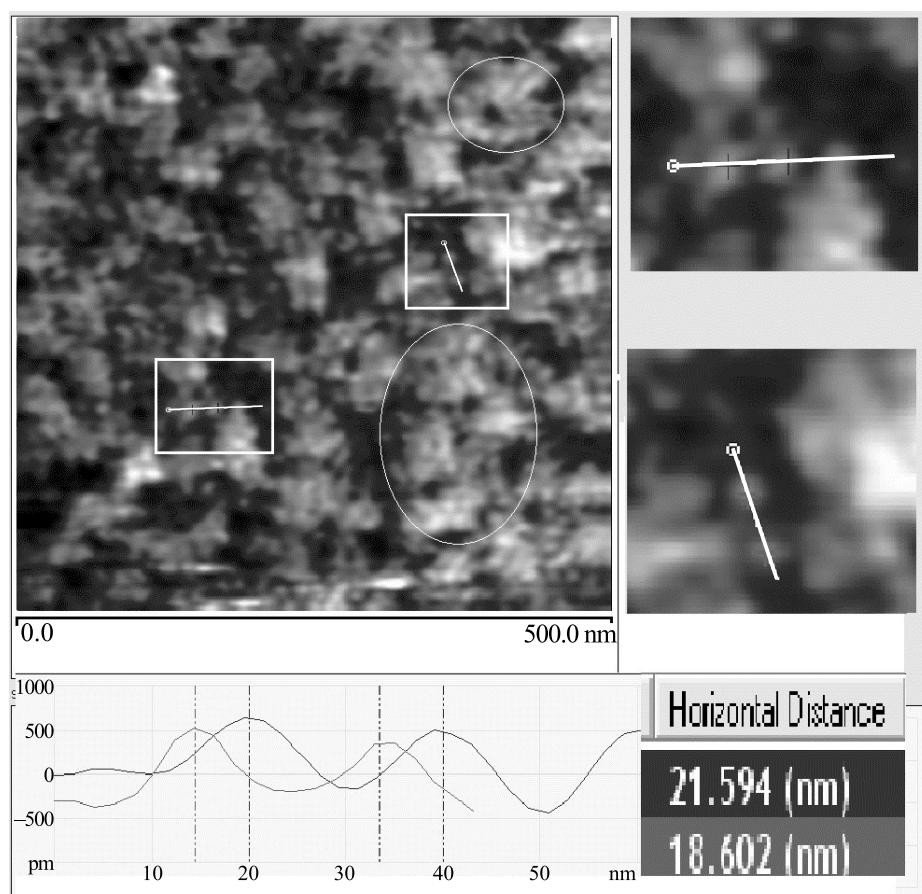


Рис. 4. АСМ-изображение комплекса «пептидогликан–порин» в предварительно сформированном липидном бислое, не содержащем ЛПС. Эллипсами выделены кластеры порина, состоящие из доменов белка. Внизу показан профиль поверхности образца вдоль линий в квадратных рамках, использованных для расчета средних размеров доменов порина.

ей белка в слабощелочной среде. На поверхности бислоя обнаруживаются регулярно расположенные домены порина со средним диаметром 35–40 нм и высотой 6–10 нм.

Во втором случае (рис. 4) в бислой не вводили ЛПС, поскольку по данным работы [10] в составе используемого нами комплекса «пептидогликан–порин» содержится не более 10% ЛПС, что согласуется с литературными данными, полученными для комплекса пептидогликан–порин из *E. coli* [9]. Количество порина в комплексе с пептидогликаном более чем в четыре раза превосходит содержание пептидогликана [9], при этом белок сохраняет все связи с пептидогликаном и ЛПС. Вследствие этого пространственная организация молекулы порина максимально соответствует его нативной конформации в мембране. Об этом свидетельствует высокая функциональная активность у такого комплекса, выявленная нами ранее с помощью метода бислойных липидных мембран [20]. Учитывая этот факт и то, что пептидогликан, связанный с порином, является

жестким «каркасом» бактериальной мембраны, мы предполагали, что при встраивании образца пептидогликан–порин в бислой могут быть получены максимально упорядоченные однородные кластеры белка на поверхности слюды.

Как видно из данных на рис. 4, поверхность образца «пептидогликан–порин» в липидном бислое представляет собой достаточно протяженные участки, состоящие из набора близких по размеру (порядка 80 нм) розеткообразных кластеров (выделены эллипсами). Однако протяженность и плотность упаковки этих наноструктурных образований на разных участках поверхности бислоя различаются. Указанные кластеры представляют собой скопление отдельных доменов. Их латеральные размеры были оценены на примере наиболее типичных минимальных деталей полученного АСМ-изображения (выделены квадратными рамками). Расстояния между минимумами на графике профиля линейного сканирования равны в среднем 20 нм. Мы предполагаем,

что эта величина соответствует размеру домена встроенного в бислой белка. Такое предположение основано на том, что молекула порина, состоящая из трех субъединиц, имеет латеральный размер 7–8 нм, определенный с помощью АСМ [21]. Учитывая это, можно предположить, что указанные домены порина имеют в своем составе не одну молекулу тримеров порина, что вполне коррелирует с литературными данными. Согласно современным представлениям в нативной мембране порин может существовать в виде гекса- и наномеров [22]. С другой стороны, видимое увеличение размеров домена порина может происходить за счет известного эффекта латерального уширения, связанного с конечным радиусом кривизны кантилевера.

Таким образом, в результате проведенных исследований апробированы различные подходы к формированию упорядоченных наноструктур OmpF-порина из наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* в присутствии фосфолипидного бислоя. Анализ морфологии полученных АСМ-изображений показал, что изолированные порины способны самопроизвольно встраиваться в фосфолипидный бислой с образованием нанодоменов. При этом степень эффективности и размер доменов поринов существенным образом зависят от условий эксперимента. Обнаружено, что снижение pH раствора способствует увеличению числа встроенных в бислой доменов белка. Показано, что эффективным вектором для встраивания порина при кислых значениях pH является ЛПС. Второй компонент наружной бактериальной мембраны, пептидогликан, с которым порин связан в нативном состоянии, наибольшим образом способствует образованию протяженных упорядоченных доменов белка.

Следует отметить также, что комплекс пептидогликан–порин обогащен порином и не содержит других мембранных белков, поскольку в процессе его получения происходит практически полная очистка от других белков, входящих в состав наружной бактериальной мембраны [9]. В связи с этим описанный в работе подход может оказаться достаточно перспективным для получения наноструктур на основе функционально активных мембранных белков по сравнению с использованием в качестве матрицы целых бактериальных клеток [23].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Wang, T.-S. Chung, Y. W. Tong, et al., *Small* **8** (8), 1185 (2012).
2. M. Bieligmeyer, F. Artukovic, S. Nussberger, et al., *Beilstein J. Nanotechnol.* **7**, 881 (2016).
3. Н. В. Медведева, О. М. Ипатова, Ю. Д. Иванов и др., *Биомед. химия* **52** (6), 529 (2006).
4. G. E. Schulz, *Biochim. Biophys. Acta* **1565** (2), 308 (2002).
5. A. Wiese, G. Schroder, K. Brandenburg, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1190** (2), 231 (1994).
6. D. J. Muller and A. Engel, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **13** (5), 338 (2008).
7. L. Hasler, J. B. Heymann, A. Engel, et al., *J. Struct. Biol.* **121**, 162 (1998).
8. Б. Глик и Д. Пастернак, *Молекулярная биотехнология: принципы и применение*. (Мир, М., 2002).
9. J. P. Rosenbusch, *J. Biol. Chem.* **249** (24), 8019 (1974).
10. T. I. Burtseva, L. I. Glebko, and Yu. S. Ovodov, *Analyt. Biochem.* **64** (1), 1 (1975).
11. О. Д. Новикова, Т. И. Вакорина, В. А. Хоменко и др., *Биохимия* **73** (2), 173 (2008).
12. J. C. Todt, W. J. Roque, and E. J. McGroarty, *Biochemistry* **31** (43), 10471, (1992).
13. F. A. Schabert and A. Engel, *Biophys. J.* **67** (6), 2394 (1994).
14. P.-E. Milhiet, F. Gubellin, A. Berquand, et al., *Biophys. J.* **91** (9), 3268 (2006).
15. О. П. Вострикова, Н. Ю. Ким, Г. Н. Лихацкая и др., *Биоорг. химия* **32** (4), 371 (2006).
16. J. H. Kleinschmidt and L. K. Tamm, *J. Mol. Biol.* **324** (2), 319 (2002).
17. J. H. Kleinschmidt, *Chem. Phys. Lipids* **141** (1–2), 30 (2006).
18. K. Sen and H. Nikaido, *J. Bacteriol.* **173** (2), 926 (1991).
19. О. Д. Новикова, Н. Ю. Ким, П. А. Лукьянов и др., *Биол. мембраны* **24** (2), 159 (2007).
20. О. П. Вострикова, Г. Н. Лихацкая, О. Д. Новикова и др., *Биол. мембраны* **17** (4), 399 (2000).
21. S. Jaroslavski, K. Duquesne, J. N. Sturgis, et al., *Mol. Microbiol. Biochem. J.* **74** (5), 1211 (2009).
22. H. Nikaido, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **676** (4), 593 (2003).
23. M. W. Ullah, Z. Shi, X. Shi, et al., *ACS Sustainable Chem. Eng.* **5** (12), 11163 (2017).

The formation of Ordered Structures of Bacterial Porins in a Lipid Bilayer and Analysis of Their Morphology by Atomic Force Microscopy

G.A. Naberezhnykh*, A.A. Karpenko**, V.A. Khomenko*, T.F. Solov'eva*, and O.D. Novikova*

*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. 100 Let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

**A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, ul. Palchevskogo 17, Vladivostok, 690041 Russia

The formation of ordered nanostructures of outer membrane porin from *Yersinia pseudotuberculosis* (YpOmpF) was carried out in two ways: from the proteoliposomes and by direct protein reconstitution in the pre-deposited phospholipid bilayer on the mica surface. Morphological analysis of structures obtained was performed using atomic force microscopy. It was shown that the efficiency of the formation, the degree of homogeneity, and the size of porin domains substantially depend on the experimental conditions and the presence of lipopolysaccharide in porin sample or in a bilayer. It was found that when proteoliposomes are used, aggregates of porin nanodomains, which are unevenly distributed throughout the bilayer and of very different size ranges (50–250 nm) are formed on the mica surface. With direct reconstruction of porin, it was shown that a decrease in the pH of the solubilizing buffer promotes the inclusion of a sufficiently large amount of protein in the form of homogeneous domains with an average size of 35–40 nm, but does not lead to the formation of extended nanostructured regions in the bilayer. The most efficient incorporation of porin into the lipid bilayer with the formation of clusters from tightly packed protein domains was achieved using a porin sample in combination with peptidoglycan and lipopolysaccharide, to which this protein is closely related in the native bacterial membrane.

Key words: porin, lipopolysaccharide, phospholipid bilayer, nanostructure, atomic force microscopy