

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.1

© Коллектив авторов

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОЛИГОМЕРНОГО СОСТОЯНИЯ ФЛАВОЦИТОХРОМА CYP102A1 С ПОМОЩЬЮ АСМ СО СТАНДАРТНЫМ И СВЕРХТОНКИМ ЗОНДАМИ

*Ю.Д. Иванов, Н.С. Бухарина\*, П.А. Французов, Т.О. Плешакова,  
Н.В. Крохин, С.Л. Канащенко, А.И. Арчаков*

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
“Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича” Российской академии медицинских наук,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: +7(499)2463761;  
факс: +7(495)2450857; эл. почта: natalie\_buharina@list.ru

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) с двумя типами зондов – стандартной кривизны (радиус  $R \sim 10$  нм) и сверхтонкими ( $R \sim 2$  нм) – была использована для определения олигомерного состояния CYP102A1. С помощью стандартных зондов были получены изображения CYP102A1 в условиях измерения в жидкости, на воздухе и в вакууме, а также было определено отношение мономеров к олигомерам ( $\alpha$ ) CYP102A1, которое составляло  $\alpha \approx 1$ . В то же время использование стандартных зондов не позволило разрешить структуру этих олигомеров. Использование сверхтонких зондов позволило получить данные не только о соотношении мономеров и олигомеров, но и о соотношении димеров, тримеров и тетрамеров в условиях измерения в вакууме. Таким образом, соотношение  $\alpha$  для CYP102A1 можно определить, используя стандартные зонды как в жидкости, так и на воздухе и в вакууме, а уточнение степени олигомеризации этого белка – используя сверхтонкие зонды в вакууме.

**Ключевые слова:** атомно-силовая микроскопия, цитохром P450 CYP102A1, олигомерное состояние.

**ВВЕДЕНИЕ.** Флавоцитохром P450 BM3 (CYP102A1) принадлежит к суперсемейству гемсодержащих ферментов цитохромов P450 и катализирует монооксигенацию жирных кислот [1]. Этот бактериальный фермент с молекулярной массой  $M_r = 119$  кДа [1] является белком, содержащим редуктазный (FMN/FAD) и гемовый домены в единой полипептидной цепи [2]. Хотя CYP102A1 – водорастворимый белок, его полная структура неизвестна: имеется лишь рентгено-структурный анализ (РСА) части белка, содержащей только два связанных домена: FMN- и гем-содержащий [2]. Объем этой части составляет приблизительно  $V_{\text{FMN/P450}} \approx 190$  нм<sup>3</sup>. На основе методов гель фильтрации и аналитического ультрацентрифугирования было показано, что полноразмерный CYP102A1 может существовать в мономерной и олигомерной формах, главным образом в виде димерной [3]. При этом олигомерная форма проявляет большую каталитическую активность, чем мономерная [4]. Так, активность мономерной формы CYP102A1 в реакции гидроксирования лауриловой кислоты составляет  $\sim 10$  с<sup>-1</sup> [4], а олигомерной – 50-86 с<sup>-1</sup> [4,5]. Перечисленные выше методы являются

\* - адресат для переписки

косвенными методами определения олигомерного состояния белка. Уточнение олигомерного состояния СYP102A1 представляется важной задачей для понимания механизма и создания модели его функционирования.

К методам, позволяющим определять распределение биомолекул по размерам непосредственно в жидкости, относится атомно-силовая микроскопия (АСМ) [6-14]. Этот метод находит все большее применение и позволяет визуализировать отдельные белки и их комплексы в условиях, близких к нативным. Вертикальное разрешение этого метода составляет порядка 1 Å, что близко к разрешению РСА [15]. Это позволяет определять высоту белка с использованием стандартных зондов [9, 10, 14]. В то же время латеральное разрешение определяется уширением от АСМ-зонда и составляет порядка 20-50 нм для стандартного и 2-5 нм для сверхтонкого зондов [16]. При использовании сверхтонкого АСМ-зонда измеряемый объем белка более близок к данным РСА по сравнению с измеренным стандартным зондом, а высота изображения белка существенно занижается [10]. В представленной работе олигомерное состояние СYP102A1 было определено с использованием стандартных и сверхтонких АСМ-зондов.

**МЕТОДИКА.** В работе использовался 10 мМ фосфатно-солевой буфер (PBSD, “Pierce”, США) pH 7,4, содержащий 8 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl; деионизованная ультрачистая вода, полученная на установке Simplicity UV (“Millipore”, США).

Цитохром СYP102A1 был предоставлен профессором A.W. Munro (Манчестерский Университет, Великобритания). Спектры поглощения СYP102A1 были измерены на спектрофотометре Agilent Model 8453 (США) при 25°C. Концентрацию очищенного СYP102A1 определяли из разностного спектра поглощения карбоксикомплекса его восстановленной формы, используя коэффициент экстинкции 91  $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  для разницы поглощения на длинах волн 450 нм и 490 нм в соответствии с методом, описанным Omura и Sato [17].

*Теоретическая оценка размеров СYP102A1.* Для оценки размеров олигомеров СYP102A1 использовали эллиптическую модель. В этой модели форма молекулы представляется эллипсоидом. Стоксовский радиус и объем молекулы в этом случае будут выражаться как [18]:

$$R^2 = \frac{1}{5} [3bc + a(b+c)] \quad (1),$$

$$V_n = \frac{4}{3} \pi abc * n \quad (2),$$

где  $R$  – стоксовский радиус эллипсоида,  $a, b, c$  – полуоси эллипсоида (для упрощения оценочных расчетов для молекулы СYP102A1 в дальнейшем под  $a$  принимается значение большей полуоси),  $n$  – степень олигомеризации белка и  $V_n$  – объем соответствующего олигомера.

*АСМ-измерения.* Иммуобилизация СYP102A1 осуществлялась за счёт нековалентной адсорбции молекул на АСМ-чипе, в качестве которого использовали свежезамороженную слюду (“SPI”, США). Для этого 2 мкл 0,5 мМ раствора СYP102A1 в 10 мМ PBSD буфере pH 7,4 (температура раствора 4-10°C) наносились на поверхность АСМ-чипа. После 3 мин инкубации образец промывали деионизованной водой.

АСМ-измерения были проведены в полуконтактном режиме на мультимодовом АСМ NTEGRA Aura (“НТ-МДТ”, Россия) в воздухе и вакууме, и на АСМ Nanoscope IVa (“Veeco”, США) в жидкости и на воздухе. Скорость сканирования составляла 1–3 Гц. В каждом эксперименте

было отснято не менее 10 кадров, размеры которых по X и Y составляли от 0,5 до 2 мкм. Каждый эксперимент был проведён не менее 3 раз.

Для проведения АСМ-измерений в жидкости подложка с иммобилизованным белком была помещена в раствор 2,5 мМ PBS, pH 7,4 при  $t=22^{\circ}\text{C}$ . АСМ-измерения в воздухе проводились в условиях относительной влажности (RH) около 60% и при  $t=22^{\circ}\text{C}$ , при этом предполагалось, что в условиях такой влажности белок сохраняет свою нативную структуру благодаря наличию слоя адсорбированной воды [7]. Для проведения АСМ-измерений в вакууме подложка с иммобилизованным белком была помещена в вакуумную камеру АСМ. Перед проведением измерений, камера вакуумировалась до остаточного давления  $10^{-2}$  Торр.

АСМ-измерения в жидкости были проведены зондами DNP-S10 (“Veeco”) с константой жёсткости 0,32–0,58 Н/м и со стандартным радиусом кривизны 10–20 нм. Для измерений на воздухе и в вакууме использовалось 2 типа зондов стандартной кривизны: NSG10 (“НТ-МДТ”) с радиусом 10–15 нм и константой жёсткости около 12 Н/м и PPP-NCH (“Nanosensors”, Швейцария) с радиусом кривизны около 10 нм и константой жесткости около 42 Н/м, а также сверхтонкие АСМ-зонды NSG01\_DLC (“НТ-МДТ”) с радиусом кривизны зонда 1–3 нм и с константой жёсткости 2,5–10 Н/м. Радиус кривизны зондов контролировался на электронном микроскопе Hitachi 5500 (Япония).

В контрольных экспериментах измерения проводились в соответствующем буфере без белка. Размер неспецифических объектов на АСМ-чипе в контрольных экспериментах не превышал 0,5–1,0 нм.

*Анализ АСМ-изображений.* Как было показано ранее [7, 10, 15], использование стандартного АСМ-зонда позволяет получать высоту белков с разрешением 0,1 нм. Для анализа высот изображений CYP102A1, полученных стандартным зондом, использовалось распределение по высотам  $\rho(h)$  [10]:

$$\rho(h) = \frac{N_h}{N} \cdot 100\% \quad (3),$$

где  $N_h$  – это число визуализированных белков с высотой  $h$ , а  $N$  – это общее число визуализированных белков. Аппроксимация экспериментальной зависимости (3) проводилась с помощью Гауссовой функции:

$$\rho(h) = \sum_{i=1}^2 \rho_i(h) = \sum_{i=1}^2 \frac{A e^{-4 \ln(2)(h-h_c)^2 / w^2}}{w \sqrt{\pi / 4 \ln(2)}} \quad (4),$$

где  $A$ ,  $h_c$ ,  $w$  – варьируемые при аппроксимации параметры.

Сверхтонкий АСМ-зонд использовался для измерения объёма белка и его агрегатов [10]. Для анализа размеров изображений CYP102A1, полученных сверхтонким зондом, использовалось распределение по высотам и объёмам  $\rho(h, V)$  [10]:

$$\rho(h, V) = \frac{N_{h,V}}{N} \cdot 100\% \quad (5),$$

где  $N_{h,V}$  – это число визуализированных белков с высотой  $h$  и объёмом  $V$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Трёхмерная структура полноразмерного белка неизвестна, поэтому из общих соображений, упрощённо форму этого белка можно представить в виде эллипсоида, как описано в разделе Методика. Для вычисления радиуса Стокса

эллипсоида необходимо знать размеры его полуосей. Эти размеры можно оценить следующим образом. Полная длина аминокислотной последовательности CYP102A1 составляет 1049 аминокислотных остатков (а.о.) (<http://www.uniprot.org/uniprot/P14779>), в том числе 458 а.о. гемового домена и 191 а.о. FMN-домена (PDB ID=1BVY) [2]. Следовательно, длина аминокислотной последовательности FAD-домена составляет 400 а.о. То есть линейные размеры FAD-домена приблизительно равны линейным размерам гемового домена (6,2×6,9×4,0 нм). Используя данные из [2], можно оценить размеры гемового домена, связанного с FMN-доменом (6,2×6,9×8,5 нм). Если добавить к нему FAD-домен, то линейные размеры всей молекулы составят приблизительно 6,2×6,9×(4,0+8,5~12,0) нм, которые и будут использованы в дальнейших расчётах оценки радиуса Стокса по формуле (1). Для упрощения оценочных расчётов возьмём  $2a=12$  нм,  $2b=2c=(6,2+6,9)/2=6,6$  нм. По этой модели диаметр мономера (двойной радиус Стокса), рассчитанный по формуле (1), должен составлять ~8 нм, как и в случае модели глобулярного белка, а объём мономера, рассчитанный по формуле (2) – 274 нм<sup>3</sup>. Диаметры и объёмы димеров ( $a=6,6$  нм,  $b=3,3$  нм,  $c=6$  нм) и тримеров ( $a=7,1$  нм,  $b=7,1$  нм,  $c=6$  нм), рассчитанные по формулам (1) и (2), составят 9,8 и 13,3 нм, 547 и 1266 нм<sup>3</sup>, соответственно.

*АСМ-исследование молекул CYP102A1 стандартными зондами.* Качественные АСМ-изображения белков можно получить при условии их хорошей адгезии на АСМ-чипе [7]. Это особенно критично для определения олигомерного состояния белков. В работе [10] на примере водорастворимого белка путидаредоксинредуктазы (PdR) из цитохром P450-содержащей системы было показано, что адгезия сильно зависит от того в каких условиях – в вакууме, на воздухе или в жидкости – проводятся измерения.

Поэтому были проведены АСМ-эксперименты по визуализации водорастворимого CYP102A1, нековалентно адсорбированного на слюде, в жидкости, на воздухе и в вакууме. АСМ-изображение CYP102A1, полученное стандартным зондом в жидкости, представлено на рисунке 1А. На рисунке 1Б представлено соответствующее распределение по высотам  $\rho(h)$  CYP102A1 АСМ-изображений. Аналогичные распределения были получены также для условий измерения в воздухе и в вакууме.

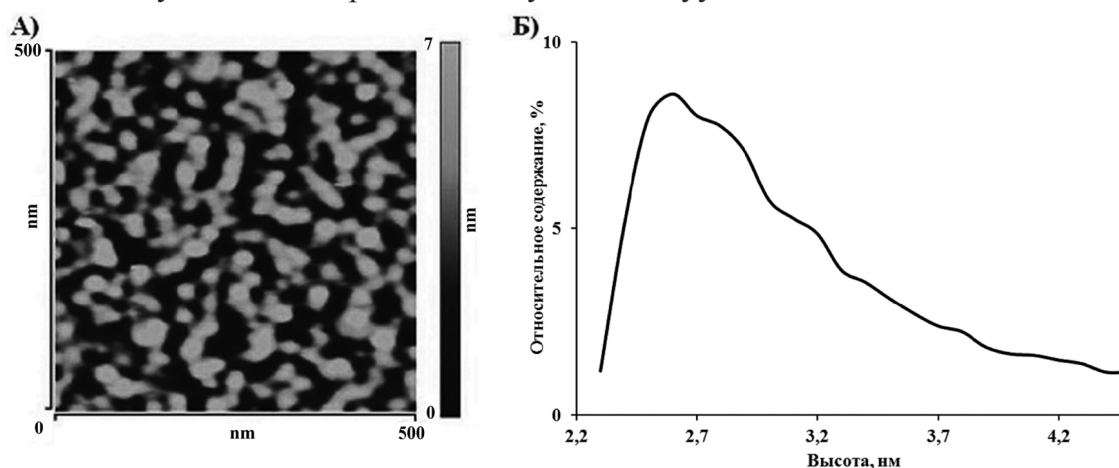


Рисунок 1.

АСМ-изображение адсорбированного на слюде CYP102A1, полученное в буфере (А) с использованием стандартного АСМ-зонда, и соответствующая плотность распределения CYP102A1 по высотам (Б). Экспериментальные условия были: 2,5 мМ PBSД буфер, pH 7,4.

Полуконтактный режим на АСМ Nanoscope IVa,  $t=22^{\circ}\text{C}$ .

Размеры отсканированных кадров  $0,5\times 0,5$  мкм<sup>2</sup>.



Экспериментальные зависимости плотностей распределения АСМ-изображений объектов по высотам  $\rho(h)$  хорошо аппроксимировались суммой двух экспонент, представленных функцией (4) (табл. 1). Там же приведены вклады каждой экспоненты в  $\rho(h)$  распределение в различных условиях. Как видно из таблицы 1, полученное в жидкости распределение АСМ-изображений  $\rho(h)_{buf}$  (рис. 1Б) характеризуется суммой двух распределений: распределения с  $h_{max1}(buf)=2,7\pm0,1$  нм, (с полной шириной на полувысоте, Full Width at Half Maximum, FWHM1=0,7±0,1 нм), соответствующей максимуму количества объектов с этой высотой первого типа, и распределения изображений с высотой  $h_{max2}(buf)=3,5\pm0,3$  нм, (FWHM2=1,8±0,3 нм), соответствующей максимуму количества объектов с этой высотой второго типа. Логично предположить, что распределение первого типа  $\rho_1(h)$  с меньшим размером  $h_{max1}$  соответствует распределению изображений мономеров CYP102A1 по высотам, а второе  $\rho_2(h)$  с большим размером высот  $h_{max2}$  соответствует распределению олигомеров.

Таблица 1. Высоты  $h_{max}$  и соотношение мономеров и олигомеров CYP102A1, адсорбированного на слюде, вычисленные по аппроксимированным распределениям по высотам АСМ-изображений, полученных стандартным зондом в жидкости, воздухе и вакууме.

Условия измерений/ АСМ прибор	Тип объектов	$h_{max}$ , нм	FWHM, нм	Доля объектов, %
Буфер/Nanoscope IVa (Veeco, США)	1. Мономеры	2,7±0,1	0,7	50±10
	2. Олигомеры	3,5±0,3	1,8	50±10
Воздух/Nanoscope IVa (Veeco, США)	1. Мономеры	1,5±0,1	0,4	40±10
	2. Олигомеры	1,9±0,1	0,8	60±10
Воздух/NTEGRA Aura (НТ-МДТ, Россия)	1. Мономеры	1,4±0,1	0,3	60±10
	2. Олигомеры	1,7±0,1	0,6	40±10
Вакуум/NTEGRA Aura (НТ-МДТ, Россия)	1. Мономеры	1,5±0,1	0,5	70±10
	2. Олигомеры	2,1±0,1	0,6	30±10

Соотношение  $\alpha$  между мономерами и олигомерами в растворе составляет  $\alpha=(0,5\pm0,1):(0,5\pm0,1)$ , соответственно. При измерении на воздухе на том же приборе (АСМ Nanoscope IVa) получено примерно такое же соотношение мономеров к олигомерам  $\alpha=(0,4\pm0,1):(0,6\pm0,1)$ . Так как АСМ Nanoscope IVa не позволяет проводить измерения в вакууме, то для получения изображения в этих условиях использовали АСМ NTEGRA Aura. В таблице 1 показаны значения  $\alpha$ , полученные для АСМ NTEGRA Aura на воздухе и в вакууме:  $\alpha=(0,6\pm0,1):(0,4\pm0,1)$  и  $\alpha=(0,7\pm0,1):(0,3\pm0,1)$ , соответственно.

Таким образом, молекулы белка в растворе находятся, как в виде мономеров, так и в виде олигомеров примерно в одинаковом соотношении. Из сравнения высот мономеров видно, что высоты белка незначительно изменяются при переходе измерений из воздуха в вакуум, что может свидетельствовать о стабильности структуры белка в этих условиях.

Стандартным зондом во всех перечисленных выше условиях не удаётся разрешить, в каких именно олигомерных состояниях находится белок, поэтому, была сделана попытка использовать для этой цели сверхтонкие зонды.

*АСМ-исследование молекул СYP102A1 сверхтонкими зондами.* С помощью сверхтонкого зонда были получены АСМ-изображения нековалентно адсорбированного СYP102A1 на воздухе и в вакууме на АСМ NTEGRA Aura. В буфере получить изображения СYP102A1 удовлетворительного качества не удалось, так как под действием сверхтонкого зонда молекулы СYP102A1 значительно смещаются по поверхности АСМ-подложки. Такой же эффект наблюдался в жидкости и для PdR, адсорбированной на слюде [10].

Для получения качественного изображения белка обычно предлагаются разные схемы уменьшения мобильности белка на подложке, например, с использованием криотехнологии [19]. Описываются также подходы по снижению мобильности белка при организации белка в плотные упорядоченные структуры в виде плёнки без использования криотехнологии [20]. Другой путь понижения подвижности белка на подложке при комнатной температуре связан с переходом измерений из жидкости в воздух. При этом качественные изображения белка удавалось получать при удалении влияния адсорбированной воды при измерениях на воздухе, которая наблюдается при влажности более 45% [7]. Нами ранее был использован подход по определению олигомерного состояния белков при измерении объёмов белковых комплексов при удалении слоя адсорбированной воды в вакууме [10].

В работе была проведена АСМ-визуализация СYP102A1 сверхтонкими зондами на воздухе и в вакууме. На рисунке 2А представлено изображение СYP102A1, полученное на воздухе в условиях влажности 60% с помощью сверхтонкого зонда, а на рисунке 2Б соответствующее распределение АСМ-изображений СYP102A1 по высотам  $\rho(h)$ . Как видно, получено хорошее изображение адсорбированных объектов. Аналогично были получены изображения СYP102A1 в вакууме.

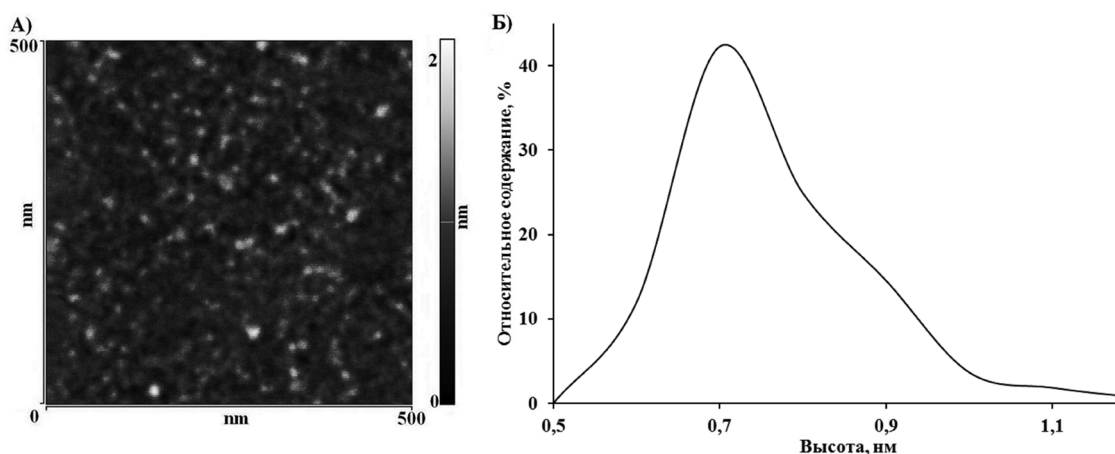


Рисунок 2.

АСМ-изображение СYP102A1, полученное в воздухе (А) с использованием сверхтонкого АСМ-зонда, и соответствующая плотность распределения СYP102A1 по высотам (Б). Экспериментальные условия были: воздух при влажности RH 60%. Полуконтактный режим на АСМ NTEGRA Aura,  $t=22^{\circ}\text{C}$ . Размеры отсканированных кадров  $0,5 \times 0,5$  мкм<sup>2</sup>.

Ранее было показано, что повышенное по сравнению со стандартными зондами латеральное разрешение изображений, полученных сверхтонкими зондами, позволяет рассчитать объёмы изображений объектов, соответствующих разным олигомерным состояниям белка [10].

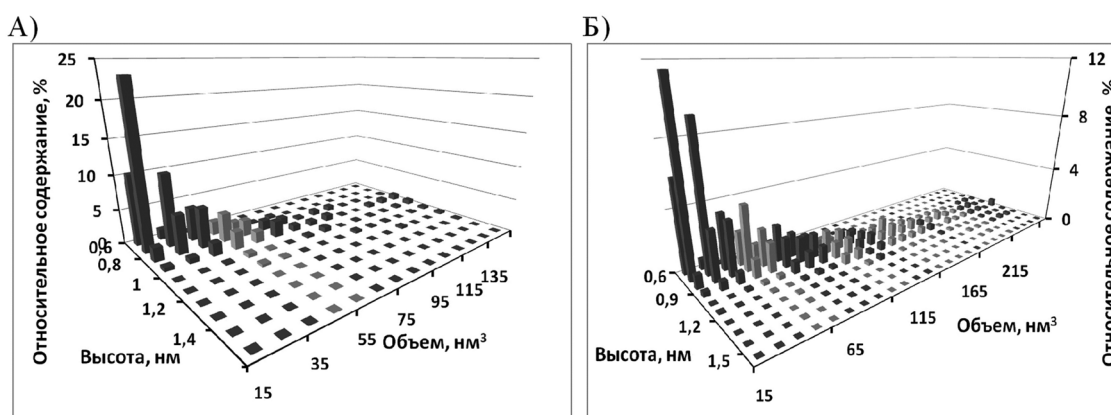
На рисунке 3А,Б представлены распределения АСМ-изображений СУР102А1 по высотам и объемам  $\rho(h, V)$ . Из таблиц 2 и 3 видно, что в пределах погрешности определения высоты, которая составляла  $\pm 0,1$  нм, значения высот объектов на воздухе и в вакууме совпадают. В то же время объекты, соответствующие распределениям по высотам и объемам  $\rho(h, V)$ , рассчитанные с использованием (5), условно можно разбить на 4 группы (табл. 2, 3):

1) объекты с минимальным объемом  $50 \pm 10$  нм<sup>3</sup> и высотой  $h_{max1} = 0,7 \pm 0,1$  нм соответствуют мономерам;

2) объекты с удвоенным значением объема  $100 \pm 10$  нм<sup>3</sup> и высотой  $h_{max2} = 0,9 \pm 0,1$  нм – димерам;

3) объекты с утроенным значением объема  $150 \pm 20$  нм<sup>3</sup> и высотой  $h_{max3} = 1,0 \pm 0,1$  нм – тримерам;

4) объекты с большими объемами – агрегатам более высокого порядка и т.д.



**Рисунок 3.**

Плотность распределения АСМ-изображений СУР102А1, полученных сверхтонким АСМ-зондом, по высотам и объемам  $\rho(h, V)$ . (А)  $\rho(h, V)$  на воздухе RH 60%; (Б)  $\rho(h, V)$  в вакууме при остаточном давлении  $P \sim 10^{-2}$  Торр.

**Таблица 2.** Характеристики мономеров и олигомеров СУР102А1, адсорбированного на слюде, рассчитанные на основе данных АСМ-сканирования сверхтонким зондом в воздухе.

Тип объектов	$h_{max}$ , нм	Объем, нм <sup>3</sup>	Доля объектов, %
1. Мономеры	$0,7 \pm 0,1$	$50 \pm 10$	$86 \pm 10$
2. Димеры	$0,9 \pm 0,1$	$100 \pm 10$	$10 \pm 2$
3. Тримеры	$1,0 \pm 0,1$	$150 \pm 20$	$4 \pm 1$

**Таблица 3.** Характеристики мономеров и олигомеров СУР102А1, адсорбированного на слюде, рассчитанные на основе данных АСМ-сканирования сверхтонким зондом в вакууме.

Тип объектов	$h_{max}$ , нм	Объем, нм <sup>3</sup>	Доля объектов, %
1. Мономеры	$0,7 \pm 0,1$	$50 \pm 10$	$53 \pm 11$
2. Димеры	$0,9 \pm 0,1$	$100 \pm 10$	$27 \pm 5$
3. Тримеры	$1,0 \pm 0,1$	$150 \pm 20$	$13 \pm 3$
4. Агрегаты более высокого порядка	$1,0 \pm 0,1$	$200 \pm 20$	$7 \pm 1$

Как видно, высоты всех объектов находятся в пределах 0,6-1,1 нм, то есть гораздо меньше линейных размеров белка СYP102A1, рассчитанных для эллиптической модели: 6,2×6,9×12 нм. Это, по-видимому, связано с существенным сжатием молекулы белка под давлением сверхтонкого зонда, что обусловлено высокой локальной эластичностью молекулы. В то же время объём молекулы белка также существенно занижен относительно ожидаемого из данных РСА. Для выяснения причины получения пониженных объёмов оценим систематическую погрешность измерения объема из-за влияния сверхтонкого зонда. Можно выделить два существенных эффекта при применении сверхтонкого зонда:

а) уменьшение высоты  $h$  изображения белка под действием сверхтонкого зонда по сравнению с РСА данными [2]. В случае СYP102A1 это уменьшение составляет  $h_{PCA}/h_{ACM} \sim 6 \text{ нм}/0,7 \text{ нм} = 8,6$  раз.

б) увеличение диаметра молекулы за счёт латерального уширения при радиусе кривизны сверхтонкого зонда 2 нм. В нашем случае диаметр изображения увеличивается на  $\Delta d = 4$  нм [16], то есть в  $(2b + \Delta d)/2b = (6,6 + 4) \text{ нм}/6,6 \text{ нм} = 1,6$  раз и  $(2a + \Delta d)/2a = (12 + 4) \text{ нм}/12 \text{ нм} = 1,3$  раза, где  $2a$  и  $2b$  – оси эллипсоида. Таким образом, общее занижение объёма составляет

$$\sigma_V = \frac{V_{PCA}}{V_{ACM}} = \frac{h_{PCA} \cdot S_{PCA}}{h_{ACM} \cdot S_{ACM}} = \left( \frac{h_{PCA}}{h_{ACM}} \right) \cdot \left( \frac{S_{PCA}}{S_{ACM}} \right) \quad (6),$$

где площади можно вычислить, как  $S_{PCA} = 2a2b$ ,  $S_{ACM} = (2a + \Delta d)(2b + \Delta d)$ , откуда следует, что  $\sigma_V = (h_{PCA}/h_{ACM})2b/(2b + \Delta d)2a/(2a + \Delta d) = 8,6/1,6/1,3 = 4$ . То есть ожидаемый измеряемый на АСМ объём СYP102A1 должен быть в 4 раза меньше рассчитанного из РСА данных.

Сравним измеренный объём АСМ-изображений объектов группы (1) – мономеров, представленных в таблице 2, с рассчитанным из данных РСА объёмом мономеров – 270 нм<sup>3</sup>. Это сравнение показывает, что измеренные объекты группы (1), характеризующиеся объёмом 50 нм<sup>3</sup>, в самом деле, в 5 раз меньше теоретического объёма, соответствующего мономерам СYP102A1. Таким образом, можно сделать вывод, что наблюдаемое 5-кратное уменьшение объёма белка соответствует предполагаемому значению  $\sigma_V$ . Занижение измеренного объёма может быть связано с большим локальным сжатием молекулы белка сверхтонким зондом в её локальной области, даже несмотря на наблюдаемый эффект латерального уширения, как следует из уравнения (6).

В таблицах 2 и 3 представлена определённая по данным АСМ-сканирования в условиях измерений в воздухе и в вакууме степень олигомеризации СYP102A1. Соответствующее соотношение  $\beta = (\text{момеры}):(\text{димеры}):(\text{тримеры}):(\text{агрегаты более высокого порядка})$ , полученное на воздухе, составило  $\beta(\text{воздух}) = 0,86:0,10:0,04$ , интегральная доля олигомеров 14% (табл. 2), а в вакууме  $\beta(\text{вакуум}) = 0,53:0,27:0,13:0,07$ , интегральная доля олигомеров 47% (табл. 3). Интересно сравнить эти данные по соотношению мономеров и олигомеров, полученные сверхтонкой иглой на воздухе и в вакууме. Как видно, на воздухе доля мономеров составляет  $\approx 90 \pm 10\%$ , т.е. практически все объекты наблюдаются в виде мономеров. Это может быть связано с тем, что при АСМ-измерении тонкой иглой сила, действующая на объекты визуализации на воздухе на порядок больше силы в вакууме, при одинаковой амплитуде вынужденных колебаний ( $A$ ) кантилевера (что было реализовано в условиях эксперимента), что может приводить к разбиванию олигомеров на момеры. Действительно, силу воздействия со стороны сверхтонкого зонда можно оценить по формуле:



$$F = \frac{k\sqrt{A_0^2 - A^2}}{2Q},$$

где  $k$  – коэффициент жесткости кантилевера,  $A_0$  и  $A$  – свободная и вынужденные амплитуды колебаний кантилевера,  $Q$  – добротность. Так как согласно [21, 22], добротность кантилевера в воздухе ~ в 10 раз меньше, чем в вакууме, то отсюда следует, что значения силы на порядок больше в воздухе, чем в вакууме при условии одинаковых амплитуд свободных и вынужденных колебаний.

Из таблицы 3 видно, что доля мономеров, измеренная тонкой иглой в вакууме ( $53 \pm 11\%$ ), примерно равна доле мономеров, измеренной стандартной иглой в жидкости ( $50 \pm 10\%$ ) и на воздухе ( $40 \pm 10\%$ ,  $60 \pm 10\%$ ), то есть можно сделать два вывода. Первый вывод – это то, что олигомерное состояние CYP102A1 не меняется при переходе измерений из жидкости в воздушную фазу или вакуум. Второй вывод, что для детального разрешения олигомерного состояния белка с помощью сверхтонких зондов измерения следует проводить в вакууме, где воздействие АСМ-иглы на CYP102A1 менее существенное, чем на воздухе.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** С помощью АСМ в жидкости с использованием стандартного зонда было показано, что CYP102A1, иммобилизованный на подложку, находится, как в мономерном, так и в олигомерном состояниях. В то же время, как показали измерения стандартным и сверхтонким зондами, при переходе измерений из жидкости в воздух и вакуум олигомерное состояние белка не меняется. Таким образом, с помощью стандартной иглы можно определить высоту и соотношение долей мономеров и олигомеров как в жидкости, так и на воздухе и в вакууме, а с помощью сверхтонкой иглы в вакууме разрешить более детально олигомерное состояние CYP102A1. Хотя сверхтонкий зонд позволяет визуализировать CYP102A1 на воздухе и в вакууме, в то же время корректно получить такую информацию о степени олигомеризации можно только в вакууме.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК 02.740.11.0791, РФФИ 11-04-12018-офи-м.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Munro A., Leys D., McLean K., Marshall K., Ost T., Daff S., Miles C., Chapman S., Lysek D., Moser C., Page C., Dutton P. (2002) Trends Biochem. Sci., **27**(5), 250-257.
2. Sevrioukova I., Li H., Zhang H., Peterson J., Poulos T. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**(5), 1863-1868.
3. Black S., Martin S. (1994) Biochemistry, **33**(40), 12056-12062.
4. Neeli R., Girvan H., Lawrence A., Warren M., Leys D., Scrutton N., Munro A. (2005) FEBS Letters, **579**, 5582-5588.
5. Noble M., Miles C., Chapman S., Lysek D., Mackay A., Reid G., Hanzlik R., Munro A. (1999) Biochem. J., **339**, 371-379.
6. Liu Z., Meng R., Zu Y., Li Q., Yao L. (2009) Scanning, **31**(4), 160-166.
7. Thomson N. (2005) J. Microscopy, **217**, 193-199.

8. Archakov A.I., Ivanov Yu.D. (2011) BBA - Proteins and Proteomics, **1814**, 102-110.
9. Иванов Ю.Д., Бухарина Н.С., Французов П.А., Плешакова Т.О., Мунро А.В., Хуэй Бон Хоа Г., Арчаков А.И. (2010) Нанотехнологии и охрана здоровья, **1**(2), 30-35.
10. Ivanov Yu., Frantsuzov P., Ivanov A., Bykov V., Besedin S., Hui Bon Hoa G., Archakov A. (2010) Anal. Methods, **2**, 688-693.
11. Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Archakov A.I. (2004) Proteomics, **4**, 2390-2396.
12. Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Archakov A.I. (1999) Arch. Biochem. Biophys., **371**(1), 1-7.
13. Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Bykov V.A., Saunin S.A., Fedorov I.A., Lemeshko S.V., Hui Bon Hoa G., Archakov A.I. (2002) Proteomics, **2**, 1699-1705.
14. Kotova S., Prasad K., Smith P.D., Lafer E.M., Nossal R., Jin A.J. (2010) FEBS Lett., **584**, 44-48.
15. Müller D.J., Engel A. (2007) Nat. Protoc., **2**, 2191-2197.
16. Butt H.-J., Guckenberger R., Rabe J.P. (1992) Ultramicroscopy, **46**, 375-393.
17. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2370-2378.
18. Дудин И.В., Нариманов Р.К. (2004) Известия Томского политех. университета, **307**(3), 17-21.
19. Zhang Y., Sheng S., Shao Z. (1996) Biophys. J., **71**, 2168-2176.
20. Müller C., Allen M., Elings V., Engel A., Müller D.J. (1999) Biophys. J., **77**(2), 1150-1158.
21. Yamada H., Kobayashi K. (2007) in: Applied Scanning Probe Methods VI (Bhusan B., Kawata S., eds.), Springer, pp. 205-245.
22. Tamayo J., Humphris A.D., Owen R.J., Miles M.J. (2001) Biophys. J., **81**(1), 526-537.

Поступила: 15. 11. 2011.

# OLIGOMERIC STATE INVESTIGATION OF FLAVOCYTOCHROME CYP102A1 USING AFM WITH STANDARD AND SUPERSHARP PROBES

**Yu.D. Ivanov, N.S. Bukharina, P.A. Frantsuzov, T.O. Pleshakova, N.V. Krohin,  
S.L. Kanashenko, A.I. Archakov**

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences,  
Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia,; phone: +7(499)2463761; fax: +7(495)2450857;  
e-mail: natalie\_buharina@list.ru

Atomic force microscopy with two types of probes – standard (radius of curvature  $R \sim 10$  nm) and supersharp ( $R \sim 2$  nm) – was used to determine CYP102A1 oligomeric state. CYP102A1 images were obtained in a liquid, air and vacuum environment using the standard probes, also a ratio of monomers to oligomers ( $\alpha$ ) of CYP102A1 were determined as  $\alpha = 0.48:0.52$ . At the same time use of standard probes did not allow to resolve the structure of these oligomers. Supersharp probes allowed to obtain the data about the monomers to oligomers ratio, and also about the dimers/trimers/tetramers ratio in air and vacuum. So, a ratio  $\alpha$  of CYP102A1 in liquid can be determined by the standard probes, and an oligomeric state of protein can be specified by the supersharp probes.

**Key words:** atomic force microscopy, cytochrome P450 CYP102A1, oligomeric state.