

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.3

© Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА (НА) ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ЛИПОСОМАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

И.В. Погарская, Н.А. Контаров, Н.В. Балаев, Н.В. Юминова*

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова,
РАМН, 105064 Москва, Малый Казенный пер., д. 5а; тел.: (495) 674-01-99;
эл. почта: kontarov@mail.ru

С помощью метода тушения собственной флуоресценции белка исследовано влияние фосфолипидов на конформационное состояние гемагглютинина (НА). Показано, что взаимодействие НА с модельными фосфолипидными мембранами сопровождается изменением структурно-динамической организации белка. Данный метод может быть использован с целью контроля структурной организации белков при получении виросом, в частности, гриппозной виросомальной вакцины.

Ключевые слова: собственная флуоресценция белка, гемагглютинин, липосомы, структурно-динамическая организация белка.

ВВЕДЕНИЕ. Изучение механизмов образования белок-липидных комплексов имеет большое прикладное значение при получении виросомальных вакцин. В наших предыдущих исследованиях было выявлено вирусингибирующее действие безхолестериновых липосом в отношении вирусов гриппа. Механизм данного явления заключается в экстракции холестерина из вирусной оболочки липосомами, что, в свою очередь, приводит к невозможности слияния вирионов гриппа с клетками [1, 2]. Однако, о взаимодействии гемагглютинина (НА) вируса гриппа с липосомами на данный момент ничего не известно. В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение влияния нейтрально и отрицательно заряженных фосфолипидов липосом на структурно – динамические свойства молекулы НА с помощью метода тушения собственной флуоресценции белка. Используемые в работе нейтральный и анионные фосфолипиды в составе липосом выбраны с целью выявления общих механизмов их воздействия, не зависящих от заряда, на структурно-динамическую организацию НА.

МЕТОДИКА. В работе использовали НА из штамма вируса H3N2 фирмы “Sigma” (Германия). Липосомы из фосфатидилхолина (ФХ) и его смесей (2:1) с кардиолипином (КЛ) или фосфатидилсерином (ФС) фирмы “Sigma” (Германия) получали озвучиванием липидных суспензий в течение 3 минут при 5°C на частоте 22 кГц с помощью диспергатора УЗДН-1. Для исследования влияния фосфолипидов на конформацию НА использовали катионный тушитель Cs⁺ (CsCl) и нейтральный тушитель акриламид фирмы “Merk” (Германия).

Диаметр везикул, который определяли по методу [3], составлял 90±1,5 нм. Молярное соотношение белок:липид в 0,01 М трис-HCl, pH=7,4 составляло 1:90 при концентрации белка 2 мкМ. Перед измерением белковой флуоресценции липосомы отделяли с помощью фильтрации (фильтры Millipore, d_{пор} = 80 нм). Измерения проводили на спектрофлуориметре Zenyth-200St (РФ) при длине волны

* - адресат для переписки

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕМАГГЛЮТИНИНА С ЛИПОСОМАМИ

возбуждения 290 нм. Интенсивность флуоресценции регистрировали при 325 нм. Данные по тушению флуоресценции НА внешними тушителями анализировали с помощью уравнения Штерна–Фольмера, так как оно позволяет регистрировать динамическое тушение флуорофора, связанное со структурно-динамическими свойствами белковых молекул [4]:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q],$$

где F_0 , F – интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя, K_{sv} – константа Штерна–Фольмера, $[Q]$ – концентрация тушителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунках 1 и 2 приведены графики Штерна–Фольмера для тушения собственной флуоресценции НА в буфере и в комплексе с липосомами.

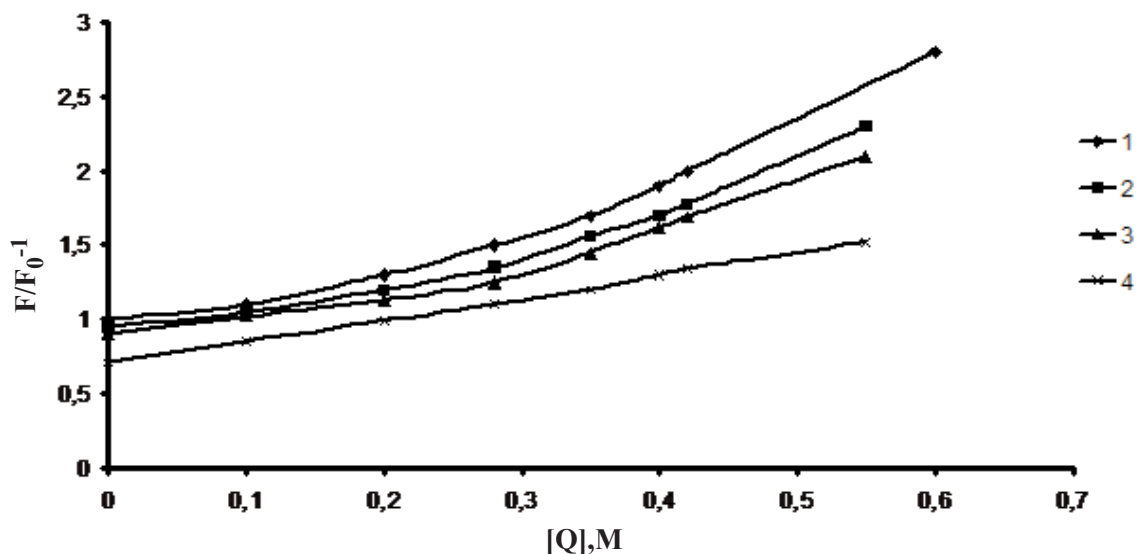


Рисунок 1.

Графики Штерна–Фольмера для тушения флуоресценции гемагглютинина акриламидом.

1 - НА + смесь ФХ с ФС (2:1); 2 - НА + смесь ФХ с КЛ (2:1); 3 - НА + ФХ; 4 - НА.

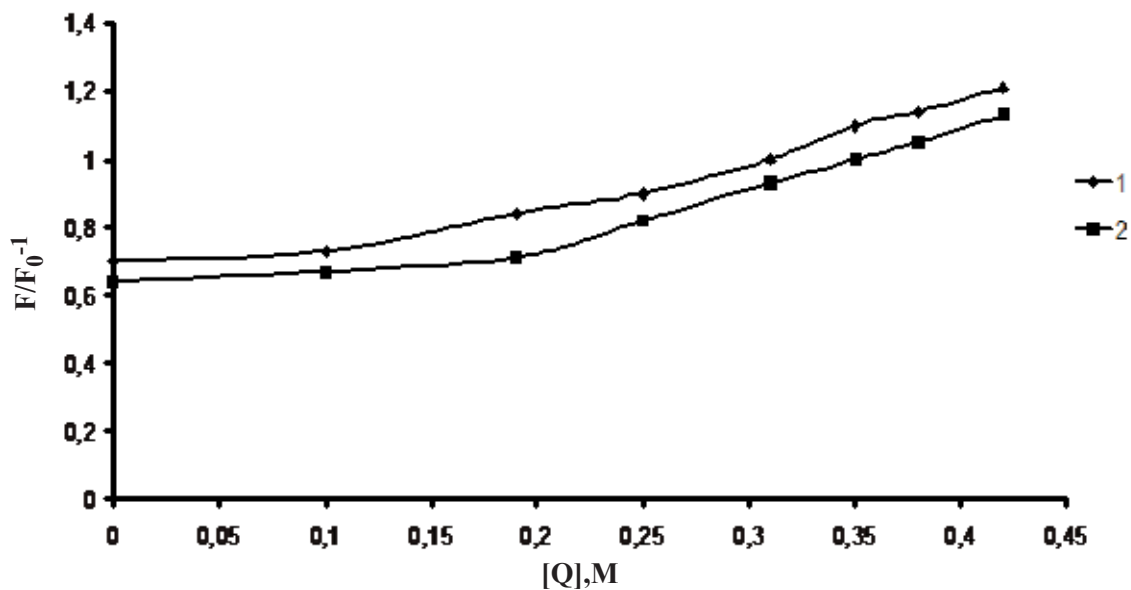


Рисунок 2.

Графики Штерна–Фольмера для тушения флуоресценции гемагглютинина ионами цезия.

1 - НА; 2 - НА + липосомы.

Можно видеть, что взаимодействие с фосфолипидными везикулами сопровождается заметным возрастанием эффективности тушения флуоресценции остатков триптофана акриламидом (рис. 1), в то время как катионный тушитель практически не тушит флуоресценцию (рис. 2). Низкая эффективность тушения флуоресценции НА ионами Cs^+ обусловлена доступностью тушителю слабо флуоресцирующих остатков. При связывании белка с липосомами участки полипептидных цепей, содержащие эти остатки, по-видимому, погружаются в гидрофобную зону и становятся малодоступными для ионов Cs^+ . Основной вклад в собственную флуоресценцию белка вносят, по нашим данным [6], в основном остатки триптофана. Нейтральный тушитель – акриламид – способен тушить флуоресценцию хромофоров как поверхностную, так и внутреннюю. Диффузия акриламида во внутреннюю белковую матрицу определяется двумя факторами: конформационными флуктуациями белка в наносекундном диапазоне и локальным разворачиванием белковой молекулы [5]. Наблюдаемое повышение доступности остатков триптофана акриламиду при образовании комплекса НА с липосомами является следствием изменения динамического состояния белковой глобулы. В таблице приведены значения константы Штерна–Фольмера, рассчитанные по данным рисунков 1 и 2 как тангенсы угла наклона соответствующих зависимостей с помощью метода наименьших квадратов для тушения флуоресценции НА с акриламидом.

Таблица. Значения констант Штерна–Фольмера для тушения флуоресценции НА акриламидом.

Система	НА	НА+ ФХ	НА+ФХ+КЛ	НА+ФХ+ФС
K_{sv}, M^{-1}	$1,48 \pm 0,031$	$2,14 \pm 0,022$	$2,3 \pm 0,025$	$2,95 \pm 0,028$

Из приведённых данных следует, что НА обладает большей структурной жёсткостью с нейтральными ФХ–везикулами, чем в комплексе с заряженными липосомами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. С помощью метода тушения собственной флуоресценции белка впервые выявлены структурно-функциональные изменения НА вируса гриппа при взаимодействии с липосомами, связанные с нарушением третичной структуры белка, обусловленным межмолекулярным взаимодействием фосфолипидов и НА. Полученные результаты могут быть полезны при разработке и получении виросом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Контаров Н.А., Артюшенко С.В., Маркушин С.Г., Бубнов Ю.Н. (2008) Материалы международной конференции Органическая химия для медицины, Черноголовка, с. 78-79.
2. Контаров Н.А. (2010) Механизмы ингибирующего действия борных производных адамантана и липосом в отношении вирусов гриппа. Дисс. канд. наук, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва.
3. Контаров Н.А., Лотте В.Д., Артюшенко С.В. (2009) Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, **6**, 95-94.
4. Лакович Дж. (1986) Основы флуоресцентной спектроскопии (пер. с англ.), Мир, М.
5. Eftink M., Ghiron C. (1981) Anal. Biochem., **114**, 199-194.
6. Артюшенко С.В., Контаров Н.А., Юминова Н.В. (2011) Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол., **4**, 36-40.

Поступила: 17. 11. 2011.

**THE STUDY OF STRUCTURAL CHANGES IN INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ (HA)
AFTER INTERACTION WITH LIPOSOMES BY THE FLUORESCENCE METHOD**

I.V. Pogarskaya, N.A. Kontarov, N.V. Balaev, N.V. Yuminova

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences,
Maliy Kazenniy pereulok, 5a, Moscow, 105064 Russia; tel.: (495) 674-01-99;
e-mail: kontarov@mail.ru

Using the method of self fluorescence quenching influence of phospholipids on conformational state of HA has been studied. Interactions of HA with model phospholipids membranes are accompanied by changes of structure-dynamic protein organization. This method could be used for controlling the structure organization of proteins after receiving by virus the influenzal virusomal vaccine.

Key words: self fluorescence of protein, hemagglutinin, liposomes, structure-dynamic protein organization.