

©Коллектив авторов

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ И ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА А/ВАНГКОК/1/1979 (H3N2) С ЛИПОСОМАМИ ИЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА

*Н.А. Контаров<sup>1,2\*</sup>, Е.И. Долгова<sup>2</sup>, И.В. Погарская<sup>2</sup>, Е.О. Контарова<sup>3</sup>, Ю.Б. Гришунина<sup>4</sup>, Н.В. Юминова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 2; \*эл. почта: kontarov@mail.ru

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, 115088, Москва, Малый Казенный пер., 5а

<sup>3</sup>Федеральный научно-клинический центр Клиническая больница №83, 115682, Москва, Ореховый бульвар, 23

<sup>4</sup>Московский институт электроники и математики имени А.Н. Тихонова Национального исследовательского университета “Высшая школа экономики”, 123458, Москва, ул. Таллинская, 34

Изучение взаимодействия поверхностных вирусных белков с модельными фосфолипидами важно для подробного исследования механизмов проникновения вирусов в клетки при инфицировании. Подходящей системой, моделирующей клеточную мембрану, являются липосомы. Методом равновесной адсорбции исследовали связывание гемагглютинина (НА) вируса гриппа с фосфатидилхолиновыми липосомами. Представлялось интересным выяснить, какие изменения в структуре белка происходят при его переходе с поверхности мембраны вглубь её. Для этого в данной работе исследовали адсорбцию НА на фосфолипидном бислое при образовании комплекса НА с фосфолипидами. Определение термодинамических параметров проводили при рН 4,0 и рН 6,0, используя уравнения Скэтчарда и Гиббса-Гельмгольца. Анализ полученных результатов позволил определить гидрофобный тип взаимодействия НА с липосомами. Дополнительным подтверждением наличия гидрофобного белок-липидного взаимодействия послужило определение констант распределения НА в двухфазных системах: декстран-полиэтиленгликоль ( $K_1$ ) и декстран-полиэтиленгликоль, этерифицированный пальмитиновой кислотой ( $K_2$ ). Наличие гидрофобного взаимодействия НА с мембраной липосом было также подтверждено с помощью метода тушения собственной белковой флуоресценции нейтральным тушителем акриламидом. При рН 4,0 отмечено увеличение значения константы тушения Штерна-Фольмера для системы НА+липосомы из фосфатидилхолина, что вызвано структурными изменениями НА при встраивании в бислой липосомы. Рассчитанные с помощью уравнения Штерна-Фольмера константы скорости тушения флуоресценции указывают на статический механизм тушения, при котором тушитель взаимодействует с флуорофорами неподвижной молекулы белка. Полученные результаты интересны не только с теоретической точки зрения изучения процесса слияния вируса с клеткой, но имеют и практическое применение. Используя значения константы связывания белка с бислоем и свободной энергии, можно подбирать оптимальный фосфолипидный состав липосом или виросом с целью получения более прочного их комплекса с различными вирусными белками. Применение двухфазных систем позволяет определять наличие гидрофобных участков на поверхности вирусного белка, что может быть использовано не только для оценки белок-липидного и белок-белкового взаимодействия.

**Ключевые слова:** гемагглютинин гриппа; липосомы; координаты Скэтчарда; гидрофобное взаимодействие; тушение флуоресценции

**DOI:** 10.18097/PBMC20206605401

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для изучения механизмов проникновения вируса гриппа в клетки (фузии) используются модельные системы — липосомы [1, 2]. Известно, что основным поверхностным белком вириона, ответственным за процесс фузии, является гемагглютинин (hemagglutinin, НА). На сегодняшний день проведено значительное количество исследований, описывающих данный процесс [3-8]. При этом термодинамические параметры связывания НА с модельными мембранами, такие как свободная энергия связывания Гиббса, энтальпия и энтропия связывания, а также константа связывания и стехиометрия

связывания (число участков связывания белка на поверхности липосом), до сих пор не определены. Термодинамические параметры связывания позволяют определить вклад белок-липидных взаимодействий между НА вируса гриппа и мембраной клетки, которые, наряду с рецепторными взаимодействиями, играют ключевую роль в процессе слияния и проникновения вируса в клетку. С помощью указанных параметров можно фактически определить насколько эффективно взаимодействие белка с липосомальной мембраной.

В настоящей работе проведено определение термодинамических параметров связывания НА с липосомами из фосфатидилхолина при различных значениях рН с целью выявления характера

взаимодействия НА с липидными мембранами. При значении рН 4,0 моделируется взаимодействие НА с эндосомальной мембраной клетки в процессе инфицирования вирусом, а значение рН 6,0 выбрано с целью выявления изменений взаимодействия белка с мембраной эндосомы при снижении кислотности среды.

## МЕТОДИКА

В работе использовали НА из штамма A/Bangkok/1/1979H3N2 (“Mybiosource”, США), декстран Т70 со средней молекулярной массой  $M_n=70 \times 10^3$ , полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой  $M_n=6,0 \times 10^3$  и пальмитиновую кислоту фирмы “Sigma” (Германия). Для приготовления липосом из синтетического фосфатидилхолина (3-sn-Phosphatidylcholine, ФХ) (“Sigma”) раствор фосфолипида в этаноле упаривали в вакууме. К липидной пленке добавляли 0,01 М трис-НСI-буфер, рН 6,0. Конечная концентрация фосфолипида составляла 10 мг/мл. Суспензию механически встряхивали 10 мин, затем озвучивали 7 мин при 4°C с помощью диспергатора УЗДН-1 при частоте 22 кГц. Озвученную суспензию центрифугировали 30 мин при 30000 g. В работе использовали супернатант. Для определения диаметра липосом с помощью метода динамического светорассеяния использовали прибор Delsa Nano C (“Beckman Coulter Inc.”, США). Средний диаметр ФХ липосом составил  $95,0 \pm 1,65$  нм. Присутствие продуктов окисления ФХ в липосомах определяли с помощью индекса окисленности Кляйна (ИО) [9]. К 0,1 мл дисперсии липосом добавляли 95% этиловый спирт до конечного объема 10 мл. Оптическую плотность спиртового разведения определяли относительно 95% этилового спирта на спектрофотометре Anthos Zenyth 200rt (“Biochrom”, Великобритания) при длинах волн в диапазоне 200-300 нм. Значения ИО рассчитывали по формуле (1):

$$ИО = \frac{(D_{233} - D_{300})}{(D_{215} - D_{300})} \quad (1)$$

где  $D_{233}$ ,  $D_{215}$  и  $D_{300}$  — оптическая плотность анализируемого образца, измеренная относительно 95% этилового спирта при длинах волн 233 нм, 215 нм и 300 нм соответственно. Рассчитанное по формуле (1) среднее значения ИО для дисперсии липосом составляло 0,10. Реакцию связывания проводили в 0,01 М трис-НСI-буфере при рН 6,0 и в 0,01 М ацетатном буфере при рН 4,0 и температуре 22°C в течение 80 мин. Молярное соотношение белок : липид не превышало  $10^{-2}$ . Свободный и связанный с липосомами белок разделяли с помощью гель-фильтрации на колонках  $1 \times 25$  см с гелем HW-60F. Скорость элюции составляла 10 мл/ч. Концентрацию белка определяли по методу Lowry [10]. Определение белка в двухфазной системе декстран-полиэтиленгликоль и декстран-полиэтиленгликоль, этерифицированный пальмитиновой кислотой, описано в работе [11].

Для изучения тушения белковой флуоресценции был использован флуоресцентный спектрофотометр Hitachi F-4500 (“Hitachi”, Япония) с кварцевой ячейкой 1,0 см и термостатом. Спектры тушения флуоресценции были получены в диапазоне длин волн эмиссии от 300 нм до 500 нм при длине волны возбуждения 283 нм, ширина щели составляла 5,0 нм. В качестве тушителя флуоресценции использовался акриламид фирмы “Merck” (Германия). Измерения тушения флуоресценции для указанных выше систем проводили при двух значениях рН 6,0 и рН 4,0 и температуре 22°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом равновесной адсорбции изучено связывание НА с липосомами из ФХ. Полученные изотермы представлены при двух значениях рН: 4,0 и 6,0 (рис. 1).

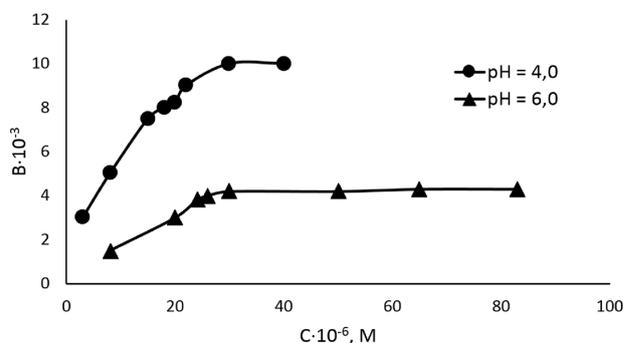


Рисунок 1. Изотермы связывания НА с липосомами. Ось абсцисс: Концентрация белка,  $10^{-6}$  моль/л. Ось ординат: мольное отношение белок : фосфолипид.

При рН среды 4,0 и 6,0 изотермы имеют монотонный асимптотический характер и хорошо спрямляются в координатах уравнения Скэтчарда (2):

$$B/C = K_{cb} n - K_{cb} B \quad (2)$$

где  $B$  — мольное отношение белок : фосфолипид,  $C$  — концентрация белка,  $K_{cb}$  — константа связывания,  $n$  — число мест связывания (мольное отношение белок : фосфолипид при максимальном заполнении бислоя адсорбированным белком). Построение изотерм адсорбции при рН среды 4,0 и 6,0 в координатах Скэтчарда позволило определить  $K_{cb}$  и  $n$  (рис. 2, 3).

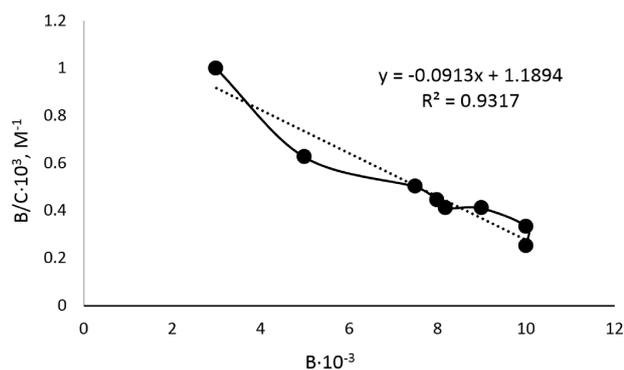
Соответствующие значения изменения свободной энергии ( $\Delta G$ ) при образовании белок-липидного комплекса определяли из формулы (3):

$$\Delta G = -RT \ln K_{cb} \quad (3)$$

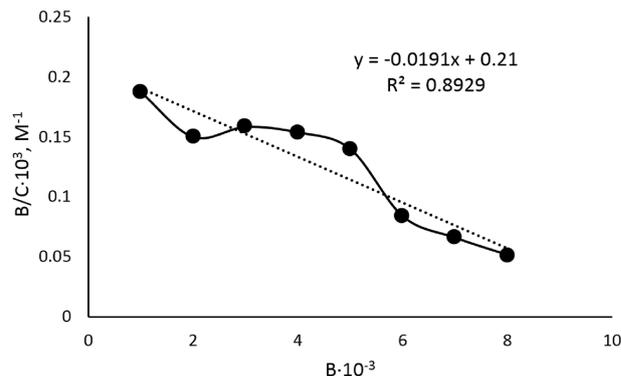
изменения энтальпии ( $\Delta H$ ) и энтропии ( $\Delta S$ ) определяли из уравнения Гиббса-Гельмгольца (4):

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (4)$$

Ниже приведены значения  $K_{cb}$ ,  $n$  и термодинамических параметров связывания НА с фосфолипидными везикулами (табл. 1).



**Рисунок 2.** Изотермы адсорбции в координатах Скэтчарда (pH=4,0). Ось абсцисс: мольное отношение белок : фосфолипид. Ось ординат: Отношение мольного отношения белок : фосфолипид к концентрации белка, л/моль.



**Рисунок 3.** Изотермы адсорбции в координатах Скэтчарда (pH=6,0). Ось абсцисс: мольное отношение белок : фосфолипид. Ось ординат: Отношение мольного отношения белок : фосфолипид к концентрации белка, л/моль.

**Таблица 1.** Термодинамические параметры связывания НА с ФХ-липосомами, константы распределения в двухфазных системах при значениях pH 4,0 и pH 6,0

pH	$K_{св}$ , $M^{-1}$	$n$	$\Delta G$ , кДж/моль	$\Delta H$ , кДж/моль	$\Delta S$ , э.е.	$K_1$	$K_2$	$K_2/K_1$
4	$9 \times 10^4$	0,013	-27,9	-32	-4,1	0,77	1,21	1,57
6	$2 \times 10^4$	0,010	-24,3	-41	16,7	0,76	0,73	0,96

Примечание: представлены средние значения; э.е. — энтропийные единицы.

Предположение о наличии гидрофобных взаимодействий НА с бислоем подтверждается данными по распределению белка в двухфазных системах, одна из которых состоит из декстрана и полиэтиленгликоля (константа распределения НА —  $K_1$ ), а другая — из декстрана и полиэтиленгликоля, этерифицированного пальмитиновой кислотой (константа распределения НА —  $K_2$ ). Как видно из таблицы 1, значение соотношения констант  $K_2/K_1$  при pH 6,0 близко к единице, что указывает на равномерность распределения НА в обеих системах. При pH 4,0 величина отношения  $K_2/K_1$  возрастает в 1,63 раза, что свидетельствует об увеличении сродства НА к гидрофобной фазе полиэтиленгликоля, этерифицированного пальмитиновой кислотой.

Образование белок-липидного комплекса является сложным и многостадийным процессом, включающим этапы адсорбции белка на поверхности бислоя, конформационные изменения фосфолипидных и белковых молекул, структурные преобразования фосфолипидного бислоя. Каждый из этих этапов вносит свой вклад в изменение свободной энергии суммарного процесса, наблюдаемого в наших экспериментах. Низкие отрицательные значения изменения энтропии при pH среды 4,0 указывают на наличие гидрофобных взаимодействий при связывании НА с липосомами, что, в свою очередь, может приводить к проникновению вирусного белка внутрь липосомы. Большие же положительные изменения энтропии при pH среды 6,0 могут быть связаны со значительными перестройками фосфолипидной мембраны, которые могут обуславливать изменение проницаемости и параметров фазового перехода фосфолипидного бислоя, но не его прохождение белком после адсорбции.

Из данных таблицы 1 видно, что в почти нейтральном растворе НА распределяется в обеих двухфазных системах одинаковым образом. Следует отметить, что этерификация полиэтиленгликоля пальмитиновой кислотой приводит к увеличению гидрофобности данной двухфазной системы. При подкислении среды сродство к гидрофобной фазе полиэтиленгликоля, этерифицированного пальмитиновой кислотой, заметно увеличивается, поскольку значение отношения констант распределения НА в двухфазной системе  $K_2/K_1$  в 1,63 раза больше в кислой среде по сравнению со значением данного отношения в нейтральной среде. Обнаруженный факт можно рассматривать как свидетельство в пользу гидрофобного характера взаимодействия молекулы НА с бислоем ФХ везикул при кислых значениях pH.

Образование белок-липидного комплекса при pH 6,0 и pH 4,0 было подтверждено также с помощью метода тушения белковой флуоресценции с использованием нейтрального тушителя акриламида. Нейтральная молекула акриламида способна диффундировать во внутреннюю белковую матрицу и принимать участие в тушении флуоресценции тех аминокислотных остатков, которые располагаются глубоко в гидрофобной области бислоя липосом. На рисунке 4 представлены кривые тушения флуоресценции НА в координатах Штерна-Фольмера. Используя уравнение Штерна-Фольмера (5), были получены значения равновесных констант тушения флуоресценции  $K_{SV}$  для НА и системы НА+липосомы из ФХ при pH 6,0 и 4,0:

## ТЕРМОДИНАМИКА СВЯЗЫВАНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА

Таблица 2. Константы тушения флуоресценции Штерна-Фольмера  $K_{SV}$  и константы скоростей тушения флуоресценции  $K_q$  для НА и системы НА+ФХ-липосомы при pH 4,0 и pH 6,0

Система при pH 4,0 / pH 6,0	$K_{SV}$ , $M^{-1}$	$K_q$ , $M^{-1}c^{-1}$	$R^2$
НА	$1,43 \times 10^5 / 1,18 \times 10^5$	$1,43 \times 10^{13} / 1,18 \times 10^{13}$	0,96/0,97
НА+ФХ-липосомы	$2,89 \times 10^5 / 1,51 \times 10^5$	$2,89 \times 10^{13} / 1,51 \times 10^{13}$	0,99/0,95

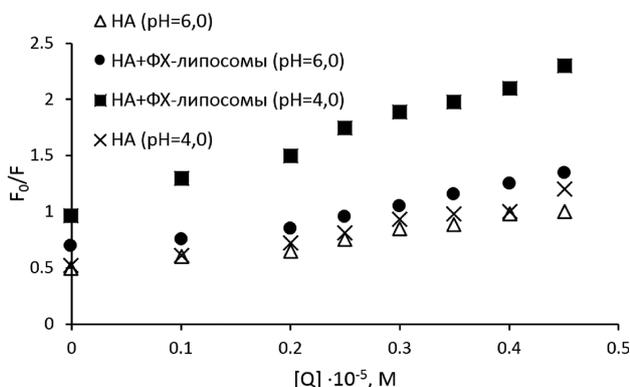


Рисунок 4. Кривые тушения белковой флуоресценции в координатах Штерна-Фольмера для НА и системы НА+ФХ-липосомы при pH 6,0 и pH 4,0.

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (5)$$

где  $F_0/F$  — отношение интенсивностей флуоресценции в отсутствии и присутствии тушителя,  $K_q$  — константа скорости тушения белковой флуоресценции,  $\tau_0$  — среднее время жизни белковой макромолекулы в отсутствии тушителя (значение  $\tau_0$  для биополимеров принимается равным  $10^{-8}$  [12, 13]),  $K_{SV}$  — равновесная константа тушения флуоресценции Штерна-Фольмера,  $[Q]$  — концентрация акриламида.

Значения констант скоростей тушения флуоресценции  $K_q$  были рассчитаны по формуле (6):

$$K_q = K_{SV} / \tau_0 \quad (6)$$

Рассчитанные по формулам (5, 6) значения констант  $K_{SV}$  и  $K_q$  для двух значений pH приведены в таблице 2. Из полученных данных видно, что при pH 4,0 для системы НА+липосомы из ФХ происходит увеличение константы Штерна-Фольмера и константы скорости тушения белковой флуоресценции акриламидом. Это связано с происходящими в НА структурными изменениями при встраивании в гидрофобную область липидного бислоя липосом. Отдельного рассмотрения заслуживают значения констант скоростей тушения флуоресценции  $K_q$ . В наших исследованиях значения  $K_q$  имеют порядок  $10^{13} M^{-1}c^{-1}$ , что указывает на статический механизм тушения флуоресценции, заключающийся в образовании нефлуоресцирующего комплекса с флуорофорами неподвижной молекулы белка [14]. Полученные результаты подтверждают сделанные выше выводы о встраивании НА в мембраны липосом за счёт гидрофобных взаимодействий.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Важным результатом проведённых исследований является выявление гидрофобных белок-липидных взаимодействий, играющих, наряду с белок-рецепторными взаимодействиями, главную роль в процессе связывания и проникновения вируса гриппа в клетку. Полученные результаты позволяют прогнозировать возможность связывания различных вирусных белков с наночастицами фосфолипидной природы, например, при конструировании виросом, а также с монослоями клеток в процессе инфицирования его вирусом.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова за полезное обсуждение результатов работы.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана программой “Russian Academic Excellence Project 5-1”.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА

- Schoen P., Lesrman L., Wilschut J. (1996) FEBS Letts., **390**, 315-318.
- Moser C., Metcalfe I.C., Viret J.F. (2014) Expert Rev. Vaccines, **2**, 189-196.
- Codefroy C., Dahmane S., Dosset P. (2014) Langmuir, **30**, 11394-11400.
- White J.M., Whittaker G.R. (2016) Traffic, **17**, 593-614.
- Domanska M.K., Dunning R.A., Dryden K.A. (2015) Biophys. J., **109**, 1917-1924.
- Daidoji T., Kajikawa J., Arai Y., Watanabe Y., Hirose R., Nakaya T. (2020) Viruses, **12**, 82-106.
- Wessels U., Abdelwhab E.M., Veits J., Hoffmann D., Mamerow S., Stech O. (2018) J. Virol., **92**, 778-796.

8. Haldar S., Mekhedov E., McCormick C.D., Blank P.S., Zimmerberg J. (2019) J. Cell. Sci., **132**, 321-331.
9. Klein R.A. (1970) Biochem. Biophys. Acta, **210**, 486-489.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
11. Shanbhag V.P., Axelsson C.G. (1975) Europ. J. Biochem., **60**, 17-22.
12. Hu Y.J., Liu Y., Dong J.X., Qu S.S. (2005) J. Pharm. Biomed. Anal., **39**, 740-745.
13. Cha D.M., Li S.T., Yang Y.F., Tu C.J., Liang H. (1999) Spectrosc. Spect. Anal., **19**, 788-791.
14. Wang Ch., Wu Q-H., Li C-R., Wang Z., Ma J-J., Zang X-H., Qin N-X. (2007) J. Anal. Sci., **23**, 429-433.

Поступила в редакцию: 07. 04. 2020.  
После доработки: 25. 07. 2020.  
Принята к печати: 28. 07. 2020.

**DETERMINATION OF THERMODYNAMIC BINDING PARAMETERS AND  
TYPE OF INTERACTION BETWEEN THE A/BANGKOK/1/1979 (H3N2) INFLUENZA VIRUS  
HEMAGGLUTININ AND PHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOME**

*N.A. Kontarov<sup>1,2\*</sup>, E.I. Dolgova<sup>2</sup>, I.V. Pogarskaja<sup>2</sup>, E.O. Kontarova<sup>3</sup>, Ju.B. Grishunina<sup>4</sup>, N.V. Yuminova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),  
119991, Moscow, Russia; \*e-mail: kontarov@mail.ru

<sup>2</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 115088 Russia

<sup>3</sup>Federal Scientific and Clinical Center, Clinical Hospital no. 83, Moscow, 115682 Russia

<sup>4</sup>HSE Tikhonov Moscow Institute of Electronics and Mathematics (MIEM HSE), Moscow, 123458 Russia

The study of interaction between surface viral proteins and model phospholipids is important for learning more details about the mechanisms of viral penetration into cells during infection. In this context, liposomes represent suitable systems for modeling a cell membrane. The binding of hemagglutinin (HA) of influenza virus with phosphatidylcholine liposomes was studied by equilibrium adsorption. It was interesting elucidate changes occurring in the structure of a protein during its translocation from the surface into the interior part of the membrane. In this work, we have studied characteristics of the protein-lipid interaction during HA complex formation with phospholipids including adsorption of HA on a phospholipid bilayer. Using the Scatchard equation and the Gibbs-Helmholtz equation at pH 4.0 and pH 6.0 thermodynamic parameters were determined. The results concluded the hydrophobic type of interaction between viral protein and liposomes. The additional confirmation of hydrophobic protein-lipid interaction presence was determination of HA distribution constants in two-phase systems: dextran-polyethylene glycol (K<sub>1</sub>) and dextran-polyethylene glycol esterified with palmitic acid (K<sub>2</sub>). The presence of hydrophobic interaction between HA and the liposome membrane was also confirmed using the quenching method of intrinsic protein fluorescence by a neutral quencher with acrylamide. At pH 4.0, an increase in the Stern-Volmer quenching constant was observed for the HA+liposome from phosphatidylcholine system, which is caused by structural changes in HA upon incorporation into the liposome bilayer. The fluorescence quenching rate constants calculated using the Stern-Volmer equation indicate a static quenching mechanism in which the quencher interacts with fluorophores of a stationary protein molecule. The obtained results are interesting for not only studying virus and cell fusion theoretically, but also have practical applications. Using values of the protein-bilayer binding constant and free energy constant, it is possible to select the optimal phospholipid composition of liposomes or virosomes to obtain a stronger complex with various viral proteins. With two-phase systems, it is possible to determine the presence of hydrophobic sites on the viral protein surface, which can be used for evaluation both protein-lipid and protein-protein interaction.

**Key words:** flu hemagglutinin; liposomes; Scatchard coordinates; hydrophobic interaction; fluorescence quenching

**Funding.** This work supported by the Program “Russian Academic Excellence Project 5-1”.

Received 07.04.2020; revised 25.07.2020; accepted: 28.07.2020.