

Związek struktura-funkcja peptydu fuzyjnego wirusa grypy

Structure-function relationship of the influenza fusion peptide

Anna Szymaniec^{1,2}
Remigiusz Worch²

¹Zakład Biofizyki, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski

²Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk

Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała w 2012 roku zespołowi pracującemu pod kierunkiem pana dr. n. med. Remigiusza Worchy grant na realizację projektu badawczego pt. „Mechanizm oddziaływania peptydu fuzyjnego wirusa grypy z błonami lipidowymi”. Część eksperymentów została przeprowadzona w Laboratoriach NanoFun współfinansowanych przez projekt EFRR POIG.02.02.00-00-025/09.

Streszczenie

Wirus grypy ma otoczkę lipidową i wchodzi do komórki gospodarza poprzez mechanizm endocytozy. W proces uwolnienia materiału genetycznego zaangażowane jest grypowe białko błonowe – hemaglutynina (HA). Fuzja pomiędzy błonami wirusa i komórki gospodarza odbywa się dzięki obecności N-końcowego fragmentu podjednostki HA2 hemaglutyniny, który bezpośrednio oddziałuje z błoną i jest nazywany peptydem fuzyjnym (fusion peptide, HAfp), ponieważ jest zdolny do samodzielnego łączenia błon w formie syntetycznego fragmentu. Jego C-końcowa część zawiera trzy aminokwasy (W21-Y22-G23), które są ściśle zachowane wśród serotypów grypy typu A. Pokazano, że długość peptydu ma wpływ na jego strukturę: HAfp1-20 tworzy „bumerang” w przeciwieństwie do „spinki do włosów” tworzonej przez HAfp1-23. W celu lepszego zrozumienia roli trzech zachowanych aminokwasów badaliśmy wpływ długości peptydu na zdolności fuzyjne, dynamikę strukturalną oraz oddziaływanie z dwuwarstwą lipidową. Dzięki symulacjom dynamiki molekularnej i pomiarom spektroskopowym pokazaliśmy, że obecność trzech C-końcowych aminokwasów promuje formowanie się „spinki do włosów”. W przeciwieństwie do mniej ustrukturyzowanego HAfp1-20 „spinka” jest zorientowana prostopadle do płaszczyzny błony i powoduje powstawanie większego nieporządku w otaczających ją lipidach. Stosując nowy sposób wizualizacji fuzji oparty na mikroskopii czasów życia (FLIM) i obrazowaniu liposomów GUV (gian unilamellar vesicles), zaobserwowaliśmy, że HAfp1-23 pośredniczy fuzji efektywniej niż HAfp1-20. Ponadto zaobserwowane przez nas formowanie się nowej fazy lipidowej w błonach bogatych w cholesterol indukowane jest jedynie przez dłuższy peptyd. Redystrybucja składników płynnych błon wydaje się odgrywać istotną rolę w procesie fuzji błonowej.

Słowa kluczowe: wirus grypy • sztuczne systemy błonowe • fuzja błonowa • mikroskopia konfokalna • oddziaływanie peptyd-błona

Wpłynęło: 03-01-2017
Zaakceptowano: 20-04-2017
Opublikowano: 09-06-2017

Adres do korespondencji:

dr Remigiusz Worch
Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk
al. Lotników 32/46, 02-668 Warszawa
tel.: +48 22 843 70 01
e-mail: remiwo@ifpan.edu.pl

Abstract

Influenza is an enveloped virus which enters the host cell through endocytosis-mediated mechanism. To enable the release genetic material,

a process of fusion between viral and host cell membranes occurs, which is mediated by influenza hemagglutinin (HA) protein. The N-terminal fragment of hemagglutinin HA2 subunit, directly interacting with the membrane, is named a fusion peptide (HAfp), since it is able to promote fusion also as a synthetic fragment. Its C-terminal part contains three residues (W21-Y22-G23), which are highly conserved among various serotypes of Influenza A. It has been shown that the peptide length has an influence on its structure: HAfp1-20 forms a boomerang in contrast to a tight helical hairpin formed by HAfp1-23. To gain more insight into the role of the conserved residues, we studied the effect of peptide length on fusion properties, its structural dynamics, and partitioning to the phospholipid bilayer. By means of molecular dynamics simulations and spectroscopic measurements, we showed that the presence of three C-terminal residues in HAfp1-23 promotes the formation of hairpin structure. In contrast to less structured HAfp1-20, it orients perpendicularly to the membrane plane and induces more disorder in the surrounding lipids. Using a novel fusion visualization assay based on FLIM microscopy on giant unilamellar vesicles (GUV), we observed that HAfp1-23 promotes fusion to a higher extent than HAfp1-20. Moreover, we report cholesterol-enriched domain formation exclusively by the longer fusion peptide. This redistribution of membrane components in fluid phases is likely to play a role during membrane fusion.

Keywords: influenza virus • artificial membrane systems • membrane fusion • confocal microscopy • peptide-lipid interactions

WPROWADZENIE

Wejście wirusa do komórki gospodarza

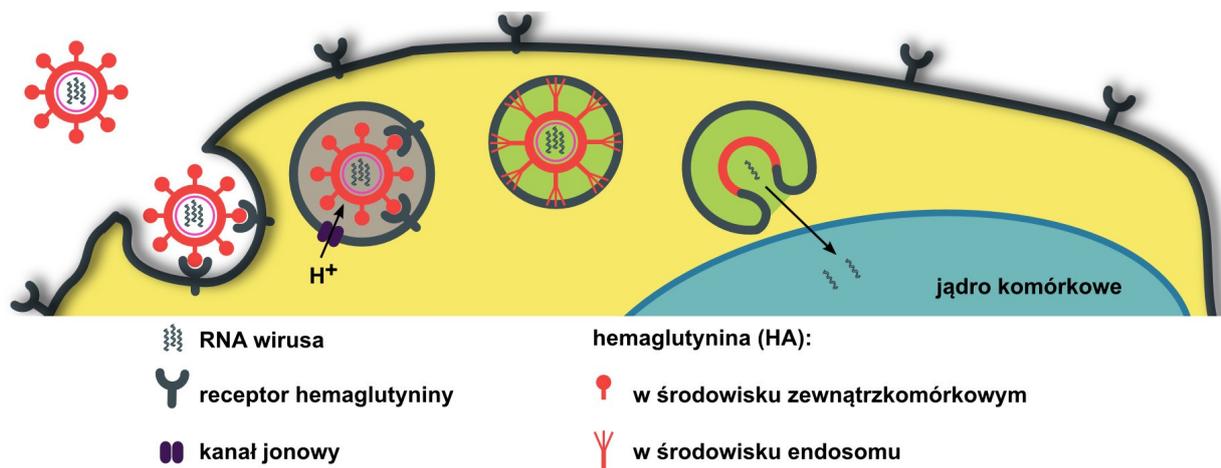
Podczas cyklu replikacyjnego wirusy muszą umieścić swój materiał genetyczny w komórce gospodarza. Dla wirusów mających otoczkę lipidową, do których zalicza się wirus grypy należący do rodziny ortomyksowirusów (*Orthomyxoviridae*), wiąże się to z koniecznością połączenia (fuzji) błon otoczki z błoną komórkową (ryc. 1). Etap ten realizowany jest za pośrednictwem tzw. wirusowych białek fuzyjnych (ang. viral fusion proteins, VFP), będących oligomerycznymi glikoproteinami z jednej strony zakotwiczonymi w błonie otoczki wirusa (ryc. 1). Pod wpływem zmian środowiskowych, takich jak np. zmiana pH w środowisku endosomu, białka te zmieniają konformację, eksponując drugą część białka bezpośrednio kotwiczącą się w błonie komórki (ryc. 1).

W przypadku wirusa grypy rolę VFP odgrywa hemaglutynina (HA) syntetyzowana jako prekursor HA0, której cięcie proteolityczne prowadzi do powstania łańcuchów HA1 i HA2. N-końcowa część białka HA2, która bezpośrednio oddziałuje z błoną, nosi nazwę peptydu fuzyjnego (fusion peptide, fp). Więk-

szość N-końcowych aminokwasów jest dobrze zachowana wśród wyróżnianych 16 typów serologicznych wirusa grypy typu A (tab. 1).

Warto zauważyć, że o ile sekwencje wirusa typu A i B są do siebie podobne, o tyle sekwencja peptydu fuzyjnego wirusa typu C, najczęściej wywołującego lekkie infekcje u ludzi, znacznie się od nich różni. W przypadku wirusa typu A uwagę zwraca także obecność trzech C-końcowych aminokwasów W21-Y22-G23 we wszystkich serotypach. Za rozprzestrzenianie się epidemii ptasiej grypy w latach 2003-2005 odpowiedzialny był typ H5N1¹, a świńskiej grypy w 2009 roku – wiele typów z grupy A, przy czym głównie H1N1. Nie wiadomo natomiast dokładnie, jakie czynniki strukturalne wirusa grypy powodują jego zdolność do transmisji międzygatunkowej. Badania nad tymi zagadnieniami oraz nad tworzeniem wirusów hybrydowych są gorącym tematem badań oraz debat naukowców, etyków i agencji rządowych.

1. Wirus grypy typu A klasyfikowany jest również na podstawie innego białka wirusowego – neuraminidazy (NA lub N), z wyróżnieniem 9 typów (N1-N9). Typ B ma jeden typ N, natomiast typ C nie posiada neuraminidazy wcale.



Ryc. 1. Schemat zakażenia wirusem grypy. Na powierzchni komórki trimeryczna hemaglutynina (HA) wirusa łączy się z kwasem sialowym, który odgrywa rolę receptora. Wirus jest wchłaniany do wnętrza dzięki endocytozie. W kwaśnym środowisku endosomu dochodzi do zmiany konformacyjnej HA i do eksponowania peptydu fuzyjnego, który kotwiczy się w błonie endosomu. W rezultacie następuje fuzja lipidowej otoczki wirusowej i błony endosomu, co umożliwia przedostanie się RNA wirusa do jądra komórkowego. Rysunek przygotowany na podstawie [1, 2].

Struktura peptydu fuzyjnego

Badania nad peptydami fuzyjnymi wirusa grypy (HAfp) zostały rozpoczęte w latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia. Wykazano m.in. zdolność do wiązania się do liposomów utworzonych z POPC niezależnie od pH, przy czym liposomy zawierające cholesterol mogły być łączone jedynie poniżej pH 6, co odpowiada środowisku endosomu [4]. Różną zdolność do łączenia liposomów zaobserwowano w funkcji długości (1-16 oraz 1-20) peptydu fuzyjnego [5]. Zależność zmian wielkości obserwowanych w spektroskopii emisyjnej od warunków środowiskowych została zbadana przez Clague i in. [6]. Prace z użyciem spektroskopii NMR wskazały na głębsze zakotwiczenie się peptydu i większą zawartość struktur helikalnych przy niższym pH [7]. Zwrócono także uwagę na zmiany konformacyjne peptydu w pH 5 i 7,4 [8].

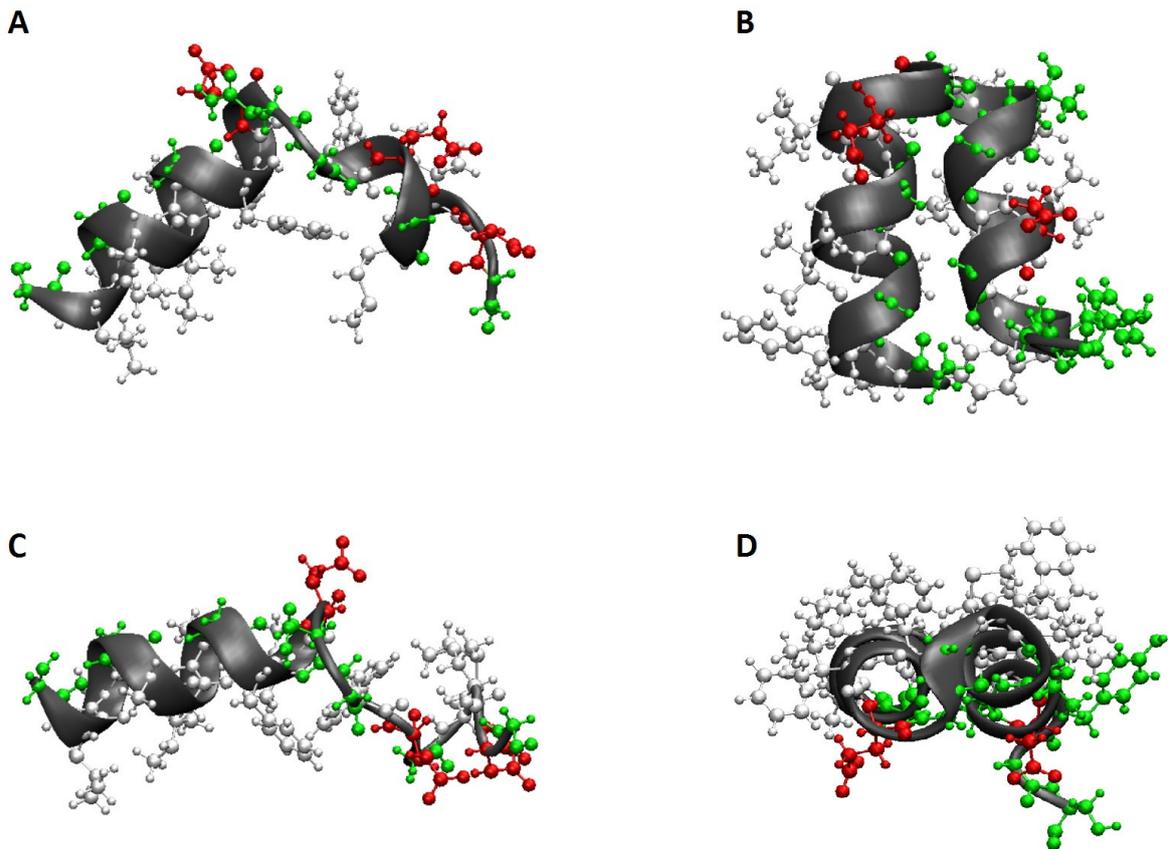
Jednakże nowe światło na, jak by się mogło wydawać, dobrze zbadany obiekt rzucają prace z ostatnich lat [9-13], w których autorzy pokazują, że peptyd fuzyjny zawierający wszystkie 23 aminokwasy w micelach z dodecylofosfatydylocholiną przyjmuje konformację typu „spinka”, utworzoną przez fragmenty Gly¹-Gly¹² oraz Trp¹⁴-Gly²³ z Gly¹³ stanowiącą bardzo krótkie zgięcie (ryc. 2).

Całość stabilizowana jest licznymi wiązaniami wodorowymi, co z pewnością ułatwia insercję peptydu do błony ze względu na niekorzystną energię insercji swobodnych grup amidowych [14]. Jak podkreślają autorzy, przez ostatnie kilkanaście lat peptydy fuzyjne wirusa grypy były najczę-

ściej badane w formie Gly¹-Gly²⁰ bez uwzględnienia ściśle zachowanych 3 ostatnich aminokwasów (Trp²¹-Tyr²²-Gly²³) (tab. 1). W wielu badaniach taki 20-aminokwasowy fragment był bezpośrednio łączony z silnie hydrofilowym fragmentem zapewniającym lepszą rozpuszczalność w środowisku wodnym. Okazuje się jednak, że konformacje peptydu oraz sposób jego funkcjonowania mogą ściśle zależeć od jego długości i formy peptydu. Uwagę również zwraca częste występowanie motywu GxxG oraz GxxxG w całej długości peptydu, przy czym ten ostatni znany jest jako czynnik często występujący w helisach transbłonowych [15]. Otwiera to na nowo problem szczegółowej charakterystyki oddziaływań peptydu fuzyjnego w różnych środowiskach. Czytelnik bardziej zainteresowany szczegółami strukturalnymi jest odsyłany do pracy przeglądowej [16].

Fuzja błonowa jako cel terapeutyczny

Proponowane badania dotyczą jednego z kluczowych etapów infekcji wirusa grypy, której leczenie mimo ogromnego postępu w rozwoju środków i szczepionek przeciwwirusowych jest nadal niesatysfakcjonujące. W samej Polsce w sezonach 2013/2014 oraz 2014/2015 liczba zachorowań i podejrzeń zachorowań na grypę przekraczała 3 mln (wg danych Państwowego Zakładu Higieny). Natomiast z powodów infekcji szczepem H5N1 na całym świecie (tzw. ptasia grypa) zmarło 355 osób z potwierdzonych 602 przypadków [17]. Podkreśla to ważność problemu i potrzebę stwarzania nowych środków farmakologicznych używanych zarówno w zapobieganiu zachorowaniom sezonowym,



Ryc. 2. (A) HAfp1-20, pH=5, konformacja „bumerangu” z fragmentem helisy 3-10 na C-końcu, utworzonej w pH fuzyjnym; (PDB ID: 1IBN) (B) HAfp1-23 pH=7,4, konformacja „spinki do włosów”, widok z boku; (PDB ID: 2KXA) (C) HAfp1-20, pH=7,4, konformacja „spinki do włosów”, widok z boku; (PDB ID: 2KXA) (D) HAfp1-23, pH=7,4, widok z boku. Kolorem czerwonym zaznaczono aminokwasy o charakterze kwasowym, zielonym – aminokwasy polarne, a białym – aminokwasy hydrofobowe.

jak i przeciw szczepom mogącym wywołać epidemię lub pandemię.

Obecnie stosowane leki przeciw wirusom grypy można podzielić na dwie grupy. Pierwsza zapobiega zakwaszeniu środowiska endosomu koniecznego do zmian konformacyjnych hemaglutyniny (ryc. 1) poprzez stosowanie pierścieniowych amin pierwszorzędowych [substancja czynna: amantadyna, preparaty zarejestrowane w Polsce: Amantix (Merz), Vigeryt K (Egis); pochodna amantadyny, rymanydyna, preparat: Rimantin (Genexo)]. Preparaty te jednak wykazują się skutecznym działaniem jedynie w pierwszych stadiach infekcji. Druga strategia polega na hamowaniu aktywności neuraminidazy, której poprawne działanie jest niezbędne do składania nowo powstałych cząsteczek wirusa w komórce gospodarza [substancja czynna: oseltamiwir, preparat: Tamiflu (Roche), oraz zanamiwir, preparat Relenza (GlaxoSmithKline Export Ltd., Wielka Brytania)]. W przypadku szczepionek (w Polsce jest zarejestrowanych łącznie osiem preparatów różnych firm) zawierających antygeny powierzchniowe i ele-

menty struktur wewnętrznych, głównie szczepów H1N1 oraz H3N2, istnieje problem ważności tylko w jednym sezonie grypowym ze względu na szybką zmienność genetyczną w obrębie całych białek wirusowych. Strategia uderzająca w mechanizm fuzji wirusa z błoną komórkową gospodarza wydaje się interesująca ze względu na bardzo niską zmienność sekwencji peptydu fuzyjnego hemaglutyniny (tab. 1). Zrozumienie molekularnych podstaw oddziaływań peptydu fuzyjnego wirusa grypy jest kluczowe w zrozumieniu początkowych etapów inwazji wirusowej oraz w projektowaniu potencjalnych strategii farmakologicznych.

Błony lipidowe i sztuczne systemy błonowe

W toku badań nad białkami błonowymi często konieczne jest zastosowanie sztucznych systemów błonowych. Błona żywej komórki oprócz lipidów zawiera liczne białka i inne elementy, co ze względu na jej stopień skomplikowania uniemożliwiłoby przygotowanie układu eksperymentalnego i wykonanie pomiarów. Przykładowym systemem błono-

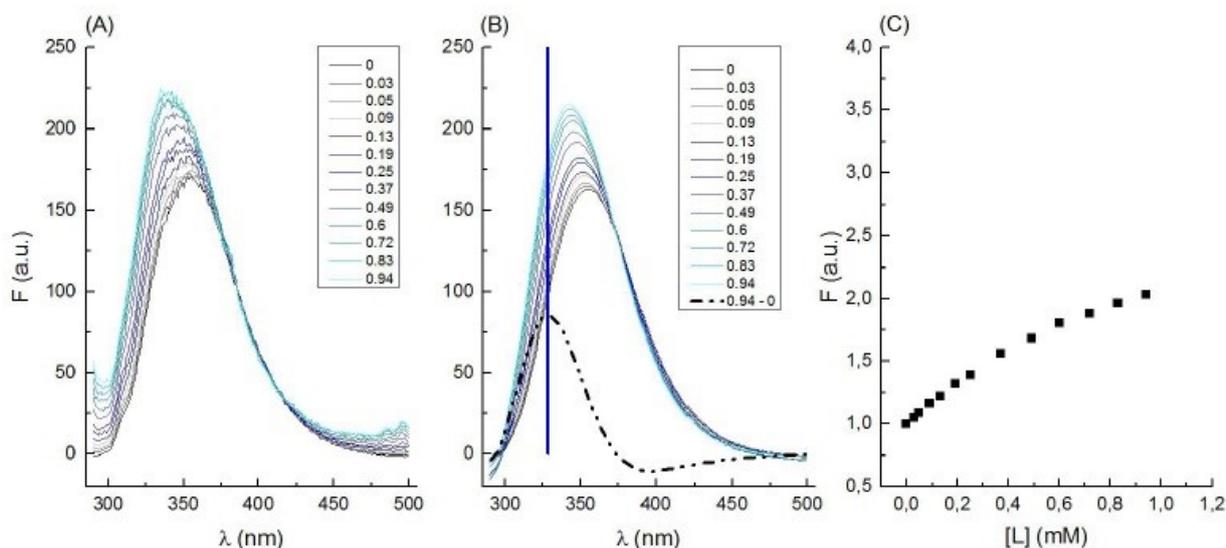
wym są jednowarstwowe pęcherzyki powszechnie używane w badaniach z powodu ich naturalnego kształtu, często występującego w systemach biologicznych w przeciwieństwie do planarnych systemów błonowych. Liposomy stosowane są również w badaniach klinicznych, gdzie wstrzykiwane pacjentom obniżają toksyczność leków, umożliwiając ich dostarczenie bezpośrednio do chorej tkanki, na przykład do guzów nowotworowych. Możliwe jest otrzymywanie liposomów różnej wielkości: od małych liposomów (small unilamellar vesicles – SUVs), poprzez duże pęcherzyki (large unilamellar vesicles – LUVs) o średnicy 50-200 nm, aż po ogromne jednowarstwowe pęcherzyki (giant unilamellar vesicles – GUVs). SUV-y składają się jedynie z kilkuset lipidów i mają średnicę nie większą niż 100 nm. Większe od nich są duże jednowarstwowe pęcherzyki LUV, które mogą przypominać wewnątrzkomórkowe pęcherzyki, takie jak lizosomy. Z powodu kształtu ich membrana jest stabilniejsza i bardziej upakowana w porównaniu z mniejszymi pęcherzykami SUV. To sprawia, że LUV-y są dobrym modelem do badań, na przykład zakłóceń wywoływanych przez lipidy lub białka. Największe pęcherzyki, GUV-y o średnicy wynoszącej około kilkudziesięciu mikrometrów, są łatwe w przygotowaniu, skład ich membrany może być ściśle kontrolowany oraz pozwalają na ich obserwację w mikroskopie optycznym [18, 19].

Jednowarstwowe liposomy GUV można otrzymać metodą elektroformacji. Polega ona na podłącze-

niu prądu zmiennego do dwóch platynowych drutów, na których powierzchni znajduje się film lipidowy. Film ten uzyskuje się poprzez nałożenie na każdy drut roztworu lipidów oraz barwnika fluorescencyjnego, którym pokrywa się druty aż do całkowitego odparowania roztworu. Aby mieć pewność, że rozpuszczalnik, czyli chloroform, całkowicie odparował, druty umieszcza się w cieplarni. Druty pokryte filmem lipidowym zanurza się w roztworze sacharozy znajdującym się w komorze teflonowej. Następnie komorę podłącza się do generatora prądu [19] (stosowano prąd o napięciu 3 V i częstotliwości 10 Hz przez 2 godziny, następnie co 30 min zmniejszano częstotliwość do 2 Hz). Tak przygotowane liposomy transferuje się do komory umożliwiającej obrazowanie, wypełnionej roztworem buforowym o takiej samej osmotyczności jak roztwór sacharozy (tu 0,3 M).

METODY BADAWCZE

Głównymi metodami badawczymi projektu były spektroskopia fluorescencyjna oraz różne techniki mikroskopii fluorescencyjnej. Spektroskopia fluorescencyjna jest potężnym narzędziem w badaniach oddziaływań białko-lipid ze względu na różnice emisji tryptofanu w środowisku wodnym i niepolarnym (takim jak błona) (ryc. 3). Widma peptydu w przypadku dodawania porcji liposomów, po stosownej analizie polegającej na odjęciu tła i wygładzeniu oraz zastosowaniu poprawek na rozcieńczenie,



Ryc. 3. (A) zarejestrowane widma fluorescencji peptydu HAfp1-23 przy dodawaniu liposomów SUV utworzonych z DOPC (liczby oznaczają stężenie w μM); (B) widma po odjęciu tła i wygładzeniu, widmo różnicowe (czarna linia przerywana) oraz prosta (kolor niebieski), odpowiadająca maksymalnej różnicy między pierwszym i ostatnim widmem (w tym przypadku dla 328 nm). (C) punkty pobrane z widm odpowiadających danym stężeniom, z uwzględnieniem poprawki na objętość, znormalizowane do 1. Do tak przetworzonych danych dopasowuje się krzywą umożliwiającą wyznaczenie energii oddziaływania peptydu z błoną [20].

są przekształcane do postaci danych, do których dopasowanie krzywej pozwala na uzyskanie stałej inkorporacji [20, 21].

Wielkość ta jest miarą energii swobodnej tworzonego kompleksu, dlatego może być bezpośrednio porównywana dla różnych mutacji peptydów, składu liposomów i warunków środowiskowych (pH, siła jonowa, temperatura). Inny sposób wykorzystania tej techniki, pozwalający na stwierdzenie naruszenia ciągłości dwuwarstwy lipidowej, polega na przygotowywaniu liposomów z zamkniętą porcją barwnika fluorescencyjnego. Jego stężenie jest dobrane tak, że będąc w środku liposomu, ulega samowygaszeniu, natomiast jego fluorescencja jest wykrywalna, jeżeli jest on uwalniany na zewnątrz, np. w wyniku powstających w błonie porów. Przekierowanie liposomów można badać również za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, która w wersji skaningowej i konfokalnej umożliwia wykonywanie obrazów znakowanych fluorescencyjnie struktur z rozdzielczością rzędu długości fali świetlnej. W wersji konfokalnej światło pochodzące z innych płaszczyzn niż płaszczyzna wzbudzenia jest blokowane przez aperturę kołową (ang. pinhole), co znacznie zmniejsza efekt rozmycia rejestrowanych obrazów. Na potrzeby projektu opracowano nowatorski sposób obrazowania i oceny ilościowej zachodzącej fuzji błonowej indukowanej peptydami fuzyjnymi między liposomami GUV i LUV, w których błonach są umieszczone barwniki fluorescencyjne. Między tymi barwnikami w trakcie fuzji dochodzi do rezonansowego przeniesienia energii (FRET) (ryc. 4). Efektywność zajścia zjawiska FRET była mierzona na podstawie wyznaczenia czasów życia donora z wykorzystaniem techniki mikroskopowej FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) w trybie TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting). Obok technik eksperymentalnych ważną częścią projektu były symulacje dynamiki molekularnej dające komplementarny obraz zachowania się peptydów fuzyjnych i otaczających ich lipidów na poziomie pojedynczych atomów.

ZACHOWANIE SIĘ PEPTYDÓW W DWUWARSTWIE LIPIDOWEJ

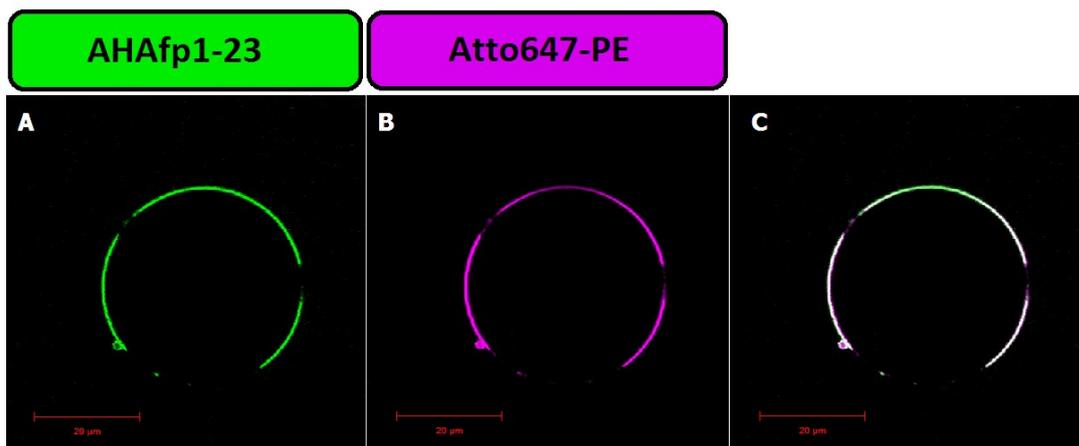
Różnice w strukturach peptydów o długościach 20 (HAfp1-20) i 23 aminokwasów (HAfp1-23) określone odpowiednio jako „bumerang” [8] oraz „spinka do włosów” [9] pozwalają na postawienie ważnego pytania dotyczącego sposobu oddziaływania N-końcowego fragmentu podjednostki HA2 hemaglutyniny. Pytanie to jest szczególnie zasad-

ne, gdy weźmiemy pod uwagę, że chętnie badane ze względu na stosunkową łatwość peptydy fuzyjne są jedynie molekułami modelowymi, na podstawie których wysnuwane są wnioski dotyczące zachodzących procesów w naturze, a więc z udziałem całych białek. Świadomi tych ograniczeń wyszliśmy z założenia, że rozszerzenie peptydu fuzyjnego o zachowane C-końcowe aminokwasy może pozwolić dostrzec nieopisywane dotychczas zjawiska. Dzięki poprowadzeniu prac w sposób równoległy: eksperymentalny i symulacyjny, doszliśmy do wniosku, że większa zdolność do fuzji błonowej jest związana z konformacją peptydu. Peptyd HAfp1-23, mający większą zdolność do fuzji błon, przyjmuje częściej konformację typu „spinka do włosów” i jest zakotwiczony głębiej w dwuwarstwie w porównaniu z peptydem HAfp1-20, częściej przyjmującym konformację otwartą („bumerang”) i lokującym się bliżej granicy błona-woda. Jednocześnie zauważono, że dla HAfp1-23 przeważa ustawienie prostopadłe (osie helikalnych ramion „spinki” są prostopadłe do płaszczyzny błony), co umożliwiłoby rozsądne „wyprowadzenie” łańcucha polipeptydowego z błony w przypadku białka o pełnej długości. Ten aspekt był podnoszony w literaturze w pracy [9]. Jednocześnie uzyskano ciekawy zestaw wyników dotyczący wpływu inkorporacji peptydów fuzyjnych do dwuwarstwy lipidowej. Zarówno pomiary czasów życia analogu lipidu C6-NBD-PE [22], jak i symulacje dynamiki molekularnej wskazują na występowanie większego nieporządku łańcuchów fosfolipidów, w przypadku kiedy wbudowywany jest peptyd HAfp1-23, w porównaniu z HAfp1-20.

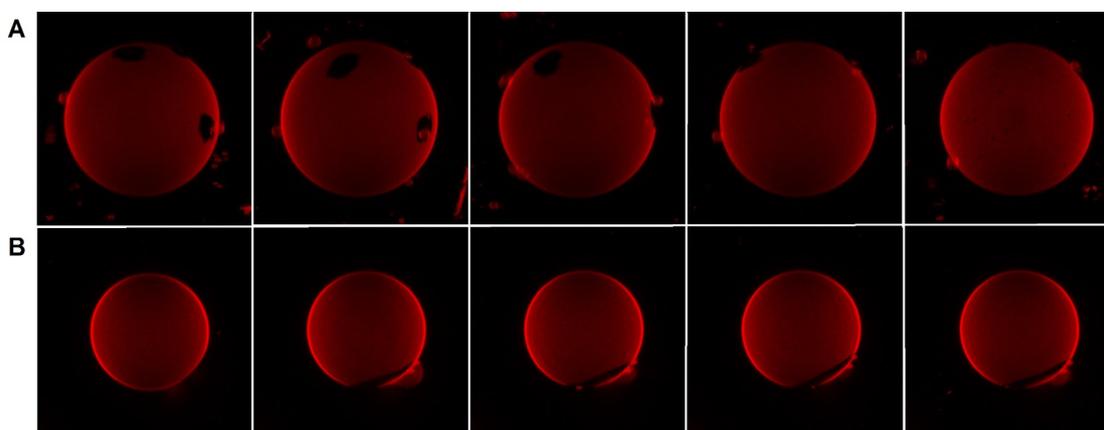
Dzięki eksperymentom z użyciem fluorescencyjnie znakowanego peptydu HAfp1-23 i obrazowaniu liposomów typu GUV utworzonych z mieszanki DOPC/sfingomielina cholesterol 2/2/1 (mol) udało się nam określić preferencję do oddziaływania peptydu z fazą lipid disordered (Ld) w porównaniu z fazą lipid ordered (Lo) (ryc. 4).

Wynik ten bardzo dobrze koresponduje z uzyskanymi wynikami dotyczącymi mniej korzystnej energii Gibbsa inkorporacji peptydów w błonach fosfolipidowych na podstawie danych spektroskopowych [23, 24]. Jednocześnie zaobserwowano ciekawe zjawisko indukcji makroskopowego ruchu domen indukowanego peptydem (ryc. 5).

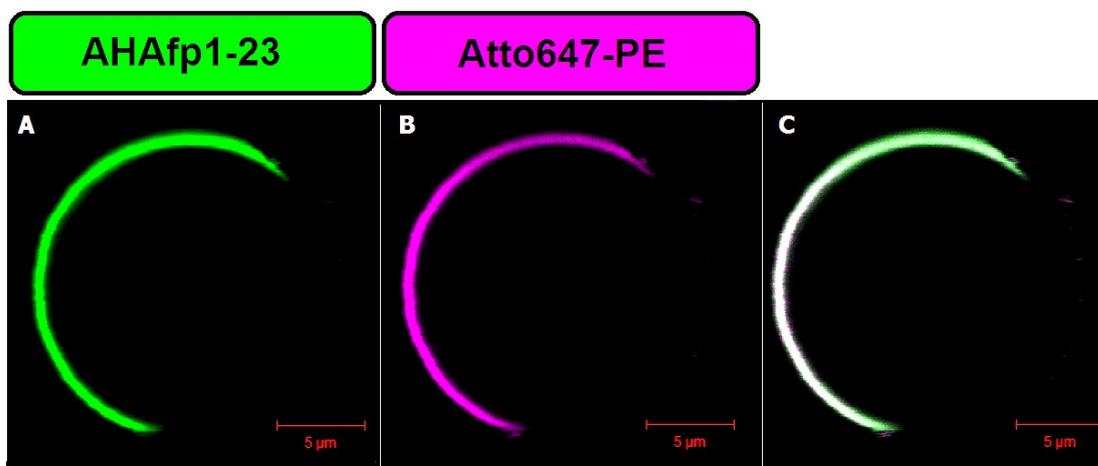
Co więcej, w przypadku peptydu HAfp1-23 zaobserwowano dotychczas nieopisywaną w literaturze dla peptydu fuzyjnego grypy zdolność do indukowania nowej fazy lipidowej w błonach zawierających cholesterol (ryc. 6).



Ryc. 4. Przykładowe liposomy GUV złożone z lipidów DOPC, cholesterolu i sfingomieliny Atto647-PE (magenta) z separacją faz Lo/Ld. Do liposomów dodano peptyd fuzyjny AHAfp1-23 z dołączonym barwnikiem Alexa fluor 488 (zielony), którego stężenie wynosiło 5 µM. (A) zielony – detekcja dla zakresu emisji z maksimum emisji 525 nm dla barwnika Alexa fluor 488, (B) magenta – detekcja dla zakresu emisji z maksimum 669 nm dla barwnika Atto647N, (C) nałożone obrazy A i B.



Ryc. 5. Projekcja 3D (z-stack) liposomów GUV złożonych z lipidów DOPC, cholesterolu i sfingomieliny w stosunku molowym (2:1:2) z barwnikiem DOPE-Atto647-PE z separacją faz Lo/Ld. Do liposomów dodano peptyd fuzyjny HAfp1-23 (3 µM). Na rysunku widoczna jest zmiana położenia faz lipidowych dla liposomów (A) z peptydem fuzyjnym HAfp1-23 oraz (B) bez peptydu fuzyjnego. Obraz liposomu wykonywano w odstępach 5 minut.



Ryc. 6. Liposom GUV złożony z lipidów POPC oraz cholesterolu w stosunku molowym 60:40 z barwnikiem DOPE-Atto647-PE (magenta). Do liposomu dodano mieszankę peptydów fuzyjnych AHAfp1-23 oraz HAfp1-23 (zielony) w stosunku molowym 1:1, których stężenie wynosiło 7 mM. (A) zielony – detekcja dla zakresu emisji z maksimum emisji 525 nm dla barwnika Alexa fluor 488, (B) magenta – detekcja dla zakresu emisji z maksimum 669 nm dla barwnika Atto647N, (C), (F) nałożone obrazy odpowiednio A i B.

W nowych pracach podobne zjawisko zaobserwowano dla pętli białkowej wirusa zapalenia wątroby typu C oddziałującej z błoną [25]. Zaobserwowano także zwiększone pączkowanie z obszaru granicy faz Lo/Ld, co z kolei dobrze koresponduje z faktem obserwacji miejsc fuzji w przypadku wirusa HIV [26]. Wydaje nam się, że są to zjawiska istotne w procesie fuzji, ponieważ przez wypychanie lipidów z fazy lamelarniej prowadzą do indukowania krzywizny dwuwarstwy, obniżając tym samym barierę energetyczną na proces fuzji z drugim fragmentem blisko sąsiadującej błony.

Co dała realizacja grantu Polpharma?

- Realizacja grantu przyniosła wiele nowych danych fizykochemicznych i obserwacji nowych, dotychczas niescharakteryzowanych zjawisk zachodzących z udziałem peptydów fuzyjnych. Poniżej najważniejsze spostrzeżenia.
- Charakterystyka ilościowa energetyki wiązania peptydów – mimo podobnych wartości energii swobodnej Gibbsa w pH 5 peptyd HAfp1-23 powoduje wydajniejszą fuzję błonową.
- Spadek energii swobodnej Gibbsa wiązania dla peptydów w błonach zawierających cholesterol

jest odwrotnie skorelowany ze zdolnością do fuzji.

- Badania mikroskopowe oraz symulacje dynamiki molekularnej wskazały na większe wprowadzanie nieporządku w otaczających fosfolipidach przez dłuższy peptyd.
- Peptyd w „pełnej” formie (HAfp1-23) w błonach zawierających cholesterol powoduje powstawanie nowej fazy lipidowej. Jest to zjawisko dotychczas nieopisywane dla peptydu fuzyjnego grypy.

Dalsze kierunki badań

Opracowany sposób mikroskopowej wizualizacji i oceny ilościowej fuzji pomiędzy błonami lipidowymi otwiera nowe możliwości badawcze. Dzięki temu, że używa się tu dwóch rodzajów liposomów, sposób ten w przyszłości może być wykorzystywany do oceny fuzji otoczek lipidowych całych wirionów grypy, jak również rekonstruowanej hemaglutyniny o pełnej długości w błonach o wybranym składzie. Możliwe jest także sprawdzanie substancji chemicznych działających jako potencjalne inhibitory fuzji.

PIŚMIENNICTWO

1. Alberts, Molecular biology of the cell: Garland Science, 2010.
2. Wharton, Basic virology: Blackwell Publishing, 2008.
3. Cross K.J., Langley W.A., Russell R.J., Skehel J.J., Steinhauer D.A., Composition and functions of the influenza fusion peptide, *Protein Pept Lett.*, 2009; 16: 766-78.
4. Wharton S.A., Martin S.R., Ruigrok R.W., Skehel J.J., Wiley D.C., Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin, *J Gen Virol.*, 1988; 69 (Pt 8): 1847-57.
5. Lear J.D., DeGrado W.F., Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH2 terminus of influenza HA-2, *J Biol Chem.*, 1987; 262: 6500-5.
6. Clague M.J., Knutson J.R., Blumenthal R., Herrmann A., Interaction of influenza hemagglutinin amino-terminal peptide with phospholipid vesicles: a fluorescence study, *Biochemistry*, 1991; 30: 5491-7.
7. Hsu C.H., Wu S.H., Chang D.K., Chen C., Structural characterizations of fusion peptide analogs of influenza virus hemagglutinin. Implication of the necessity of a helix-hinge-helix motif in fusion activity, *J Biol Chem.*, 2002; 277: 22725-33.
8. Han X., Bushweller J.H., Cafiso D.S., Tamm L.K., Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin, *Nat Struct Biol.*, 2001; 8:715-20.
9. Lorieau J.L., Louis J.M., Bax A., The complete influenza hemagglutinin fusion domain adopts a tight helical hairpin arrangement at the lipid: water interface, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: 11341-6.
10. Lorieau J.L., Louis J.M., Bax A., Helical hairpin structure of influenza hemagglutinin fusion peptide stabilized by charge-dipole interactions between the N-terminal amino group and the second helix, *J Am Chem Soc.*, 2011; 133: 2824-7.
11. Lorieau J.L., Louis J.M., Bax A., The impact of influenza hemagglutinin fusion peptide length and viral subtype on its structure and dynamics, *Biopolymers*, 2013; 99: 189-95.
12. Lorieau J.L., Louis J.M., Schwieters C.D., Bax A., pH-triggered, activated-state conformations of the influenza hemagglutinin fusion peptide revealed by NMR, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109: 19994-9.
13. Ghosh U., Xie L., Jia L., Liang S., Weliky D.P., Closed and Semiclosed Interhelical Structures in Membrane vs Closed and Open Structures in Detergent for the Influenza Virus Hemagglutinin Fusion Peptide and Correlation of Hydrophobic Surface Area with Fusion Catalysis, *J Am Chem Soc.*, 2015; 137: 7548-51.
14. Wimley W.C., White S.H., Experimentally determined

- hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces, *Nat Struct Biol.* 1996; 3: 842-8.
15. Senes A., Gerstein M., Engelman D.M., Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions, *J Mol Biol.*, 2000; 296: 921-36.
 16. Worch R., Structural biology of the influenza virus fusion peptide, *Acta Biochim Pol.*, 2014; 61: 421-6.
 17. Enserink M., Cohen J., Malakoff D., Influenza One H5N1 Paper Finally Goes to Press; Second Greenlighted, *Science*, 2012; 336: 529-30.
 18. Chan Y.H., Boxer S.G., Model membrane systems and their applications, *Curr Opin Chem Biol.*, 2007; 11: 581-7.
 19. Keller H., Worch R., Schwille P., Model membrane systems, *Methods Mol Biol.*, 2013; 1008: 417-38.
 20. Ladokhin A.S., Jayasinghe S., White S.H., How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal Biochem*, 2000; 285: 235-45.
 21. Matos P.M., Franquelim H.G., Castanho M.A., Santos NC., Quantitative assessment of peptide-lipid interactions. Ubiquitous fluorescence methodologies, *Biochim Biophys Acta*, 2010; 1798: 1999-2012.
 22. Stockl M.T., Herrmann A., Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy, *Biochim Biophys Acta*, 2010; 1798: 1444-56.
 23. Filipek A., Krupa J., Worch R., Length dependence of influenza virus fusion peptides for membrane fusion and binding, *European Biophysics Journal*, 2015; 44: 235.
 24. Worch R., Krupa J., Filipek A., Szymaniec A., Setny P., Three conserved C-terminal residues of influenza fusion peptide alter its behavior at the membrane interface. *Wysłane do EMBO: J.* 2016.
 25. Hanson J.M., Gettel D.L., Tabaei S.R., Jackman J., Kim M.C., Sasaki D.Y. et al., Cholesterol-Enriched Domain Formation Induced by Viral-Encoded, Membrane-Active Amphipathic Peptide. *Biophys J*, 2016; 110: 176-87.
 26. Yang S.T., Kiessling V., Simmons J.A, White J.M., Tamm L.K., HIV gp41-mediated membrane fusion occurs at edges of cholesterol-rich lipid domains, *Nat Chem Biol.*, 2015; 11: 424-31.