



УДК 577.334:591.145

НОВЫЙ ВОДОРАСТВОРИМЫЙ АНАЛОГ ПЕПТИДА СЛИЯНИЯ ИЗ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА: СИНТЕЗ И СВОЙСТВА

© 2004 г. П. В. Дубовский^{*,#}, М. Н. Жмак^{*}, Г. И. Максаев^{**}, А. С. Арсеньев^{*}

^{*}Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{**}Институт электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Поступило в редакцию 13.11.2003 г. Принято к печати 20.11.2003 г.

Для исследования пептида слияния из гемагглютинина вируса гриппа сконструирован его водорастворимый аналог F32, способный взаимодействовать с липидными мембранами. Пептид F32 состоит из 32 а.о.; его N-концевая последовательность 1–24 идентична пептиду слияния из гемагглютинина (штамм А/PR/8/34), а остатки 25–32 (GGGKKKKK) добавлены для водорастворимости. В экспериментах по регистрации флуктуаций проводимости на бислойных липидных мембранах продемонстрирована активность пептида, характерная для пептидов слияния. Методами КД-спектроскопии определены условия, в которых структура F32 в составе детергентных мицелл, где она может быть изучена методами спектроскопии ¹H-ЯМР высокого разрешения, близка структуре, реализуемой пептидом при его взаимодействии с фосфолипидными липосомами.

Ключевые слова: гемагглютинин; пептиды слияния; флуктуации проводимости; ЯМР; КД.

Пептиды слияния – фрагменты белков, состоящие из 20–25 а.о. и способные опосредовать слияние липидных, биологических мембран [1]. При изучении этих пептидов *in vitro* предпочтительно работать с их водорастворимыми аналогами. Пептид P20H7 является одним из них [2]. Его N-концевая часть (20 а.о.) полностью идентична пептиду слияния из гемагглютинина (штамм Х31F/68), а на C-конце добавлен фрагмент GCGKKKK, который необходим для солюбилизации пептида. В пептиде есть два остатка Glu (Glu11 и Glu15). Имеются данные, что ионогенные группы этих остатков играют решающую роль в процессе рН-зависимой стабилизации α-спиральной структуры пептида [3]. Для более детального изучения роли ионогенных групп пептида в процессе его рН-зависимого взаимодействия с мембранами [3] целесообразно изучить пептид только с одним остатком Glu (Glu11).

Нами с помощью Fmoc-схемы твердофазного синтеза получен пептид F32, состоящий из 32 а.о.: **GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYGYGGGKKKK**. Индивидуальность пептида подтверждена данными масс-спектрометрии и обращенно-фазовой ВЭЖХ (данные не приведены), а чистота составляет не менее 95%. Последовательность 1–24 (выделена жирным шрифтом) F32 соответствует N-концевому фрагменту HA2-субъединицы гемаг-

глютинина (штамм А/PR/8/34), а остатки 25–32 обеспечивают водорастворимость.

¹H-ЯМР-спектры пептида F32 в водном растворе при рН 3.1 характеризуются узкими спектральными линиями (рис. 1а). Данные КД-спектроскопии свидетельствуют о неупорядоченной структуре пептида при этих условиях (рис. 2, спектр а). Увеличение рН приводило к заметному уширению сигналов ¹H-ЯМР пептида (рис. 1а), что, по-видимому, связано с его агрегацией.

Методом КД-спектроскопии обнаружено, что при связывании F32 с липосомами (диаметр 100 нм), сформированными из диолеоилфосфатидилхолина (молярное соотношение липид/пептид 40 : 1 и выше), пептид становится преимущественно α-спиральным (содержание α-спирали ~48%). Интересно, что КД-спектр пептида в этих условиях (рис. 2, спектр б) практически идентичен его КД-спектру в составе мицелл додецилфосфохолина (молярное соотношение DPC/пептид 60 : 1, рН 3.0) (рис. 2, спектр в). Спектры ¹H-ЯМР пептида в мицеллах DPC (рис. 1б, рН 3.1) характеризуются хорошим спектральным разрешением, которое не ухудшается при повышении рН (рис. 1б, рН 6.4). Если учесть, что рK_a боковой группы остатка Glu в зависимости от среды находится в диапазоне значений рН 4–6 [3], то в мицеллах DPC может быть исследована структура пептида в условиях, когда боковая группа единственного остатка Glu (Glu11) заряжена или нет.

В экспериментах на бислойных липидных мембранах при рН 7.0 F32 индуцирует появление

Сокращения: DOPC – диолеоилфосфатидилхолин; DPC – додецилфосфохолин.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-27-33; эл. почта: reporter@nmr.ru).

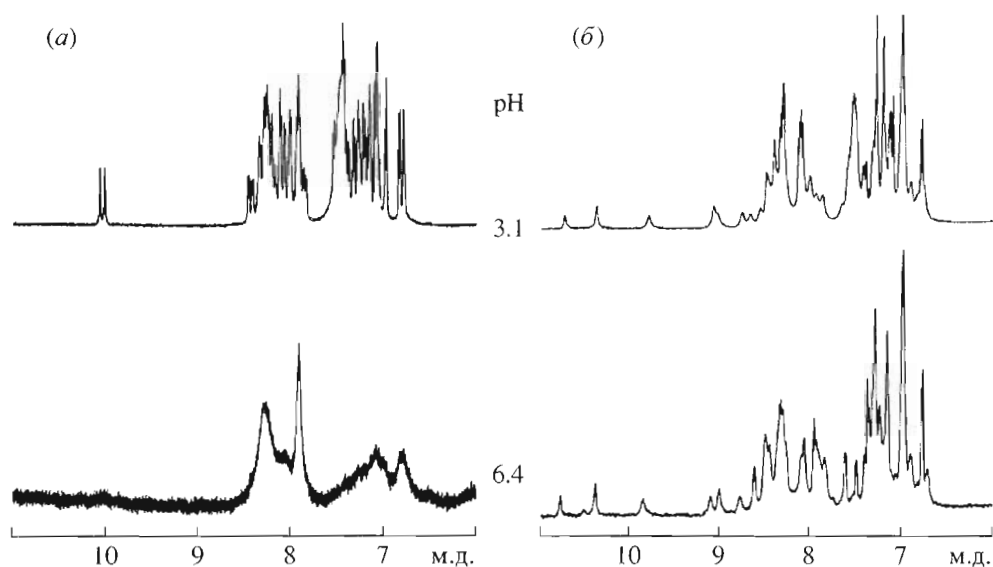


Рис. 1. Область ароматических и амидных протонов ^1H -ЯМР-спектров (получены на спектрометре DRX-500, Bruker с рабочей частотой на ядрах ^1H 500.13 МГц) пептида F32 (концентрация 1 мг/мл, температура 30°C) в водном растворе $^2\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (30 : 470 по объему) (а) и в мицеллах DPC (б) (мольное соотношение пептид/детергент 1 : 40) при рН 3.1 и 6.4.

в мембране проводящих структур с различными уровнями проводимости (рис. 3), что характерно для активных пептидов слияния [4]. При понижении рН до 4.0 также было зарегистрировано наличие в мембране структур сравнимой амплитуды проводимости, имеющих, однако, меньшие времена жизни. При этом уровни проводимости становились нечеткими, наблюдался дрейф (записи не приведены). Эти данные показывают, что индуцируемое F32 изменение проводимости

бислоиных липидных мембран зависит от рН в диапазоне 4.0–7.0 и, следовательно, определяется изменением ионогенного состояния карбоксильной группы остатка Glu11 пептида. Эти изменения могут быть объяснены на структурном уровне при изучении пептида в мицеллах DPC методом ЯМР-спектроскопии.

Таким образом, в настоящей работе осуществлен синтез активного пептида слияния и показано, что его структура в составе детергентных ми-

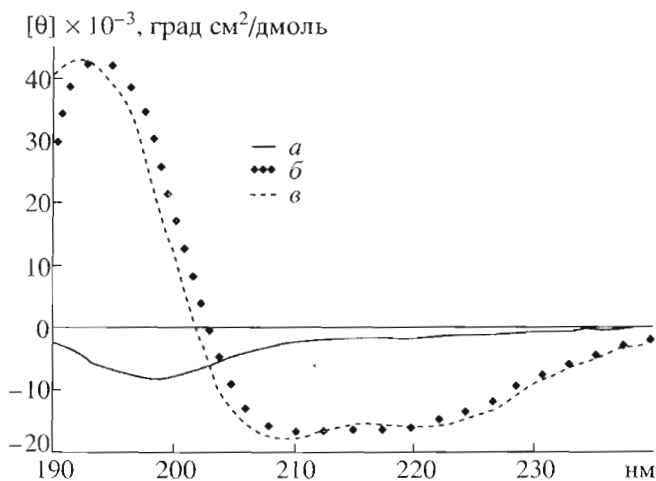


Рис. 2. Спектры КД (спектрополяриметр JASCO 500, 19°C) пептида F32 (0.3 мг/мл, рН 3.0) в водном растворе (спектр а), в присутствии DOPC-липосом (мольное соотношение липид/пептид 40 : 1), полученных методом экструзии через фильтр с диаметром пор 100 нм (спектр б), и мицелл DPC (мольное соотношение детергент/пептид 60 : 1) (спектр в).

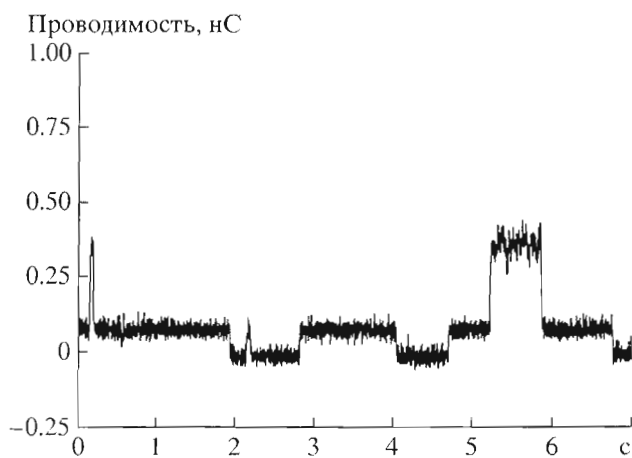


Рис. 3. Скачкообразные флуктуации проводимости бислоиных липидных мембран, сформированных из дифитаноилфосфатидилхолина после сорбции на них пептида слияния F32 (концентрация пептида 10^{-7} М) при рН 7.0. В работе использована установка на базе пэтч-кламп усилителя List EPC-7 и микроскопа Leitz Fluovert (Германия).

целл, где она может быть исследована методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, близка той, которая реализуется при связывании пептида с фосфолипидными липосомами.

Выражаем признательность Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку (грант № 02-04-48882), а также И.А. Куделиной за съемку спектров КД и Ю.А. Чизмаджеву за ценные замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. White J.M. // *Science*. 1992. V. 258. P. 917–924.
2. Han X., Bushweller J.H., Cafiso D.S., Tamm L.K. // *Nat. Struct. Biol.* 2001. V. 8. P. 715–720.
3. Dubovskii P.V., Li H., Takahashi S., Arseniev A.S., Akasaka K. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. P. 786–798.
4. Düzgünes N., Gambale F. // *FEBS Lett.* 1988. V. 227. P. 110–114.

A New Water-Soluble Analogue of the Fusion Peptide of Influenza Virus Hemagglutinin: Synthesis and Properties

P. V. Dubovskii^{*,#}, M. N. Zhmak^{*}, G. I. Maksaev^{**}, and A. S. Arseniev^{*}

[#] Phone: +7 (095) 335-2733; e-mail: peter@nmr.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} Frumkin Institute of Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

A water-soluble analogue F32 of the fusion peptide from the influenza virus hemagglutinin was synthesized. It consisted of 32 aa residues and retained the ability to interact with lipid membranes; its *N*-terminal sequence 1–24 coincided with that of the fusion protein from hemagglutinin (strain A/PR/8/34), whereas residues 25–32 (GGGKKKKK) provided its solubility in water. The peptide induced the conductivity fluctuations in planar bilayer lipid membranes characteristic of active fusion peptides. Conditions were found using CD spectroscopy under which the structure of F32 inside detergent micelles, where it can be studied by high-resolution ¹H NMR spectroscopy, is close to the structure of the peptide during its interaction with phospholipid liposomes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: hemagglutinin, fusion peptides, conductivity fluctuations, NMR, CD spectroscopy