

ИЗУЧЕНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРАТАЦИИ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА

Н.С. Гребенкина, Н.А. Контаров, Н.В. Юминова

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Резюме. Известно, что функционирование многих белков и ферментов зависит от степени гидратации их поверхностей. В наших исследованиях в качестве модели поверхностного антигенного вирусного белка была выбрана нейраминидаза (NA) вируса гриппа. С помощью модели адсорбции Брунауэра–Эммета–Теллера (БЭТ) рассчитаны величины монослоя воды (a_m) при различных значениях упругости паров воды. Из полученных изотерм БЭТ можно сделать вывод о наличии гистерезиса, заключающегося в различном значении монослоя a_m при сорбции и десорбции воды с поверхности фермента, что связано, вероятно, с высокой степенью кооперативности образующейся гидратной оболочки. Максимальное связывание молекул воды наблюдалось при значении упругости паров $p/p_s = 0,65$ и составило $a_m = 224$ молекулы воды на одну молекулу фермента. При сопоставлении с расчетной площадью поверхности тетрамера NA ($S = 256 \text{ нм}^2$) и учитывая максимальную площадь проекции молекулы воды можно сделать вывод о полном покрытии монослоем воды всей поверхности фермента. При данном значении a_m наблюдалась максимальная активность NA, минимум активности фермента приходился при значении $a_m = 98$ молекул воды на молекулу фермента, что соответствовало значению упругости паров воды $p/p_s = 0,38$. Таким образом, для NA вируса гриппа показана зависимость ферментативной активности от степени гидратации поверхности фермента. Получена зависимость иммуногенности вируса гриппа от степени гидратации NA.

Ключевые слова: степень гидратации, нейраминидаза, модель адсорбции Брунауэра–Эммета–Теллера, иммуногенность вируса гриппа.

THE STUDY OF INFLUENZA VIRUS NEURAMINIDASE HYDRATION DEGREE

Grebyonkina N.S., Kontarov N.A., Yuminova N.V.

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. It is known that the functioning of many proteins and enzymes depends on the degree of hydration of their surfaces. In our studies, neuraminidase (NA) of influenza virus was selected as a model for surface antigenic viral protein. The Brunauer–Emmett–Teller (BET) model of adsorption was used to calculate the values of water monolayer (a_m) at different values of water vapor pressure. The obtained BET isotherms allow for concluding that hysteresis takes place manifested by the difference between the monolayer a_m values for sorption and desorption of water from the surface of the enzyme, which is probably associated with a high degree of cooperation of the hydration shell formed. The maximum binding of water molecules was observed for the vapor pressure p/p_s value of 0.65 and was $a_m = 224$ water molecules per a molecule of the enzyme. Basing on the calculated surface area of a NA tetramer ($S = 256 \text{ nm}^2$) and the maximum projection area of water molecule, it may be concluded that the entire surface of the enzyme is completely covered with a water monolayer. For said a_m value the maximum activity of NA was observed, whereas the minimum enzyme activity corresponded to the a_m value of 98 water molecules per a molecule of the enzyme, which corresponded to the water vapor pressure p/p_s value of 0.38. Thus, for the influenza virus NA protein a dependency of the enzymatic activity on the degree of hydration of the surface of the enzyme is demonstrated. The dependence of immunogenicity of influenza virus from the extent of hydration of NA.

Key words: hydration degree, neuraminidase, Brunauer–Emmett–Teller adsorption model, immunogenicity of influenza virus.

Адрес для переписки:

Контаров Николай Александрович
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: (495) 674-01-99 (служебн.).
E-mail: kontarov@mail.ru

Contacts:

Nikolai A. Kontarov
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazennyi lane, 5a,
I.I. Mechnikov Research of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 674-01-99 (office).
E-mail: kontarov@mail.ru

Библиографическое описание:

Гребенкина Н.С., Контаров Н.А., Юминова Н.В. Изучение степени гидратации нейраминидазы вируса гриппа // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4. С. 405–408. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-405-408

Citation:

Grebyonkina N.S., Kontarov N.A., Yuminova N.V. The study of influenza virus neuraminidase hydration degree // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 405–408. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-405-408

Введение

Взаимодействие между биологическими макромолекулами имеет важное функциональное значение. Стабильность различных белковых структур зависит от величины контактных площадок, комплементарности центров взаимодействия, характера межмолекулярных сил, возникающих при образовании комплексов, а также от процесса вытеснения части воды, связываемой свободными компонентами комплексов [1].

При определенной степени гидратации белковой молекулы не происходит образования ассоциатов вирусных белков, что имеет непосредственное значение при получении, например, различных противовирусных вакцин. Так, в процессе очистки вакцинного препарата белковые ассоциаты могут оседать на поверхности фильтра, что приводит к снижению специфической активности вирусного препарата. Излишняя или недостаточная гидратация может приводить к маскировке результатов при учетывании нейраминидазы (NA) активности. На сегодняшний день практически полностью отсутствуют данные о влиянии гидратации вирусных белков на их структурно-функциональные свойства. Поэтому целью данной работы было изучение структурно-функционального состояния NA ви-

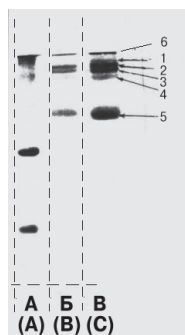


Рисунок 1. Результаты электрофореза в полиакриламидном геле

Figure 1. The results of electrophoresis in polyacrylamide gel

A — электрофореграмма неочищенного вирусосодержащего материала; Б — электрофореграмма вирусосодержащего материала после очистки и концентрирования белкового кольца в градиенте сахарозы; В — электрофореграмма вирусосодержащего материала после очистки и концентрирования белкового осадка в градиенте сахарозы. 1 — Р-белки (PB1, PB2, PA); 2 — нейраминидаза; 3 — гемагглютинин; 4 — NP-белок; 5 — М-белок; 6 — белковый маркер масс.

A — The electrophoretogram of not purified virus containing material; B — The electrophoretogram virus containing material after purification and concentration of protein rings in the gradient of sucrose; C — The electrophoretogram virus-containing material after purification and concentration of the protein precipitate in a gradient of sucrose. 1 — P-proteins (PB1, PB2, PA); 2 — neuraminidase; 3 — hemagglutinin; 4 — NP-protein; 5 — M-protein; 6 — protein mass marker.

руса гриппа при различных степенях гидратации белковых молекул и изучение влияния степени гидратации фермента NA на его активность [2, 3].

Материалы и методы

Препарат белка. NA вируса гриппа выделяли из концентрированного и очищенного вируса гриппа A/Victoria/361/2011 (серотип H3N2). С этой целью вирусы ресуспендировали в Na-ацетатном буфере (50 мМ ацетат Na, 2 мМ NaCl, 0,2 мМ ЭДТА; pH = 7,0) и разрушали 7% октилглюкозидом в течение 2 ч при +4°C. Затем материал центрифугировали при 15 000 об./мин в течение 1 ч (ротор Beckman SW50.1). К супернатанту, содержащему NA, добавляли 2%-ный водный раствор бромида цетримония (Sigma, Германия) до конечной концентрации 0,1%. Образец наносили на анионообменную колонку (1 × 3 см, сорбент DEAE Sephadex A-50), предварительно уравновешенную стартовым буфером (50 мМ Трис-HCl, 0,1% октилглюкозид, pH = 7,2). NA элюировали 30 мл стартового буфера. Каждую фракцию диализовали против буфера STE в течение 72 ч для удаления остатков октилглюкозида. Контроль чистоты выделенного материала осуществляли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS по методу Лэммли (концентрация ПААГ 10%, сила тока при входе в гель 50 мА, далее 80 мА, время проведения — 40 мин) [4] с последующим анализом гелей на денситометре GS-700 (Bio-Rad Laboratories) (рис. 1).

Лиофилизация NA. Сконцентрированный материал разливали по 2 мл в биовials объемом 4 мл, замораживали при -80°C и лиофилизировали в течение 12 ч.

Гидратирование NA измеряли при температуре 25°C на весах Мак-Бена в интервале относительной упругости паров воды 0.38÷0.65. Для измерения изотерм использовали NA (~150 мг), имеющую после длительного вакуумирования при 25°C и 10⁻⁴ мм рт.ст. постоянный вес [5].

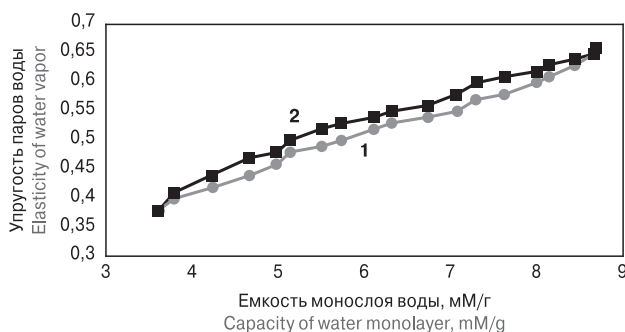


Рисунок 2. Изотерма сорбции и десорбции паров воды NA вируса гриппа

Figure 2. The isotherm of adsorption and desorption of water vapor NA of influenza virus

1 — изотерма сорбции; 2 — изотерма десорбции.
1 — isotherm sorption; 2 — isotherm desorption.

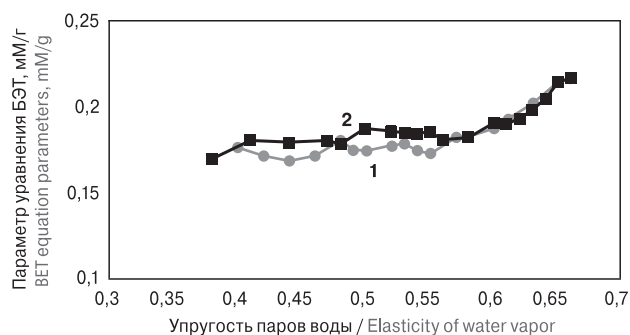


Рисунок 3. Линейная анаморфоза изотермы сорбции и десорбции паров воды NA вируса гриппа в координатах уравнения БЭТ

Figure 3. Linear anamorphosis of the isotherms of sorption and desorption of water vapor NA of influenza virus in the coordinates of equation BET
1 — линейная анаморфоза изотермы сорбции в координатах уравнения БЭТ; 2 — линейная анаморфоза изотермы десорбции в координатах уравнения БЭТ.
1 — linear anamorphosis sorption isotherms in coordinates of equation BET; 2 — linear anamorphosis desorption isotherms in coordinates of equation BET.

Активность NA определяли по методу [6]. Готовили реакционную смесь (0.1 мл очищенной NA и 0.1 мл фетуина в 0,2 М фосфатном буфере с pH = 6,0). Смесь тщательно перемешивали и инкубировали 2 ч при 35°C. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли 0,1 мл периодатного реагента, перемешивали и инкубировали 20 мин при 25°C. К смеси добавляли 1 мл арсенитного реагента и перемешивали до растворения осадка. К смеси добавляли 2,5 мл тиобарбитуратного реагента, перемешивали и помещали на 15 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения к смеси добавляли 4 мл бутанолового реагента (N-бутанол, содержащий 5% по объему концентрированной соляной кислоты) и интенсивно встряхивали для лучшей экстракции окрашенного вещества. Смесь центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин при 25°C. Отбирали водную (нижнюю) фазу и определяли на спектрофотометре величину поглощения при длине волны 549 нм с соответствующим контролем. Оптимальное поглощение составляло 0,58 оптической единицы. Полученный результат сопоставляли с калибровочной кривой (с концентрацией N-ацетилнейраминовой кислоты от 5 до 40 мкг (в 0,2 мл 0,2 М фосфатного буфера, pH = 6,0). Иммуногенность вируса гриппа определялась по РТГА [9].

Результаты и обсуждение

По полученным данным были построены изотермы сорбции-десорбции паров воды (рис. 2), а также их линейные анаморфозы в координатах уравнения Брунауэра–Эммета–Теллера (БЭТ) (рис. 3).

Как видно из графика (рис. 2), максимальное связывание молекул воды наблюдалось при зна-

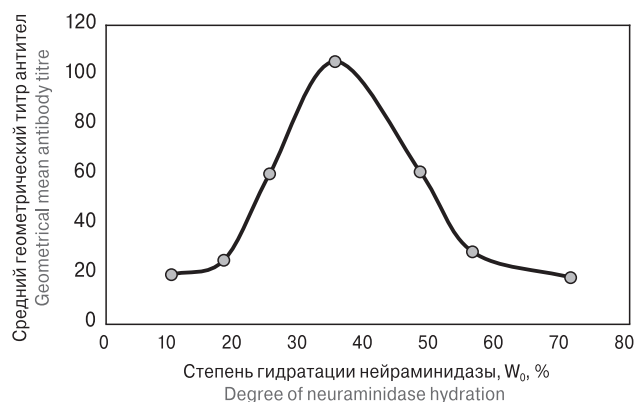


Рисунок 4. Зависимость среднего геометрического титра антител от степени гидратации нейраминидазы вируса гриппа A/Victoria/361/2011 (серотип H3N2)

Figure 4. The dependence of the average geometric titers of antibodies to the degree of hydration of the neuraminidase of influenza virus A/Victoria/361/2011 (H3N2 serotype)

чении упругости паров $p/p_s = 0,65$ и составило 8,66 мМ воды на 1 г NA, что соответствует 224 молекулам воды на 1 молекулу фермента. Минимальное связывание молекул воды наблюдалась при значении упругости паров воды 0,38 и составило 3,6 мМ воды на 1 г NA. При сопоставлении с расчетной площадью (S) тетрамера NA ($S = 256 \text{ нм}^2$) [7] и учитывая максимальную S проекции молекул воды можно сделать вывод о полном покрытии монослоем воды всей поверхности фермента.

Также видно, что изотермы сорбции и десорбции паров воды не совпадают, что связано с явлением гистерезиса, заключающегося в различном значении монослоя a_m при сорбции и десорбции паров воды с поверхности фермента NA в виду высокой степени кооперативности образующейся гидратной оболочки.

С помощью линейных анаморфоз (рис. 3) были рассчитаны параметры уравнения БЭТ. Из полученных данных можно сделать вывод, что величина a_m (емкость монослоя) соответствует совокупности молекул воды, связанных в первую очередь теми центрами, которые имеют большую энергию сорбции, по сравнению с энергией связанной воды, завершающих образование гидратной оболочки.

При анализе линейных анаморфоз была рассчитана теплота сорбции, равная 3,4 кДж/моль.

Теплоту сорбции рассчитывали по формуле [10]:

$$Q = RT \ln C,$$

где Q — теплота сорбции, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура в Кельвинах, C — параметр модели БЭТ.

Из полученного значения видно, что результат теории сходен с экспериментальными данными по гидратации белков [8].

Поэтому можно сделать вывод, что процесс сорбции обратимый, сопровождается выделением тепла, называемого теплотой сорбции, которое тем больше, чем прочнее связь между молекулами сорбента и сорбата.

Максимальная активность фермента NA вируса гриппа наблюдалась при значении $a_m = 224$ молекулы паров воды на 1 молекулу фермента, а минимум активности NA соответствовал $a_m = 98$ молекул паров воды на молекулу фермента, что соответствовало значению упругости паров воды 0,38. Таким образом, для нейраминидазы вируса гриппа показана зависимость ферментативной активности от степени гидратации поверхности фермента.

Степень гидратации оказывает также влияние на иммуногенность вируса гриппа, что является важным при получении различных противогриппозных вакцин. Нами получена зависимость среднего геометрического титра антител от степени гидратации нейраминидазы вируса гриппа A/Victoria/361/2011 (серотип H3N2) (рис. 4). Данная зависимость имеет экстремум в виде максимума при степени гидратации $W_0 = 35\%$, что практически соответствует значению $a_m = 235$ молекул паров воды на 1 молекулу фермента, при котором наблюдался максимум активности нейраминидазы. Полученный результат указывает на необходимость учета гидратации нейраминидазы вируса гриппа при получении вакцинных препаратов.

Список литературы/References

1. Аксенов С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. М.: Институт компьютерных исследований. 2004. 212 с. [Aksenov S.I. Voda i ee rol' v regulyatsii biologicheskikh protsessov [Water and its role in the regulation of biological processes]. Moscow: Institute of Computer Science, 2004, 212 p.]
2. Вирусология. Методы: пер. англ. Под ред. Мейхи Б.М.: Мир, 1988. 344 с. [Barrett T., Bird P., Clegg J. Virusologiya. Metody. Pod red. Meikhi B. [Virology. Methods. Ed. Meikhi B.]. Moscow: Mir, 1988, 344 p.]
3. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. Пер. с англ., 2-е изд. М.: Мир. 1984. 306 с. [Greg S., Sing K. Adsorbtsiya, udel'naya poverkhnost', poristost' [Absorption, specific surface, porosity]. 2nd ed. Moscow: Mir. 1984, 306 p.]
4. Лихтенштейн Г.И. Закономерности в энтропийных и энергетических свойствах ферментативных процессов // Биофизика. 1966. Т. 19. С. 562–575. [Likhtenshtein G.I. Regularities in the entropic and energy properties of enzymatic processes. *Biofizika = Biophysics*, 1966, vol. 19, pp. 562–575. (In Russ.)]
5. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики гриппа: методические указания (МУ 3.3.2.1758-03). М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора МЗ РФ. 2005. 44 с. [Metody opredeleniya kachestva immunobiologicheskikh preparatov dlya profilaktiki grippa: metodicheskie ukazaniya (MU 3.3.2.1758-03). [Methods for determining the quality of immunobiological preparations for the prevention of influenza: guidelines (MU 3.3.2.1758-03)]. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2005. 44 p.]. URL: http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4727 (29.09.2017)
6. Остарман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука. 1981. 288 с. [Ostarman L.A. Metody issledovaniya belkov i nukleinovyykh kislot: Elektroforez i ul'tratsentrifugirovanie (prakticheskoe posobie) [Research methods proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifuge forces (practical guide)]. Moscow: Science, 1981, 288 p.]
7. Туроверов К.К., Кузнецова И.М. Собственная УФ-флуоресценция белков как инструмент для изучения их динамики // Цитология. 1998. Т. 40, № 8–9. С. 735–746. [Turoverov K.K., Kuznetsova I.M. Own UV-fluorescence of proteins as a tool for studying their dynamics. *Tsitologiya = Cytology*, 1998, vol. 40, no. 8–9, pp. 735–746. (In Russ.)]
8. Хургин Ю.И., Росляков В.Я., Клячко-Гурвич А.Л., Бруева Т.Р. Адсорбция паров воды химотрипсинов и лизоцимом // Биохимия. 1972. № 37. С. 485–492. [Khurgin Yu.I., Roslyakov V.Ya., Klyachko-Gurvich A.L., Brueva T.R. Adsorption of water vapor of chymotrypsins and lysozyme. *Biokhimiya = Biochemistry*, 1972, no. 37, pp. 485–492. (In Russ.)]
9. Frauenfelder H., Petsko G. A., Tsernoglou D. Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature*, 1979, vol. 280, pp. 558–565. doi: 10.1038/280558a0
10. Varghese J.N., Laver W.G., Colman P.M. Structure of influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*, 1983, vol. 303, pp. 35–40.

Авторы:

Гребенкина Н.С., младший научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций ФГБНУ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Контаров Н.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Юминова Н.В., д.б.н., доцент, зам. директора по науке ФГБНУ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Grebinkina N.S., Junior Researcher, Laboratory of the Children's Viral Infections, I.I. Mechnikov Research of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Kontarov N.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of the Children's Viral Infections, I.I. Mechnikov Research of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Yuminova N.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Director of Research, I.I. Mechnikov Research of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.05.2017
Отправлена на доработку 02.06.2017
Принята к печати 25.08.2017

Received 02.05.2017
Revision received 02.06.2017
Accepted 25.08.2017