

用傅里叶变换红外光谱技术研究 HIV - 1 融合肽的插膜深度与角度

邱 阳, 林克椿, 聂松青*

(北京大学医学部生物物理系, 北京 100083)

摘要:为探讨 HIV - 1 gp41 N 端融合肽诱导膜融合的机理,利用傅里叶变换红外光谱技术研究了化学方法合成的代表 HIV - 1 gp41 N 末端的 23 肽(HIV_{WT})分别与酸性 POPG 和中性 POPC 脂膜作用后,多肽 H/D 交换程度的变化及其在膜中的取向。结果表明,HIV_{WT} 分子中的大部份氨基酸残基被 POPG 脂膜保护,分子骨架上的酰胺质子只有 11.9%可被 D 交换,而 HIV_{WT} 被 POPC 脂膜保护的则小得多;在 POPG 脂质体中,HIV_{WT} 分子中的 α -螺旋与脂双层平面的角度为 $29 \pm 2^\circ$, β -折叠与脂双层平面的夹角为 $25 \pm 1^\circ$ 。在 POPC 脂质体中,HIV_{WT} 分子的 α -螺旋与脂双层平面的角度为 $22 \pm 1^\circ$; β -折叠与脂双层平面的夹角为 $26 \pm 3^\circ$ 。根据实验结果,对 HIV_{WT} 的插膜状态进行了讨论。

关键词: HIV - 1 融合肽; FTIR; H/D 交换; 分子取向

中文分类号: Q735 **文献标识码:** A **文章编码:** 1000 - 6737(2001)01 - 0046 - 07

在人类免疫缺陷病毒 I 型(HIV - 1)感染人体 CD⁴⁺ 淋巴细胞的过程中,位于病毒包膜表面的糖蛋白 gp41N 末端的融合肽与靶细胞的脂膜发生相互作用,将病毒的包膜与靶细胞的脂膜连接起来,启动病毒与靶细胞膜的融合过程,在破坏靶细胞膜稳定性的同时使病毒的核心蛋白和遗传物质注入到宿主细胞内,导致细胞死亡和病毒在体内的繁殖。因此,融合肽在病毒感染的初始阶段起着至关重要的作用。

分子生物学点突变的方法已确定 HIV - 1 融合肽是位于 gp41 N 末端的一段大约由 25 个左右的氨基酸残基组成的疏水序列^[1,2]。为了探讨 HIV - 1 融合肽诱导膜融合的机理,目前普遍采用化学方法来合成代表 HIV - 1 gp41 N 末端的多肽序列,研究它们与模型膜的相互作用。大量实验已经证明,23 肽(HIV_{WT})能诱导细胞及某些脂质体发生融合^[3,4]。我们曾经报道,HIV_{WT} 可以破坏带负电荷的 POPG 脂质体的稳定性并使其发生融合,但却不能影响中性 POPC 脂膜的稳定性,也不能诱导其融合^[5]。同时,荧光及单分子层膜技术证明,HIV_{WT} 与 POPG 脂膜有较强的相互作用,能够较深地插入到 POPG 脂双层中;HIV_{WT} 与 POPC 脂膜的相互作用则要弱得多,只能结合在 POPC 脂膜的浅表面^[5,6]。这些现象提示我们,HIV - 1 融合肽与磷脂分子之间的静电相互作用可能对融合肽功能的发挥起着很重要的作用。本文将进一

收稿日期: 2000 - 06 - 20

基金项目: 国家自然科学基金 39770181 资助

作者简介: 邱阳,1968 年出生,医学硕士,电话:(010)62092444, E-mail: biophy@mail.bjmu.edu.cn.

* 通讯联系人

步研究 HIV_{WT} 分别与这两种不同电性的脂质体作用后的插膜状态,以期深入了解 HIV-1 融合肽诱导膜融合的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

合成多肽 HIV_{WT} 的序列为 AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS-NH₂, 购自 Advanced ChemTech(Louisville, KY, USA)公司,纯度大于 91%,质谱检验分子量与计算值相符合,用 DMSO 配成 10mg/ml 溶液储存于 -20℃。1-棕榈酰-2-油酰-磷脂酰甘油(1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol, POPG)和 1-棕榈酰-2-油酰-磷脂酰胆碱(1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine, POPC)购自 Sigma 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 脂质体的制备

取磷脂 0.2mg,溶于 20μl CHCl₃/CH₃OH(2:1, v/v)溶剂中, N₂ 气吹干,真空干燥 2-3 小时,用 2ml HEPES 缓冲液(5mmol/L HEPES, 100mmol/L NaCl, pH7.4)水化, 20-25℃水浴超声 20 分钟至溶液清亮,得到小单层脂质体(small unilamellar vesicles, SUV)。

1.2.2 ATR-FTIR 测量 H/D 交换

50μg 多肽加入 50μl 20mmol/L POPG 或 POPC SUVs 溶液中,在 37℃温育 30 分钟,然后将样品溶液转移到固定在支架上的 ZnSe 棱形晶片(45°入射角)上,用高纯度 N₂ 气流缓缓吹干样品,于 25℃采集红外光谱。测量 H/D 交换时,将一滴 D₂O 加到 ZnSe 晶片上,使之覆盖样品,并将 ZnSe 晶片置入一密封的、饱和了 D₂O 蒸汽的小盒中,于 25℃放置 72 小时,以保证 H/D 交换完全,样品用 N₂ 气吹干后测量红外光谱。实验在 Bio-Rad FTS165 型傅立叶变换红外光谱仪上进行,样品均在 25℃下扫描 512 次,分辨率设为 4cm⁻¹。根据 D 交换前后酰胺 II 带和酰胺 I 带的面积比 $\alpha(A_{amide II}/A_{amide I})$ 计算 H/D 交换的程度。未发生 D 交换的多肽分子骨架上 -NH 基团所占的百分率用 f 表示, $f = \omega'/\omega$ 。式中 ω 是 D 交换之前酰胺 II 带和酰胺 I 带的面积比, ω' 是 D 交换之后酰胺 II 带和酰胺 I 带的面积比^[7]。

1.2.3 偏振红外法测量 HIV_{WT} 在膜中的取向

50μg 多肽干粉加入 50μl 20mmol/L POPG 或 POPC SUVs 溶液中, SUVs 用 D₂O 制备,含 5mmol/L HEPES, 100mmol/L NaCl, pH7.4。样品溶液在 37℃温育 30 分钟,转移到 Ge 晶片上, Ge 晶片的规格为 50×50×2mm, 45°光隙,产生 25 次内反射(internal reflection)。将附有样品膜的 Ge 晶片固定在支架上。仪器同 1.2.2,用 KRS-5(ICR)偏振片产生 0°和 90°偏振光。于 25℃分别记录平行(0°)和垂直(90°)于样品膜表面的红外偏振光谱。扫描次数 512 次,分辨率为 4cm⁻¹。二向色性比 $R^{ATR} = A^{90^\circ}/A^{0^\circ}$,利用下式计算序参数 S ^[8]。

$$S = \frac{2}{(3\cos^2\alpha - 1)} \cdot \frac{E_x^2 + E_z^2 - R^{ATR}E_y^2}{E_x^2 - 2E_z^2 - R^{ATR}E_y^2} \quad (1)$$

E_x 、 E_y 、 E_z 分别是 x 、 y 、 z 三个方向的电场分量,响应的数值为 1.398, 1.516 和 1.625。 α 是多肽分子轴和 C=O 偶极矩之间的角度,对 α -螺旋来说, α 为 22°^[9]。 α -螺旋与脂双层的法线之间的角度 θ 和序参数 S 相关^[8] :

$$S = \frac{3(\cos^2\theta) - 1}{2} \quad (2)$$

β -链与脂双层法线方向所形成的角度 γ 可由下式计算:

$$R^{ATR}(0^0) = \frac{E_x^2}{E_y^2} + \frac{2(\cos^2\gamma)}{1 - (\cos^2\gamma)} \cdot \frac{E_z^2}{E_y^2} \quad (3)$$

式(3)中 R^{ATR} 为酰胺 II 带的二向色性比^[10]。

2 实验结果

2.1 利用表面衰减全反射傅立叶变换红外技术(ATR-FTIR)测量 H/D 交换可以反映出多肽骨架上 -NH- 基团与溶剂的接近程度。多肽与脂膜作用后,多肽骨架上的质子被 D 交换的多少与多肽插膜的程度成反比关系。图 1 为 HIV_{WT} 在不同条件下发生 H/D 交换前后酰胺 I 带(1600-1700cm⁻¹)、酰胺 II 带(1500-1600cm⁻¹)和酰胺 II'带(1455-1500cm⁻¹)的红外光谱。D 交换之后,酰胺 II 带的吸收强度下降,而酰胺 II'带的吸收强度增加,根据式(1)可计算出未发生 H/D 交换的 -NH- 基团的百分比。结果列于表 1 中。

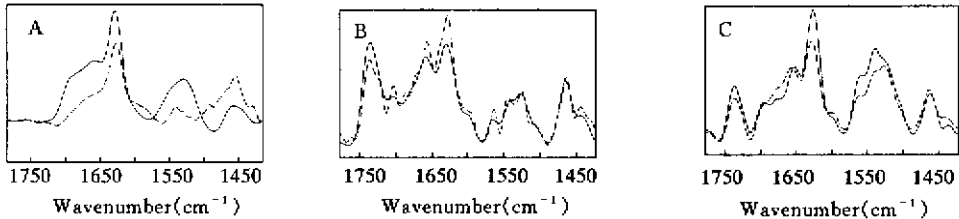


Fig.1 ATR-FTIR absorbance spectra of peptide-liposome complex dried from H₂O and D₂O. Both spectra were recorded on the same sample dried from H₂O buffer (solid line) and, after complete exchange, from D₂O buffer (dashed line). (A) HIV_{WT} alone, (B) HIV_{WT} in POPG SUV, (C) HIV_{WT} in POPC SUV

Table 1 Percentage of H/D exchange of HIV_{WT} buried in POPG and POPC liposome films

sample	HIV _{WT} alone	in POPG	in POPC
%	86.0 ± 2.6	11.9 ± 4.1	44.6 ± 5.7

HIV_{WT} 单独存在时,分子骨架上的质子有 86% 可被 D 交换;而在 POPG 脂质体中,只有 11.9% 的骨架 H 发生了 D 交换;在 POPC 脂质体中,可交换的 HIV_{WT} 骨架上的 H 占 44.6%。说明 HIV_{WT} 分子的大部分被埋在 POPG 脂双层中,在 D 交换的过程中,这一部份分子的 -NH- 质子被脂膜所保护。而 HIV_{WT} 被 POPC 脂膜保护的程要小得多。这一结果与我们用荧光猝灭法得到的结果一致^[5,6]。

2.2 HIV_{WT} 分子在脂膜中的取向是用偏振红外技术来研究的。我们曾经报道, HIV_{WT} 分子在与脂膜作用之前,主要采取 β -折叠构象;与 POPG 脂膜作用之后,主要构象为 α -螺旋;而与 POPC 脂膜作用后, α -螺旋含量增加, β -折叠含量下降,但主要构象仍为 β -折叠^[5]。由于 HIV_{WT} 对 POPG 脂质体和 POPC 脂质体显示出不同的作用: HIV_{WT} 可以诱导 POPG 脂质体

发生融合,但却不能诱导 POPC 脂质体发生融合^[5]。因此,可以判断,HIV_{WT} 分子的二级结构对于其融合功能的发挥起重要作用。研究 HIV_{WT} 分子中 α -螺旋和 β -折叠与膜平面的相对取向,将有助于进一步了解 HIV - 1 融合肽诱导膜融合的机理。

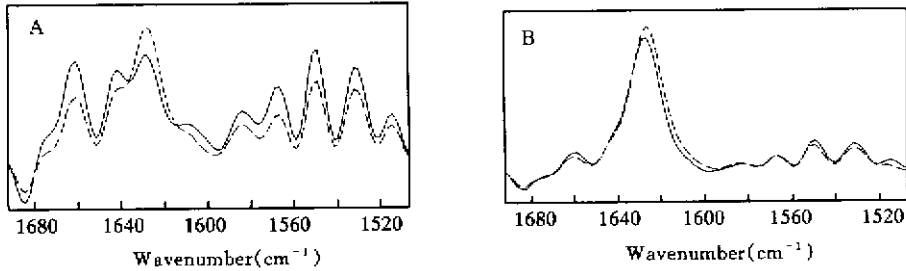


Fig.2 Polarized ATR - FTIR absorbance spectra in the amide I and II regions between 1500 and 1700 cm^{-1} of peptide - liposome films dried from (A) HIV_{WT} in POPG SUV, (B) HIV_{2E} in POPG SUV. Solid line: parallel - polarized light; dashed line: perpendicular - polarized light

图 2 为 HIV_{WT} 与 POPG 和 POPC 小单层脂质体分别作用后的偏振红外光谱。根据式 (2) 和 (3) 分别计算 α -螺旋和 β -折叠的二向色性比及相应的取向。在 POPG 脂质体中,HIV_{WT} 分子中的 α -螺旋与脂双层平面的角度为 $29 \pm 2^\circ$, β -折叠与脂双层平面的夹角为 $25 \pm 1^\circ$ 。在 POPC 脂质体中,HIV_{WT} 分子的 α -螺旋与脂双层平面的角度为 $22 \pm 1^\circ$; β -折叠与脂双层平面的夹角为 $26 \pm 3^\circ$ (见表 2)。

Table 2 Orientation of the secondary structures of HIV_{WT} with respect to the surface of the POPG and POPC bilayers

模型膜	POPG	POPC
α -螺旋取向	$29 \pm 2^\circ$	$22 \pm 1^\circ$
β -折叠取向	$25 \pm 1^\circ$	$26 \pm 3^\circ$

综合以前我们曾经报道的 HIV_{WT} 插膜深度的研究结果^[5],我们认为,HIV_{WT} 必须以一定的深度和角度插入到脂双层的疏水部位,才能起到破坏膜稳定性并诱导融合的作用。

3 讨论

我们以前的研究发现,HIV - 1 gp41 N 端融合肽 HIV_{WT} 和酸性脂质体 POPG 有较强的相互作用,可引起 POPG 膜融合和膜稳定性的破坏,其本身构象也由 β -折叠为主转变为以 α -螺旋为主。HIV_{WT} 和中性脂质体 POPC 的相互作用则较弱,不能引起膜融合,也不能破坏 POPC 膜的稳定性,分子中 α -螺旋的含量虽有所增加,但主要构象仍为 β -折叠。这些现象说明,研究不同电性的脂质体对 HIV_{WT} 结构的不同影响对于我们理解 HIV - 1 融合肽的结构与功能关系有重要意义。

与带负电荷的 POPG 脂质体作用后, 11.9% 的 HIV_{WT} 分子骨架上的 -NH- 质子可被 D 交换, 说明这部份质子位于脂双层的外部。由于方法的局限, 我们尚不能得知 HIV_{WT} 分子的哪一部分位于膜外, 但可以确定, HIV_{WT} 分子的绝大部分应埋于 POPG 脂双层中, 和我们以前用荧光猝灭方法得到的 HIV_{WT} 分子中的苯丙氨酸残基距离 POPG 脂双层中心较近这一结果相呼应, 说明 HIV_{WT} 分子能够比较深地插入到 POPG 脂膜中。

与中性的 POPC 脂质体作用后, HIV_{WT} 的插膜程度则要弱得多。可能因为 POPC 脂双层的表面缺少负电荷, 不能与 HIV_{WT} 分子中的 Arg 残基所带的正电荷形成静电相互作用, 仅仅依靠疏水相互作用不足以使 HIV_{WT} 深入到 POPC 脂双层的内部。

HIV_{WT} 与膜作用后, 两种二级结构所形成的取向的意义, 也值得我们深入探讨。从 FTIR 的结果来看^[5], 当 HIV_{WT} 与这两种脂质体作用后, α -螺旋峰的中心都位于少见的高频区 -1661cm⁻¹, Rothchild 和 Clark 认为这是处于膜内的形状变异的螺旋所具有的特征^[11]。综合 H/D 交换的结果来分析, HIV_{WT} 分子内的 α -螺旋可能都埋在这两种脂质体的脂双层内部。

Wishart 等曾经报道, HIV_{WT} 插膜时, N 端的 5-16 肽段可形成 α -螺旋^[12]。Chang 等人进一步指出, HIV_{WT} 发挥融合功能不可缺少的 8-10 结构单元 (FLG) 是 N 端螺旋的起始位置, 它可深入到 SDS 囊泡的中心^[13,14]。这些结果说明, 形成 α -螺旋是 HIV_{WT} 诱导融合的先决条件, 而只有当 α -螺旋在膜内占据足够的深度并形成一定的角度时, HIV_{WT} 才具有扰乱脂双层结构、诱导膜融合的能力。

偏振红外的结果进一步证明 HIV_{WT} 是以 α -螺旋结构来破坏 POPG 脂膜的稳定性, 而且, HIV_{WT} 分子中的 α -螺旋结构与 POPG 膜平面之间的角度较之与 POPC 膜平面之间的角度要大, 这导致了 POPG 脂双层的负性曲面张力过大、脂膜的稳定性被破坏。另外, HIV_{WT} 分子中的 β -折叠与这两种脂膜平面所成的夹角近似相等, 根据前面的分析, β -折叠的位置应在 HIV_{WT} 分子的 C 端, 而 HIV_{WT} 分子中唯一一个带电荷的氨基酸残基 Arg 正是位于 C 端。因此, 我们推测, HIV_{WT} 分子中的 β -折叠可能起到与脂膜表面结合的作用, 如果这种结合发生时, 有静电作用力的帮助, 那么 HIV_{WT} 就可以顺利地插入到脂膜中心, 否则, 就只能停留在脂膜的浅表面。由于 HIV_{WT} 分子中央的 Phe 残基总是或深或浅地插在脂双层中, 所以, C 端的 β -折叠不可能平行地结合在脂膜表面, 而是要形成一定的倾斜角。至于 β -折叠是否还起到破坏脂双层的作用, 仍有待进一步研究。

综合以前的研究结果, 我们推测, HIV_{WT} 诱导膜融合的机制大致如下: HIV_{WT} 分子的 C 端在疏水作用和静电作用的驱动下以 β -折叠和脂膜结合, 由于 Phe 残基具有较强的疏水侧链, 能进一步插入到脂双层的疏水中心, 带动 N 端能形成 α -螺旋的氨基酸残基倾斜地进入膜内, 从而增加了脂双层的负性曲面张力, 增大两个脂膜之间的接触面, 最终导致膜融合的发生。

参考文献:

- [1] Kowalski M, Potz J, Basiripour L, et al. *Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1* [J]. *Science*, 1987, 237: 1351 - 1355.
- [2] Freed E O, Myers D J and Risser R. *Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41* [A]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [C], 1990, 87: 4650 - 4654.

- [3] Mobley P W, Curtain C C, Kirpatrick A, et al. *The amino-terminal peptide of HIV - 1 glycoprotein 41 lyses human erythrocytes and CD⁺ lymphocytes*[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992,1139:251 - 256.
- [4] Nieva J L, Nir S, Muga A, et al. *Interaction of the HIV - 1 fusion peptide with phospholipid vesicles: Different structural requirements for fusion and leakage*[J]. *Biochemistry*, 1994,33:3201 - 3209.
- [5] 邱阳,沙印林,黄力新,等. HIV - 1 融合肽及其突变体与脂膜的相互作用[J]. 科学通报, 1999,44(23):2532 - 2538.
- [6] 吴曼,林克椿,聂松青,等. HIV - 1 gp41 N 端融合肽与脂膜作用的荧光及单分子层膜研究[J]. 生物物理学报, 1999,15(1):47 - 52.
- [7] Downer N W, Bruchman T J and Hazzarol J H. *Infrared spectroscopic study of photoreceptor membrane and purple membrane*[J]. *J. Biol. Chem.*, 1986,261:3640 - 3647.
- [8] Harrick N J. *Internal reflection spectroscopy*[M]. New York. Interscience Publisher, 1967.
- [9] Navedryk E, Gingold M P and Breton J. *Orientation of gramicidin A transmembrane channel. Infrared dichroism study of gramicidin in vesicles*[J]. *Biophys. J.*, 1982,38:243 - 249.
- [10] Marsh D. *Dichroic ratios in polarized fourier transform infrared for nonaxial symmetry of beta - sheet structures*[J]. *Biophys. J.*, 1997,72:2710 - 2718.
- [11] Rothchild K J and Clark N A. *Anomalous amide I infrared absorption of purple membrane*[J]. *Science*, 1979,204:311 - 312.
- [12] Wishart D S and Sykes B D. *Chemical shift as a tool for structure determination*[J]. *Methods Enzymol.*, 1994,239:363 - 392.
- [13] Chang D K, Cheng S F and Chien W J. *The amino-terminal fusion domain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41 inserts into the sodium dodecyl sulfate micelle primarily as a helix with a conserved glycine at the micelle - water interface*[J]. *J. Virol.*, 1997,71:6593 - 6602.
- [14] Chang D K, Cheng S F and Chien W J. *The FLG motif in the N-terminal region of glycoprotein 41 of human immunodeficiency virus type 1 adopts a type - I beta - turn in aqueous solution and serves as the initiation site for helix formation*[J]. *Eur. J. Biochem.*, 1997,247:896 - 905.

STUDY ON THE MEMBRANE INSERTION DEPTH AND ORIENTATION OF
HIV - 1 FUSION PEPTIDE BY FOURIER TRANSFORMED
INFRARED SPECTROSCOPY

QIU Yang, LIN Ke - chun, NIE Song - qing

(*Department of Biophysics, School of Basic Medical Science,
Peking University, Beijing 100083, China*)

Abstract: To investigate the mechanism of membrane fusion induced by HIV - 1 gp41 N terminal fusion peptide, we studied its membrane insertion state and orientation by H/ D exchange and polarized FTIR in acidic POPG and neutral POPC liposomes, respectively. The results indicate that only 11.9% of backbone amide protons of HIV_{WT} in POPG vesicles undergo H/D exchange, whereas 44.6% amide protons are exchangeable for HIV_{WT} in POPC SUV. The average angles of α -helix and β -strand of HIV_{WT} with respect to the POPG bilayer surface are $29 \pm 2^\circ$ and $25 \pm 1^\circ$, respectively. In the presence of POPC SUV, the average angle between the α -helix of HIV_{WT} and the bilayer surface is $22 \pm 1^\circ$, and the average angle of β -strand of HIV_{WT} is $26 \pm 3^\circ$. The membrane insertion state of HIV_{WT} was discussed.

Key Words: HIV - 1 fusion peptide; FTIR; H/D exchange; Orientation