

Diss. ETH Nr. 8739

**Zum Mechanismus der Interaktion
der Ektodomäne von Influenza Virus Hämagglutinin
mit Liposomen**

**ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH**

vorgelegt von
Cordula Harter
Dipl. Chem.
Universität Freiburg/BRD

geboren am 18. Juli 1957
in Niederschopfheim/BRD

Angenommen auf Antrag von:
Prof. Dr. G. Semenza, Referent
PD Dr. J. Brunner, Korreferent
Prof. Dr. T. Bächli, Korreferent

1988

Separatdrucke:
Biochemistry (1988) 27, 1856-1864
J. Biol. Chem., zum Druck angenommen

6 ZUSAMMENFASSUNG

Hämagglutinin von Influenza Virus ist derjenige Faktor, welcher die Fusion zwischen viraler und Wirtszellmembran induziert. Dieses transmembranäre, trimere Glykoprotein, dessen Monomere jeweils aus zwei disulfidverbrückten Untereinheiten bestehen (HA1 und HA2), erfährt durch schwach saure pH-Bedingungen (z. B. in den Endosomen der Wirtszelle) eine konformationelle Änderung, wobei es lipidbindende und fusionsaktive Eigenschaften erwirbt. Die säureinduzierten Veränderungen betreffen, soweit das beurteilt werden kann, nur die Ektodomäne des Proteins, die im intakten Virus gegen die äussere Umgebung gerichtet ist.

Die Bromelain-solubilisierete Ektodomäne (BHA) diente in dieser Arbeit als Modellprotein zur Untersuchung der molekularen Basis der pH-abhängigen Lipidinteraktion. Die Bindung von Polypeptiddomänen des Bromelain-solubilisierten Hämagglutinin an kleine unilamellare Liposomen wurde durch hydrophobe Photomarkierung eruiert. Hierzu wurden zwei Carben-erzeugende Substanzen eingesetzt: [¹²⁵I]TID, ein kleines, hydrophobes Molekül und [³H]PTPC/11, ein neues Lecithinanalogen.

[³H]PTPC/11 wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Ziel entwickelt, ein photoaktivierbares, radioaktives Phospholipid zur Verfügung zu haben, das nur langsam zwischen Membranen austauscht und geeignet ist, Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden, wie sie der Membranfusion zugrunde liegen, zu studieren.

Photomarkierung von BHA in Gegenwart von Eilecithinliposomen und [¹²⁵I]TID resultierte in exklusiver Markierung der BHA2 Untereinheit. Der Einbau an Radioaktivität in diese Untereinheit war bei pH 5 etwa doppelt so stark wie bei pH 7. Dieses Resultat weist darauf hin, dass das Polypeptid pH-abhängige, hydrophobe Eigenschaften besitzt. Um mögliche Unterschiede aufzuzeigen zwischen der säureinduzierten und der pH-neutralen hydrophoben Markierung, und um klar die Insertion von Polypeptiden in die Membran zu demonstrieren, wurden weitere Experimente mit [³H]PTPC/11 durchgeführt. Im Gegensatz zu [¹²⁵I]TID, wurde [³H]PTPC/11 ausschliesslich bei pH 5 in die BHA2

Untereinheit eingebaut. Dieser Befund war ein direkter Beweis für die säureinduzierte Penetration von Segmenten dieser Untereinheit in die Lipiddoppelschicht. Diese Markierung war temperaturabhängig, aber unabhängig von der Lipidzusammensetzung der Liposomen. Die Resultate der [³H]PTPC/11-Markierungen liessen auch den Schluss zu, dass der Einbau von [¹²⁵I]TID unter neutralen pH-Bedingungen wahrscheinlich in der Markierung kryptischer hydrophober, Proteinnischen begründet liegt.

Fragmentierung von [¹²⁵I]TID- und [³H]PTPC/11-markiertem, amphipatischem BHA2 wiesen einerseits auf ähnliche Verteilung und Zugänglichkeit beider Reagenzien in der Membran und andererseits auf eine spezifische Verteilung in der Polypeptidkette hin. Hiermit war die Voraussetzung gegeben, anhand der [¹²⁵I]TID-Markierung, membranbindende Polypeptide und individuell markierte Aminosäuren zu bestimmen. Die meisten Fragmente konnten durch partielle Mikrosequenzanalyse am Gasphasensequenzator identifiziert werden. Durch die Ausarbeitung einer speziellen experimentellen Strategie und Edman Abbau markierter Fragmente wurde gefunden, dass einzig das Segment von Aminosäure 1-21 der BHA2 Untereinheit hydrophob markiert war. Dieses Peptid interagiert höchst wahrscheinlich in α -helikaler Anordnung mit der Liposomenmembran.

6 SUMMARY

Hemagglutinin is the factor of influenza virus mediating fusion between the viral and host cell membrane. This trimeric transmembrane glycoprotein, each monomer consisting of two disulfide-linked subunits HA1 and HA2, undergoes an acid-induced conformational transition (e.g. in the endosomes of the host cell) thereby acquiring lipid binding and fusion active properties. There exists essential evidence that the pH-dependent changes occur in the ectodomain, that part of the protein located towards the outer environment in intact viruses.

The bromelain-solubilized ectodomain (BHA) served in this work as a model protein to study the molecular basis of the pH-dependent lipid interaction. The binding of polypeptide domains of the bromelain-solubilized hemagglutinin to the lipid bilayer of small unilamellar liposomes has been investigated by hydrophobic photolabeling using two carbene-generating probes, [¹²⁵I]TID, a small, lipid-soluble molecule and [³H]PTPC/11, a new lecithin analogue.

[³H]PTPC/11 has been developed during this work, with the goal being to obtain a photoactivatable, radioactive phospholipid exchanging only slowly between membranes. This phospholipid analogue can serve as a useful tool to study membrane phenomena such as fusion.

Photolabeling of BHA in the presence of egg lecithin liposomes and [¹²⁵I]TID resulted in label incorporation exclusively into the BHA2 subunit. At pH 5, label incorporation was about two times stronger than at pH 7, indicating that this polypeptide exhibits pH-dependent hydrophobic properties. To conclusively demonstrate possible differences between hydrophobic labeling under acidic versus neutral conditions, and to clearly show the insertion of polypeptide segments into the lipid bilayer further experiments with [³H]PTPC/11 were carried out. In contrast to [¹²⁵I]TID, [³H]PTPC/11 was incorporated solely at pH 5 into the BHA2 subunit, directly demonstrating the penetration of segments of BHA2 into the bilayer. This acid-induced labeling was temperature-dependent, but independent from the lipid composition of the liposomes. The [³H]PTPC/11-labeling experiments also allowed the conclusion that the incorporation of

[¹²⁵I]TID under neutral pH-conditions resulted most probably from the labeling of cryptic hydrophobic protein pockets.

Fragmentation of [¹²⁵I]TID- and [³H]PTPC/11-labeled, amphipathic BHA2 led to the conclusions that both reagents were similarly distributed and accessible within the membrane, and that only defined segments of the polypeptide chain were labeled. It was therefore possible to analyse membrane-binding polypeptides and individual labeled amino acid residues by [¹²⁵I]TID-labeling. Most of the fragments could be identified by partial microsequence analysis using a gas-phase sequenator. Elaborating a special experimental methodology using Edman degradation of hydrophobically labeled fragments, it was found that solely the aminoterminal segment, comprising amino acid residues 1-21 of the BHA2 subunit, was hydrophobically labeled. This peptide adopts, in all likelihood, an α -helical structure upon binding to membranes.