УДК 539.1

<https://doi.org/10.17721/1812-5409.2021/2.17>

Соловійов Д.В.¹, д.ф.-м.н., н.с.,
Іваньков О.І.¹, к.ф.-м.н., м.н.с.,
Булавін Л.А.², д.ф.-м.н., проф.,
Дорошенко І.Ю.², д.ф.-м.н., ст.досл., пров.н.с.,
Онук М.М.², аспірант,

Дослідження структурних особливостей взаємодії S-протеїну SARS-CoV-2 з ліпідними мембранами методом малокутового розсіювання нейтронів

¹Інститут проблем безпеки АЕС НАН України,
03028, м. Київ, вул. Лисогірська, 12

²Київський національний університет імені
Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул.
Володимирська, 64/13

e-mail: dimkaupml@gmail.com,
aleksandr.ivankov@gmail.com,
bulavin221@gmail.com, dori11@ukr.net,
MartaOn379@gmail.com

D.V. Solovyov¹, Dr. Sci.,
O.I. Ivankov¹, Ph.D.,
L.A. Bulavin², Dr. Sci., Prof.
I.Yu. Doroshenko², Dr. Sci.,
M.M. Onuk², Ph.D student,

Investigation of structural features of SARS- CoV-2 S-protein interaction with lipid membranes by small-angle neutron scattering

¹Institute for Safety Problems of NPP of the NAS of
Ukraine, 03028, Kyiv, 12 Lysohirska Str,

²Taras Shevchenko National University of Kyiv,
01601, Kyiv, 64/13 Volodymyrska Str.

e-mail: dimkaupml@gmail.com,
aleksandr.ivankov@gmail.com,
bulavin221@gmail.com, dori11@ukr.net,
MartaOn379@gmail.com

Методом малокутового розсіювання нейтронів проведено дослідження впливу S-протеїну коронавірусу SARS-CoV-2 на структурні параметри модельної ліпідної мембрани на системах диміристоїлфосфатидилхоліну (ДМФХ) з домішками холестерину та мелатоніну. Висунуто припущення, що збільшення концентрації мелатоніну в мембрані запобігає взаємодії коронавірусного S-протеїну з ліпідною мембраною клітини. За присутності домішок холестерину в системі взаємодія ліпідної мембрани з активною частиною S-протеїну відбувається залежно від фазового стану ліпідів: у випадку гелі-фази взаємодія не відбувається, а у рідкокристалічній фазі додавання RBD SARS-CoV-2 в систему призводить до зменшення товщини мембрани.

Ключові слова: S-протеїн, ліпідна мембрана, малокутове розсіювання нейтронів, холестерин, SARS-CoV-2.

The effect of SARS-CoV-2 coronavirus S-protein on the structural parameters of the model lipid membrane on dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) systems with cholesterol and melatonin impurities was studied by the method of small angle neutron scattering. It is shown that an increase in the concentration of melatonin in the lipid membrane leads to a decrease in the thickness of the lipid bilayer, and an increase in the concentration of cholesterol leads to an increase in it. It has been suggested that increasing the concentration of melatonin in the membrane prevents the interaction of coronaviral S-protein with the lipid membrane of the cell. In the presence of cholesterol impurities in the system, the interaction of the lipid membrane with the active part of the S-protein occurs depending on the phase state of the lipid. Thus, when the lipid is in the gel phase (at 10 ° C), the active part of the S-protein does not change the structural parameters of the lipid bilayer, i.e. the interaction between the lipid membrane and the active part of the S-protein does not occur. At 37 ° C, when the lipid is in the liquid crystalline phase, the addition of RBD SARS-CoV-2 in the system DMPC / 30% Cholesterol / D₂O leads to a decrease in membrane thickness, indicating the interaction of S-protein with the membrane.

KeyWords: S-protein, lipid membrane, small-angle neutron scattering, cholesterol, SARS-CoV-2.

Статтю представив академік НАН України, д.ф.-м.н., проф. Булавін Л.А.

Вступ

Ліпідна мембрана є однією з найважливіших складових будь-якої клітини. Біологічні мембрани мають значну композиційну та фазову неоднорідність завдяки сотням хімічно різних

компонентів. Компонентний склад мембрани визначає її властивості, а також впливає на такі процеси життєдіяльності як мембранний транспорт, передача сигналів, поділ клітин, ендоцитоз, латеральна дифузія білкових та

ліпідних молекул та інші [1, 2]. Саме тому протягом останніх років було прикладено великі зусилля для дослідження структури та динаміки ліпідного бішару в контексті розуміння функціональних механізмів тих процесів, що відбуваються на поверхні мембрани [3]. Велика кількість робіт присвячена дослідженню зміни властивостей ліпідних мембран при додаванні в них різноманітних домішок, серед яких окремо виділяють холестерин та мелатонін [4, 5]. Холестерин відіграє роль своєрідного модифікатора ліпідної фази. Збільшення його кількості в мембрані призводить до більш щільної упаковки молекул в ліпідному бішарі, а також до формування ліпідних рафтів (доменів) в мембрані. В літературі наведено дані, що відзначають певну роль ліпідних рафтів у процесах зв'язування коронавірусів з клітиною [6, 7]. У деяких випадках наявність рафтів є необхідною умовою для проникнення вірусу в клітину (наприклад, всередині рафту міститься мембранний білок, який зв'язується з вірусом), але водночас відомі випадки (вірус мишачого гепатиту), коли наявність рафтів ускладнює проходження вірусу в клітину, хоча механізм такого впливу залишається невідомим.

Експериментальна частина

У нашій роботі для визначення впливу S-протейну коронавірусу SARS-CoV-2 на структурні параметри модельної ліпідної мембрани було проведено дослідження методом малокутового розсіяння нейтронів (МКРН) на системах диміристоїлфосфатидилхоліну (ДМФХ, назва за IUPAC: (2R)-2,3-Bis(tetradecanoyloxy)propyl-2-(trimethylazaniumyl)ethyl phosphate), що містять домішки холестерину або мелатоніну. Експериментальні дослідження проводились для наступних систем: водний розчин ДМФХ, ДМФХ + 15% мелатоніну (або холестерину), ДМФХ + 30% мелатоніну (або холестерину), ДМФХ + 30% мелатоніну (або холестерину) + RBD SARS-CoV-2. Оскільки фазовий стан ліпідної системи залежить від температури, вимірювання проводились при двох температурах: 10 °C (гель фаза) та 37 °C (рідкокристалічна фаза). Як модель ліпідної мембрани розглядалась одношарова ліпідна везикула, основними структурними параметрами якої є товщина ліпідного бішару та внутрішній радіус везикули.

В результаті аналізу експериментально отриманих кривих малокутового розсіяння нейтронів на розчинах ліпідних везикул з домішками мелатоніну було визначено товщину

ліпідного бішару та внутрішній радіус везикули для кожної з досліджуваних систем. Отримані структурні параметри наведені в Таблиці 1.

Таким чином, збільшення концентрації мелатоніну в ліпідній мембрані призвело до зменшення товщини ліпідного бішару. При додаванні RBD SARS-CoV-2 товщина ліпідного бішару продовжує зменшуватись. Крім того, з наведених даних видно, що при 10°C товщина ліпідного бішару більша, ніж при 37°C для усіх розглянутих систем.

Аналогічні дослідження були проведені для систем з додаванням холестерину. Отримані дані наведено в Таблиці 2. Видно, що збільшення концентрації холестерину в ліпідній системі призводить до збільшення товщини ліпідного бішару незалежно від фазового стану ліпідної системи.

На Рис. 1 представлено графік зміни товщини ліпідного бішару в залежності від доданих домішок в розчин ДМФХ/D₂O згідно з результатами експериментальних досліджень, наведених в Таблицях 1 та 2.

Рис. 1. Залежність відносної товщини бішару везикули від концентрації домішок холестерину або мелатоніну, доданих у систему. Значення нормовані відносно системи чистого розчину ДМФХ у D₂O за даної температури.

Як показали проведені експериментальні дослідження, додавання активної частини S-протейну SARS-CoV-2 в ліпідну систему ДМФХ/30% Мелатонін/D₂O практично не змінило структурних параметрів ліпідного бішару при обох температурах у межах похибки експерименту. Оскільки мелатонін у ліпідному бішарі локалізується в області ліпідних голів, то він може заважати проникненню в цю область

молекулам S-протеїну. Таким чином можна стверджувати, що збільшення концентрації мелатоніну в мембрані запобігає взаємодії коронавірусного S-протеїну з ліпідною мембраною.

На відміну від систем з додаванням мелатоніну, за присутності домішок холестерину

в системі взаємодія ліпідної мембрани з активною частиною S-протеїну вже відбувається, причому ця взаємодія різна в залежності від фазового стану ліпиду. Так, коли ліпід знаходиться в гель фазі (за температури 10°C), то активна частина S-протеїну

Таблиця 1

Товщини ліпідних бішарів та внутрішні радіуси везикул, визначені в результаті аналізу кривих малокутового розсіювання нейтронів

	Температура, °C	Внутрішній радіус везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å
ДМФХ/D ₂ O	10	240	42,6 ± 0,1
	37	267	40,2 ± 0,1
ДМФХ/15% Мел/D ₂ O	10	236	40,1 ± 0,1
	37	249	36,0 ± 0,1
ДМФХ/30% Мел/D ₂ O	10	230	39,6 ± 0,1
	37	252	35,8 ± 0,1
ДМФХ/30% Мел/D ₂ O + RBD SARS-CoV-2	10	230	39,3 ± 0,1
	37	259	35,6 ± 0,1

Таблиця 2

Товщини ліпідних бішарів та внутрішні радіуси везикул, визначені в результаті підгонки кривих малокутового розсіювання нейтронів

	Температура, °C	Внутрішній радіус везикули, Å	Товщина ліпідного бішару, Å
ДМФХ/D ₂ O	10	240	42,6 ± 0,1
	37	267	40,2 ± 0,1
ДМФХ/15% Хол/D ₂ O	10	270	43,5 ± 0,1
	37	282	40,0 ± 0,1
ДМФХ/30% Хол/D ₂ O	10	235	44,6 ± 0,1
	37	239	43,6 ± 0,1
ДМФХ/30% Хол/D ₂ O + RBD SARS-CoV-2	10	250	44,6 ± 0,1
	37	233	41,7 ± 0,1

не змінює структурних параметрів ліпідного бішару. Це може означати, що взаємодія між ліпідною мембраною та активною частиною S-протеїну не відбувається. В свою чергу, за температури 37°C, коли ліпід перебуває в рідкокристалічній фазі, додавання RBD SARS-CoV-2 в систему ДМФХ/30% Холестерин/D₂O призводить до зменшення товщини мембрани, що свідчить про наявність взаємодії S-протеїну з мембраною. Відомо, що збільшення температури ліпідної системи призводить до порушення ступеня упаковки ліпідних молекул в мембрані. При цьому збільшується відстань між ліпідними головами, та з'являються порожнини, куди може проникати білкова молекула.

Висновки

Збільшення концентрації мелатоніну в мембрані запобігає взаємодії коронавірусного S-протеїну з ліпідною мембраною клітини.

За присутності домішок холестерину в системі взаємодія ліпідної мембрани з активною частиною S-протеїну відбувається залежно від фазового стану ліпиду: у випадку, коли ліпід знаходиться в гель-фазі взаємодія між ліпідною мембраною та активною частиною S-протеїну не відбувається; у випадку рідкокристалічної фази додавання RBD SARS-CoV-2 в систему ДМФХ/30% Холестерин/D₂O призводить до зменшення товщини мембрани.

Список використаних джерел

References

1. Elson E. L. Phase separation in biological membranes: integration of theory and experiment / E. L. Elson, E. Fried, J.E. Dolbow, G.M. Genin // *Annual review of biophysics*. – 2010. – №39. – С. 207-226.
2. Lingwood D. Lipid rafts as a membrane-organizing principle / D. Lingwood, K. Simons // *Science*. – 2010. – Vol. 327. – №5961. – С. 46-50.
3. Pabst G. Liposomes, lipid bilayers and model membranes from basic research to application preface / G. Pabst, N. Kucherka, M.P. Nieh, J. Katsaras // *Liposomes, lipid bilayers and model membranes from basic research to application preface*. – 2014. – V. 2014. – P. IX- X.
4. Severcan F. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes - evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry / F. Severcan, I. Sahin, N. Kazanci // *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. – 2005. – Vol. 1668. – №2. – С. 215-222.
5. Bongiorno D. Localization and interactions of melatonin in dry cholesterol/lecithin mixed reversed micelles used as cell membrane models / D. Bongiorno, L. Ceraulo, M. Ferrugia, F. Filizzola, A. Ruggirello, V. T. Liveri // *Journal of Pineal Research*. – 2005. – Vol. 38. – №4. – С. 292-298.
6. Choi K.S. Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release / K. S. Choi, H. Aizaki, M. M. Lai // *J. Virol*. – 2005. – Vol. 79. – №15. – С. 9862-9871.
7. Thorp E.B. Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry / E.B. Thorp, T.M. Gallagher // *J. Virol*. – 2004. – Vol. 78 (6). – P. 2682-2692.
1. ELSON, E.L., FRIED, E., DOLBOW, J.E. and GENIN, G.M. (2010) Phase separation in biological membranes: integration of theory and experiment. *Annual review of biophysics*. 39. p. 207-226.
2. LINGWOOD, D. and SIMONS, K. (2010) Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science*, 327(5961). p. 46-50.
3. PABST, G., KUCHARKA, N., NIEH, M.P., and KATSARAS, J. (2014). Liposomes, lipid bilayers and model membranes from basic research to application preface, *Liposomes, lipid bilayers and model membranes from basic research to application preface* 2014, p. ix – x.
4. SEVERCAN, F., SAHIN, I., and KAZANCI, N. (2005). Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes - evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1668(2). p. 215-222.
5. BONGIORNO, D., CERAULO, L., FERRUGIA, M., FILIZZOLA, F., RUGGIRELLO, A., and LIVERI, V.T. (2005) Localization and interactions of melatonin in dry cholesterol/lecithin mixed reversed micelles used as cell membrane models. *Journal of Pineal Research*. 38(4). p. 292-298.
6. CHOI, K.S., AIZAKI, H., and LAI, M.M. (2005) Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release. *J Virol*. 79(15). p. 9862-9871.
7. THORP, E.B., and GALLAGHER T.M. (2004) Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry. *J Virol*. 78 (15). p. 2682-2692.

Надійшла до редколегії 25.07.2021