

Paulina Borkowska

**Oddziaływanie pomiędzy peptydem fuzyjnym a domeną
transbłonową hemaglutyniny**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Biofizyki Komórki
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
Dr hab. Remigiusz Worch

Warszawa, 2025

Badania przedstawione w niniejszej pracy zostały zrealizowane dzięki finansowaniu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu SONATA BIS 2018/30/E/NZ1/00257



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Chciałabym serdecznie podziękować:

Mojemu promotorowi, dr hab. Remigiuszowi Worchowi,
za opiekę naukową, przekazaną wiedzę,
naukowe dyskusje oraz pomoc w realizacji badań.

Prof. Jakubowi Włodarczykowi za możliwość
wykonania badań w Pracowni Biofizyki Komórki.

Koleżankom i kolegom z Pracowni Biofizyki Komórki,
a w szczególności grupie badawczej: Szymonowi, Bartkowi i Helenie
za pomoc i przyjazną atmosferę.

Moim Rodzicom, rodzinie oraz przyjaciółce Wiktorii
za wsparcie w trakcie trwania doktoratu.

Spis treści

Spis treści	5
Wykaz skrótów.....	7
Streszczenie	9
Abstract.....	11
1. Wstęp	13
1.1. Wirus grypy	13
1.1.1. Charakterystyka wirusa grypy	13
1.1.2. Cykl replikacyjny wirusa grypy	14
1.2. Hemaglutynina	16
1.2.1. Struktura hemaglutyniny	16
1.2.2. Funkcje podjednostek HA1 oraz HA2	18
1.2.3. Modyfikacje potranslacyjne hemaglutyniny	18
1.3. Błona lipidowa.....	19
1.3.1. Budowa dwuwarstwy lipidowej.....	19
1.3.2. Skład lipidowy błon komórkowych.....	20
1.4. Proces fuzji wirusowej.....	22
1.4.1. Fuzja wirusa grypy	23
1.4.2. Rola peptydu fuzyjnego (FP) w fuzji wirusa grypy	24
1.4.3. Rola domeny transbłonowej (TMD) w fuzji wirusa grypy	27
1.4.4. Rola acetylacji oraz ogona cytoplazmatycznego (CT) w fuzji	29
1.5. Rola składu lipidowego w fuzji wirusa grypy.....	31
1.5.1. Rola cholesterolu w fuzji wirusa grypy	31
1.5.2. Lokalizacja hemaglutyniny w błonie komórkowej	31
1.5.3. Rola TMD i acetylacji w lokalizacji hemaglutyniny	32
1.6. Metody badawcze używane w badaniu błony lipidowej	34
1.6.1. Mikroskopia FRET-FLIM	34
1.6.2. Spektroskopia korelacji fluorescencji FCS	36
1.6.3. Dynamiczne rozpraszanie światła DLS	39
2. Cele pracy.....	41
3. Materiały i metody	42
3.1. Stosowane odczynniki, bufory oraz lipidy	42
3.2. Stosowane peptydy oraz cząstki wirusopodobne VLP	44
3.3. Preparatyka liposomów i dwuwarstw lipidowych	46
3.3.1. Liposomy GUV.....	46
3.3.2. Liposomy LUV	46

3.3.3.	Liposomy SUV	46
3.3.4.	Dwuwarstwa lipidowa typu SLB	47
3.3.5.	Pomiar wielkości cząstek za pomocą DLS/MADLS	47
3.4.	Testy aktywności peptydów	48
3.4.1.	Badanie wbudowania peptydów w błonę za pomocą FRET	48
3.4.2.	Wygazanie fluorescencji tryptofanu/tyrozyny za pomocą akrylamidu	48
3.4.3.	Test aktywności fuzyjnej - mieszania lipidów (ang. <i>lipid mixing</i>)	50
3.4.4.	Test aktywności błonowej - wyciekanie barwnika z liposomów (ang. <i>leakage assay</i>)	50
3.4.5.	Kinetyka aktywności błonowej - wyciekania barwnika z liposomów	51
3.5.	Obrazowanie mikroskopowe	52
3.5.1.	Obrazowanie mikroskopowe FLIM	52
3.5.2.	Pomiary mobilności dwuwarstwy lipidowej za pomocą FCS	53
3.5.3.	Obrazowanie mikroskopowe FLIM-FRET	55
3.5.4.	Analiza statystyczna	56
4.	Wyniki	57
4.1.	Test wbudowania peptydów TMD w błonę lipidową	57
4.2.	Ocena głębokości wbudowania peptydów TMD w błonę lipidową	59
4.3.	Aktywność błonowa peptydów	62
4.4.	Kinetyka aktywności błonowej peptydów	65
4.5.	Aktywność peptydów powodująca hemifuzję liposomów	68
4.6.	Wpływ peptydów na uporządkowanie lipidów	71
4.7.	Optymalizacja przygotowania błony SLB	77
4.8.	Badanie aktywności fuzyjnej cząstek VLP	82
5.	Dyskusja	86
5.1.	Lokalizacja oraz aktywność FP i TMD w błonie lipidowej	87
5.2.	Różnice pomiędzy TMD pochodzącymi z podtypu H1 a H3 hemaglutyniny	93
6.	Podsumowanie i wnioski	96
7.	Literatura	97
	Załączniki	115
	Osiągnięcia naukowe	116

Wykaz skrótów

CCM	motyw wiążący cholesterol (ang. <i>cholesterol consensus motif</i>)
CT	ogon cytoplazmatyczny (ang. <i>cytoplasmic tail</i>)
DLS	dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>dynamic light scattering</i>)
E11A	peptyd fuzyjny z mutacją reszty aminokwasowej w miejscu 11
FCS	spektroskopia korelacji fluorescencji (ang. <i>fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FP	peptyd fuzyjny (ang. <i>fusion peptide</i>)
FP WT	peptyd fuzyjny dzikiego typu (ang. <i>fusion peptide wild type</i>)
FLIM	mikroskopia czasów życia fluorescencji (ang. <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>)
FRET	fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii (ang. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GUV	olbrzymie jednowarstwowe liposomy (ang. <i>giant unilamellar vesicle</i>)
H1	syntetyczny peptyd odpowiadający domenie transbłonowej hemaglutyniny podtypu H1
H1long	syntetyczny peptyd odpowiadający domenie transbłonowej hemaglutyniny podtypu H1, wydłużony o reszty aminokwasowe znajdujące się przed sekwencją transbłonową
H1-TMD-H1	cząstki wirusopodobne zawierające hemaglutyninę podtypu H1
H1-TMD-H3	cząstki wirusopodobne zawierające hemaglutyninę podtypu H1, z zamienioną domeną transbłonową na sekwencję odpowiadającą podtypowi H3
H3	syntetyczny peptyd odpowiadający domenie transbłonowej hemaglutyniny podtypu H3
H3long	syntetyczny peptyd odpowiadający domenie transbłonowej hemaglutyniny podtypu H3, wydłużony o reszty aminokwasowe znajdujące się przed sekwencją transbłonową
HA	hemaglutynina
HA0	prekursor hemaglutyniny
HA1	podjednostka pierwsza hemaglutyniny
HA2	podjednostka druga hemaglutyniny
LUV	duże liposomy (ang. <i>large unilamellar vesicles</i>)
MADLS	wielokątowe dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>multi-angle dynamic light scattering</i>)
POPC	1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3- fosfatydylocholina

SLB	dwuwarstwa lipidowa na podłożu (ang. <i>supported lipid bilayer</i>)
SUV	małe liposomy (ang. <i>small unilamellar vesicles</i>)
TMD	domena transbłonowa (ang. <i>transmembrane domain</i>)
VLP	cząstki wirusopodobne (ang. <i>virus-like particles</i>)
W14A	peptyd fuzyjny z mutacją reszty aminokwasowej w miejscu 14

Streszczenie

Hemaglutynina (HA) jest jednym z głównych białek powierzchniowych wirusa grypy typu A. W trakcie dojrzewania HA jej prekursor HA0 ulega cięciu na podjednostki HA1 oraz HA2. Podjednostki pełnią różne funkcje: HA1 odpowiada za wiązanie receptora na powierzchni komórki gospodarza, natomiast HA2 jest zaangażowana w fuzję wirusa w późnych endosomach. N-końcowy fragment HA2, tzw. peptyd fuzyjny FP (ang. *fusion peptide*), eksponowany w wyniku niskiego pH w późnych endosomach, bierze udział w fuzji błon lipidowych. Z kolei C-końcowy fragment HA2 stanowi domena transbłonowa TMD (ang. *transmembrane domain*), odpowiedzialna za zakotwiczenie białka w błonie, a także prawdopodobnie uczestnicząca w fuzji. Dotychczas opisano 18 podtypów HA, sklasyfikowanych w dwóch grupach filogenetycznych na podstawie sekwencji aminokwasowej. Obecnie w populacji ludzkiej najczęściej występują wirusy grypy zawierające HA podtypu H1 (grupa 1) oraz H3 (grupa 2). Sekwencja FP jest zachowana w toku ewolucji, natomiast sekwencja TMD znacząco różni się wśród podtypów. Podczas gdy rola FP w procesie fuzji została dobrze scharakteryzowana, funkcja TMD pozostaje wciąż słabo poznana. Pokazano, że do pełnej fuzji otoczki wirusowej z błoną późnych endosomów obecność TMD jest niezbędna. Niektóre badania sugerują, że oddziaływanie pomiędzy FP i TMD umożliwia pełną fuzję. Jednak możliwość tego oddziaływania pozostaje kwestią sporną w literaturze.

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie oddziaływania pomiędzy FP i TMD. Aby to zrealizować przeprowadzono serię eksperymentów z użyciem syntetycznych peptydów oraz pełnej długości HA. Zastosowano peptydy odpowiadające sekwencjom aminokwasowym FP i TMD z podtypów H1 i H3. Wykorzystano syntetyczne peptydy odpowiadające TMD w dwóch wersjach: krótkiej (nazywane dalej jako H1, H3) oraz wydłużonej (nazywane dalej jako H1long, H3long). Dłuższe wersje zawierały dodatkowe reszty aminokwasowe mogące oddziaływać z cholesterolem. Wykorzystano również cząstki wirusopodobne VLP (ang. *virus-like particle*) zawierające pełnej długości HA podtypu H1 (H1-TMD-H1) lub HA podtypu H1 z wymienioną domeną TMD na pochodzącą z podtypu H3 (H1-TMD-H3). Eksperymenty prowadzono z użyciem liposomów oraz dwuwarstwy lipidowej na podłożu SLB (ang. *supported lipid bilayer*) o różnym składzie lipidowym. Wykorzystywano pojedyncze peptydy oraz mieszanki peptydowe FP:TMD do zbadania synergicznego działania peptydów w błonie. Praca miała na celu biofizyczne scharakteryzowanie ich aktywności w błonie. Do zbadania aktywności błonowej oraz fuzyjnej peptydów wykorzystano serię eksperymentów fluorescencyjnych. Zbadano także wpływ peptydów na uporządkowanie lipidów (ang. *membrane lipid order*) za pomocą mikroskopii czasów życia fluorescencji FLIM (ang.

fluorescence lifetime imaging microscopy) z użyciem barwnika wrażliwego na uporządkowanie błony. W końcowym etapie przeprowadzano test na aktywność fuzyjną cząstek wirusopodobnych VLP z błoną SLB za pomocą metody FLIM-FRET. Metoda ta łączy mikroskopię czasów życia fluorescencji z fluorescencyjnym rezonansem przeniesienia energii (ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy-fluorescence resonance energy transfer*).

Przeprowadzone badania wykazały brak oddziaływania pomiędzy FP i TMD. Wyniki pokazały jednak różnice w działaniu TMD z dwóch różnych grup filogenetycznych: TMD z H1 powodowała zwiększenie uporządkowania lipidów, natomiast z H3 jej spadek. Ponadto zaobserwowano, że TMD może wpływać na aktywność fuzyjną białka pełnej długości. W eksperymentach z VLP zaobserwowano tendencje sugerujące, że H1-TMD-H3 wykazywał wyższą aktywność fuzyjną niż H1-TMD-H1.

Abstract

Hemagglutinin (HA) is one of the major surface proteins of the influenza A virus. During maturation, HA0 precursor is cleaved into two subunits, HA1 and HA2 subunits. They perform different functions: HA1 is responsible for the receptor binding at the host cell surface, while HA2 mediates viral fusion in the late endosomes. The N-terminal part of the HA2 subunit acts as a fusion peptide (FP). Under low pH conditions in the late endosomes, FP is exposed and initiates fusion. The C-terminal part of the HA2 is transmembrane domain (TMD), which anchors the protein in the membrane and possibly performs an important function in the fusion process. So far, 18 subtypes of HA have been identified, classified into two phylogenetic groups based on the amino acid sequence of the protein. Currently, the most prevalent subtypes circulating in the human population are H1 (group 1) and H3 (group 2). While FP sequences are conserved between subtypes, TMD sequences diverge significantly. Although the role of FP in the fusion process has been well characterized, the function of TMD still remains poorly understood. It has been shown that the presence of TMD is essential for the complete fusion process of the viral envelope with late endosomal membranes. Some studies suggest that an interaction between FP and TMD is responsible for full fusion. However, the presence of this interaction remains a contentious issue in the literature.

The main aim of the dissertation was to examine the potential interaction between FP and TMD. To examine this, series of experiments with peptides and full-length HA were carried out. Peptides with amino acids sequences corresponding to FP and TMD from H1 and H3 subtypes were used in the studies. Synthetic peptides corresponding to TMD were utilized in two versions: shorter (H1, H3) and longer (H1long, H3long). The longer versions were extended with amino acids that can interact with cholesterol. In addition, virus-like particles (VLP) were used, with full-length HA of the H1 subtype (H1-TMD-H1) or HA of the H1 subtype with the TMD fragment replaced by that from the H3 subtype (H1-TMD-H3). Liposomes and supported lipid bilayers (SLB) with different lipid compositions were utilized as artificial lipid membrane models. To examine synergic interaction between peptides, individual peptides and FP:TMD mixtures were used. The work aimed to biophysically characterize the action of the peptides in the membrane. To measure the fusion activity, a series of fluorescence experiments was performed. Moreover, membrane lipid order was investigated by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) using a dye sensitive to membrane lipid order. Finally, the fusion activity test of VLP with SLB was carried out using FLIM-FRET (fluorescence lifetime imaging microscopy-fluorescence resonance energy transfer).

The research showed a lack of interaction between FP and TMD. However, differences were observed in the membrane activity of TMDs from divergent phylogenetic groups. While

H1 induced membrane ordering, H3 caused a decrease in the lipid order. Moreover, the results suggest that TMD affects the fusion activity of HA. Moreover, it was observed that TMD may influence the fusion activity of the full-length protein. The experiments with VLP revealed a tendency suggesting that H1-TMD-H3 exhibits higher fusion activity than H1-TMD-H1.

1. Wstęp

1.1. Wirus grypy

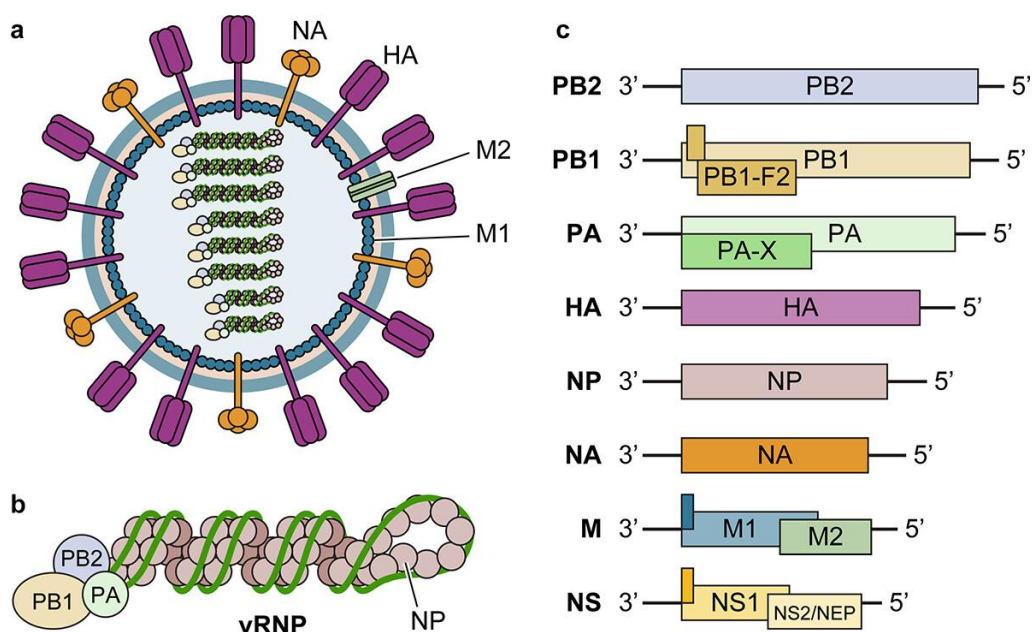
1.1.1. Charakterystyka wirusa grypy

Wirus grypy infekuje szeroki zakres gatunków, w tym ptaki oraz ponad 20 ssaków, między innymi ludzi, świnie, psy i konie. Wirusy grypy należą do wirusów otoczkowych, ich wiriony przyjmują kolisty lub wydłużony kształt o średnicy około 100 nm lub długości 300 nm. Dotychczas wyróżniono cztery typy wirusa grypy: wirus grypy typu A, B, C i D, które stanowią część rodziny ortomyksowirusów. Wśród wirusów grypy infekujących ludzi znajdują się typy A, B oraz C, przy czym grypa typu A wykazuje największą zakaźność. Typ ten dzieli się na podtypy ze względu na dwa główne białka powierzchniowe: hemaglutyninę (HA) oraz neuraminidazę (NA) [Bouvier & Palese, 2008]. Do tej pory wyróżniono 18 podtypów hemaglutyniny oraz 9 podtypów neuraminidazy [Wu i wsp., 2014, McAuley i wsp., 2019]. W populacji ludzkiej cyrkulują tylko trzy podtypy HA (H1, H2, H3) i dwa podtypy NA (N1 i N2). Obecnie podtypy H1N1 oraz H3N2 są sprawcami endemii. Niektóre z podtypów (H5, H6, H7, H9, H10), których głównymi gospodarzami są ptaki, mogą sporadycznie wywoływać zachorowania wśród ludzi, ale nie przenoszą się między nimi. Mutacje w ptasich podtypach wirusa grypy mogą umożliwić transmisję pomiędzy ssakami, co stanowi potencjalne zagrożenie dla ludzi [Herfst i wsp., 2012]. Podobna sytuacja ma miejsce z wirusami wywołującymi świńską grypę [Ma, 2020].

Oba białka powierzchniowe wirusa grypy spełniają ważne funkcje w procesie infekcji. Zadaniem hemaglutyniny jest rozpoznawanie receptora na powierzchni komórki oraz fuzja wirusa z późnymi endosomami. Natomiast neuraminidaza odpowiada za uwolnienie wirusa z komórki. Oprócz neuraminidazy i hemaglutyniny w otoczkę wirusa wbudowane jest białko macierzy 2 (M2), które pełni funkcję kanału jonowego (Rycina 1a). Wewnętrzna część otoczki lipidowej jest otoczona przez białko macierzy 1 (M1), które stabilizuje kapsyd. Ponadto w wirionie znajdują się białka odpowiedzialne za eksport RNA z jądra komórkowego NS2/NEP. Genom koduje także inne niestrukturalne białka m.in. NS1, PB1-F2 oraz PA-X, które wpływają na odpowiedź immunologiczną zakażonych komórek i patogenność wirusa [Hao & Wang, 2020]. Genom wirusa grypy typu A zbudowany jest z 8 segmentów. Polimeraza RNA zależna od RNA jest kompleksem złożonym z trzech białek: PA, PB1 oraz PB2. PA, PB1 oraz PB2, wraz z białkiem nukleokapsydu (NP), tworzą kompleks rybonukleinowy (vRNP) [Bouvier & Palese, 2008].

Grypa typu A występuje jako choroba sezonowa, ale stanowi potencjalne zagrożenie pandemiczne. Za zmienność sezonowych wirusów grypy odpowiada przesunięcie antygenowe (ang. *antigenic drift*), które polega na mutacjach punktowych w wirusowym RNA (Rycina 1b, c). Najczęściej mutacje zachodzą w obrębie genów kodujących białka HA i NA.

Obecne szczepionki przeciw grypie, ze względu na wysoką zmienność wirusa, są przygotowywane co roku, jednak charakteryzują się niską skutecznością, zwłaszcza przeciw podtypowi H3N2 [Belongia i wsp., 2016]. Raz na kilkanaście lat dochodzi do tzw. skoku antygenowego (ang. *antigenic shift*), który polega na wymianie fragmentów RNA pomiędzy różnymi wirusami grypy, np. ludzkiej i ptasiej. Skok antygenowy może wywołać pandemię, ze względu na nierozpoznawanie lub słabe rozpoznawanie antygeny przez przeciwciała oraz limfocyty T [Murphy i wsp., 2017]. W przeszłości, w wyniku skoku antygenowego, dochodziło do pandemii H2N2 i H3N2, które odnotowano w 1957 oraz w 1968 roku [Taubenberger & Morens, 2010].



Rycina 1 Ilustracja przedstawiająca: a) strukturę wirusa grypy, b) kompleks rybonukleinowy (vRNP), c) osiem segmentów genomu wirusa. Skróty: HA – hemaglutynina; M1 – białko macierzy 1; M2 – białko macierzy 2; NA – neuraminidaza; NP – białko nukleokapsydu; NS1 – białko niestrukturalne 1; NS2/NEP – białko niestrukturalne 2/białko eksportu jądrowego; PA, PB1, PB2-białka RNA zależnej polimerazy RNA wchodzące w skład kompleksu vRNP; PA-X, PB1-F2 – białka kodowane przez alternatywną ramkę odczytu. Oryginalna ilustracja z publikacji [Liang, 2023], udostępnionej na licencji CC BY 4.0.

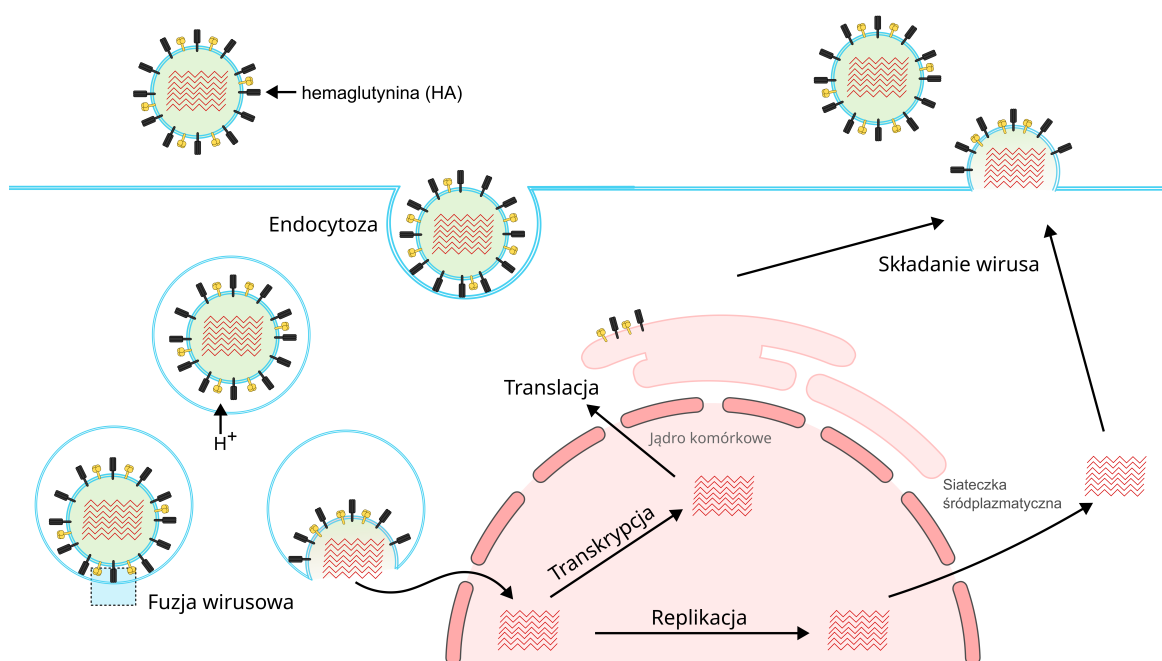
1.1.2. Cykl replikacyjny wirusa grypy

W pierwszym etapie infekcji wirusa grypy typu A hemaglutynina rozpoznaje i wiąże się z resztami kwasu sjałowego (kwas N-acetylneuraminowy). HA preferencyjnie rozpoznaje reszty kwasu sjałowego przyłączonego do galaktozy za pomocą wiązań α -2,6 lub α -2,3, odpowiednio w przypadku grypy ludzkiej lub ptasiej [Gambaryan i wsp., 1997; Matrosovich i wsp., 1997]. Wiązania typu α -2,6 występują przeważnie w komórkach nabłonkowych górnych dróg oddechowych ludzi, które są miejscem infekcji. Natomiast u ptaków w komórkach nabłonkowych występują w większości wiązania typu α -2,3. Specyficzne rozpoznawanie wiązania α -2,3 przez wirusa ptasiej grypy skutkuje niską zakaźnością wśród ludzi oraz

brakiem transmisji drogą kropelkową [Matrosovich i wsp., 2004; Zhao i wsp., 2022]. Badania sugerują, że w przeszłości mutacje w miejscu wiązania reszt kwasu sjałowego ptasiej grypy odgrywały istotną rolę w wywoływaniu pandemii [Glaser i wsp., 2005].

Po związaniu się do powierzchni komórki, wirus grypy wnika do komórki w wyniku endocytozy lub makropinocytozy, a następnie trafia do późnych endosomów (Rycina 2). W środowisku kwaśnym późnych endosomów (pH 5-5,5) HA ulega zmianom konformacyjnym, co skutkuje ekspozycją fragmentu HA i fuzją wirusa [Galloway i wsp., 2013]. Proces fuzji, kluczowy w badaniach tej pracy, został szczegółowo opisany w rozdziale 1.4. Następnie do wnętrza wirionu za pomocą kanału jonowego M2 są transportowane jony H^+ . W niskim pH białko macierzy M1 ulega zmianom konformacyjnym, co osłabia jego oddziaływanie z kompleksem rybonukleinowym (vRNP). W rezultacie vRNP odłącza się od M1 i jest uwalnianie do cytoplazmy.

W kolejnym etapie vRNP jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do zachodzącej transkrypcji oraz replikacji RNA [Sempere Borau & Stertz, 2021]. Kolejno wyeksportowane z jądra wirusowe RNA stanowi matrycę dla syntezy białek. Białka otoczki wirusowej HA, NA i M2 ulegają translacji w szorstkiej siateczce cytoplazmatycznej i następnie są transportowane do błony komórkowej. Inne białka wirusowe syntezowane w cytoplazmie oraz RNA są selektywnie pakowane do wirionu [Li i wsp., 2021]. Uwolnienie wirusa jest możliwe dzięki aktywności NA, która usuwa reszty kwasu sjałowego z powierzchni komórki, dzięki czemu wirus nie wiąże się ponownie z tą samą komórką [Lentz i wsp., 1987; McAuley i wsp., 2019].



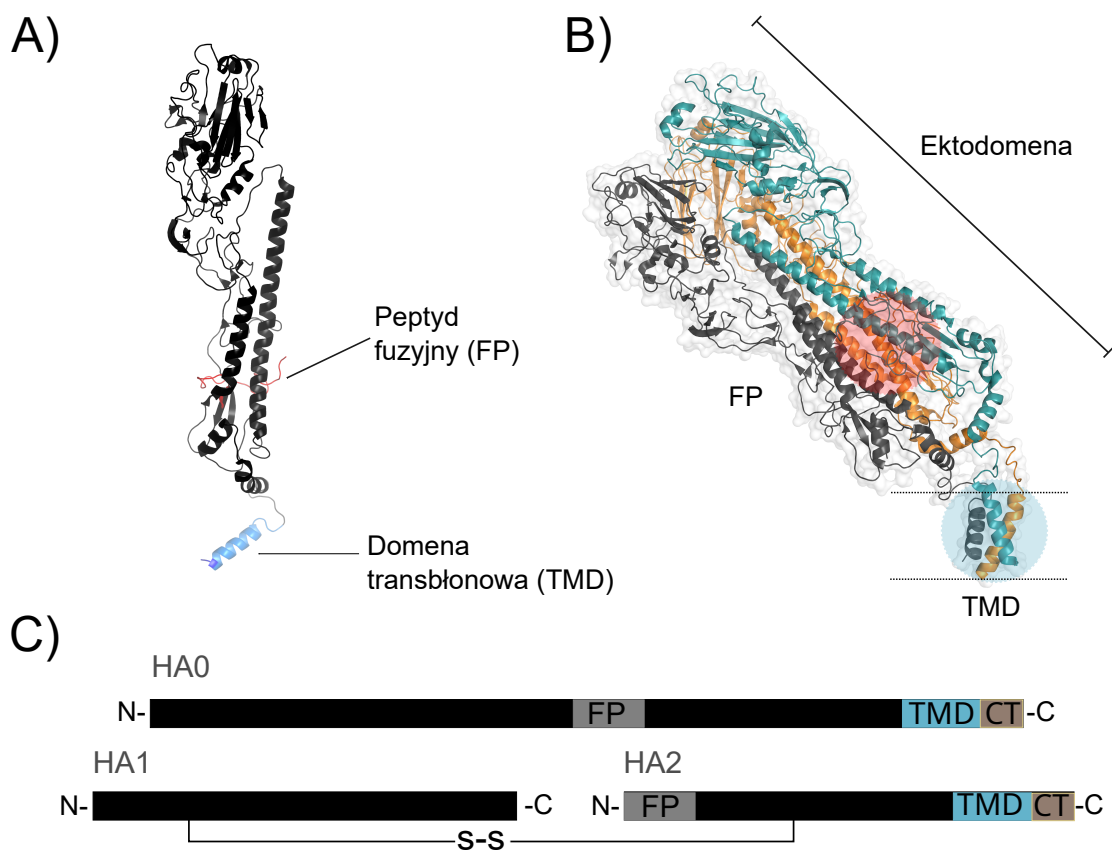
Rycina 2 Cykl replikacyjny wirusa grypy typu A. Autorski schemat na podstawie ilustracji z publikacji [Nuwarda i wsp., 2021], udostępnionej na licencji CC BY 4.0.

1.2. Hemaglutynina

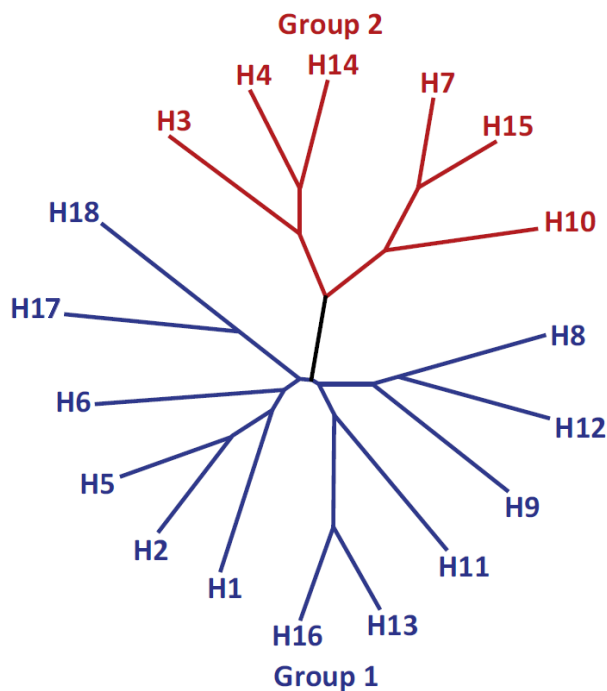
1.2.1. Struktura hemaglutyniny

Hemaglutynina jest syntezowana w postaci prekursora HA0, w formie homotrimeru. Składa się z globularnej głowy, utworzonej głównie przez podjednostkę HA1 oraz wydłużonej domeny złożonej z podjednostek HA1 i HA2, która zakotwicza białko w otoczce wirusa (Rycina 3). Podjednostki są połączone ze sobą za pomocą mostka disiarczkowego. Do poprawnego działania białka wymagana jest jego aktywacja, która polega na cięciu proteolitycznym na podjednostki HA1 oraz HA2. W większości podtypów wirusa grypy w prekursorze HA0 występuje tylko jedno miejsce cięcia. Cięcie następuje za pomocą proteaz serynowych trypsynopodobnych (ang. *trypsin-like protease*), w przestrzeni międzykomórkowej podczas składania wirusa lub w sieci trans aparatu Golgiego [Böttcher-Friebertshäuser i wsp., 2010]. Natomiast w przypadku ptasich wirusów o wysokiej patogenności występuje wiele miejsc cięcia proteolitycznego w HA0. Wiąże się to z dużą śmiertelnością u ptaków [Stieneke-Gröber i wsp., 1992; Horimoto i wsp., 1994; Sun i wsp., 2010; Suguitan i wsp., 2012].

Dotychczas wyróżniono 18 podtypów hemaglutyniny, które zostały podzielone na podstawie sekwencji aminokwasowej na dwie grupy filogenetyczne: grupę 1 oraz grupę 2 [Air, 1981; Wu i wsp., 2014]. Podtypy H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, H18 zostały zakwalifikowane do grupy 1, natomiast podtypy H3, H4, H7, H10, H14 i H15 należą do grupy 2 (Rycina 4). Podtypy z różnych grup filogenetycznych znacznie różnią się sekwencją. Analiza sekwencji aminokwasowej całego białka wykazała 40-44% podobieństwa pomiędzy podtypami pochodzącymi z różnych grup filogenetycznych. W obrębie tych samych grup filogenetycznych podobieństwo jest większe: na poziomie 48-74% w grupie 1 i 50-67% w grupie 2 [Nobusawa i wsp., 1991].



Rycina 3 A) Struktura monomeru hemaglutyniny, B) Struktura homotrimeru hemaglutyniny podtypu H1 przed fuzją, C) Schemat przedstawiający cięcie proteolityczne prekursora HA0 na podjednostki HA1 oraz HA2. Struktury przedstawione na panelu A i B zostały wygenerowane na podstawie PDB:6HJR przy użyciu programu Chimera, panel C ilustracja autorska.



Rycina 4 Drzewo filogenetyczne hemaglutyniny przedstawiające 18 podtypów hemaglutyniny z podziałem na grupy filogenetyczne. Ilustracja zmodyfikowana z publikacji [Wu i wsp., 2014], za zgodą wydawnictwa. Zgoda udzielona przez Copyright Clearance Center.

1.2.2. Funkcje podjednostek HA1 oraz HA2

Podjednostki HA1 oraz HA2 pełnią różne funkcje. HA1 jest odpowiedzialna za wiązanie z receptorem z resztami kwasu sjałowego na powierzchni komórki. Natomiast HA2 odpowiada za fuzję otoczki wirusa z błoną późnych endosomów oraz zakotwicza białko w otoczcze wirusowej [Wu & Wilson, 2020]. HA1 przyjmuje głównie strukturę drugorzędową β -kard. W podjednostce HA1 znajduje się miejsce wiązania receptora (ang. *receptor-binding site*), które składa się z trzech konserwatywnych struktur drugorzędowych: pętli 130, pętli 220 oraz helisy 190 [Skehel & Wiley, 2000]. Rozpoznawanym receptorem jest kwas sjałowy przyłączony do galaktozy za pomocą wiązań α -2,6 lub α -2,3, odpowiednio w przypadku podtypów ludzkiej lub ptasiej grypy [Zhao i wsp., 2022]. Podjednostka HA2 przyjmuje głównie strukturę drugorzędową dwóch α -helis (ang. *coiled-coil*) oraz składa się z ektodomeny, domeny transbłonowej (TMD) o długości około 26-27 reszt aminokwasowych oraz ogona cytoplazmatycznego (CT), składającego się z 10-14 reszt aminokwasowych [Khrustalev i wsp., 2022]. Ektodomena jest połączona z TMD za pomocą elastycznego łącznika o długości 10 reszt aminokwasowych. Na N-końcu ektodomeny podjednostki HA2 znajduje się peptyd fuzyjny (FP) o długości 20-23 reszt aminokwasowych. FP oddziałuje bezpośrednio z błoną późnych endosomów i pośredniczy w fuzji. Natomiast TMD oraz CT odpowiadają głównie za kotwiczenie HA w otoczcze wirusowej, a także prawdopodobnie pełnią funkcję w procesie fuzji [Benton i wsp., 2020; Eller i wsp., 2021]. Rola FP, TMD i CT w fuzji zostanie szczegółowo omówiona w rozdziałach 1.4.2-1.4.4.

1.2.3. Modyfikacje potranslacyjne hemaglutyniny

Hemaglutynina ulega modyfikacjom potranslacyjnym N-glikozylacji i S-acetytacji w siateczce endoplazmatycznej oraz w aparacie Golgiego. Proces N-glikozylacji polega na przyłączeniu łańcuchów cukrów do reszt asparaginy w motywie N-X-S/T-Y, gdzie X i Y to dowolne reszty aminokwasowe oprócz reszty proliny. W przypadku HA do białka są głównie przyłączone łańcuchy cukrowe z wysoką zawartością mannozy. Miejsca i ilości glikozylacji zależą od podtypu HA [Tate i wsp., 2014]. Glikozylacja HA odgrywa istotną rolę w sezonowej zmienności grypy zmieniając odpowiedź immunologiczną komórek. Proces S-acetytacji HA polega na przyłączeniu reszty kwasu palmitynowego lub stearynowego do reszt cysteinowych znajdujących się w regionie TMD i CT podjednostki HA2 [Brett i wsp., 2014]. Acetytacje są wymagane do replikacji wirusa grypy i odpowiadają za lokalizację białka w błonie.

1.3. Błona lipidowa

Aktywność fuzyjna hemaglutyniny jest ściśle związana z błoną lipidową. Poznanie budowy, struktury oraz organizacji dwuwarstwy lipidowej jest konieczne do zrozumienia procesu fuzji. Poniżej przedstawiono zarys najważniejszych badań nad dwuwarstwą lipidową, który przedstawia błonę jako złożone i dynamiczne środowisko dla białek błonowych.

1.3.1. Budowa dwuwarstwy lipidowej

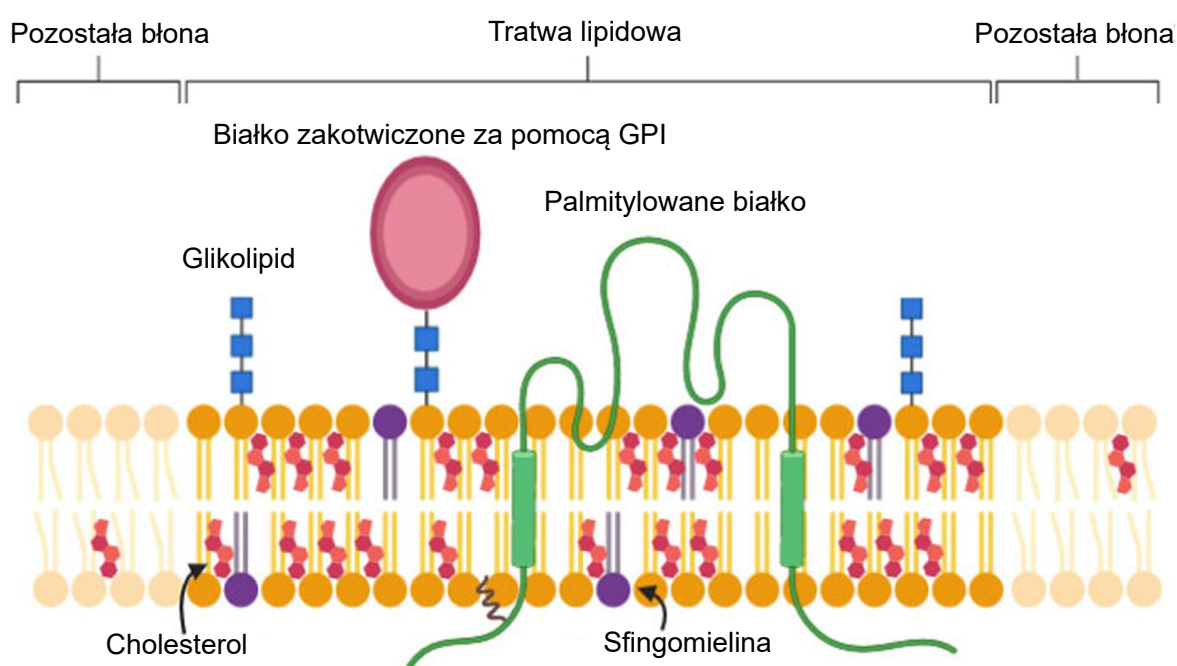
Początkowo za model budowy błony lipidowej przyjęto prosty model płynnej mozaiki. Zakładał on, że błona lipidowa jest wieloskładnikową, dwuwymiarową, homogenną strukturą złożoną z lipidów oraz aktywnych białek [Singer & Nicolson, 1972; Nicolson & Mattos, 2021]. W krótkim czasie po opublikowaniu modelu płynnej mozaiki zaobserwowano, że lipidy tworzą odrębne domeny w błonie [Yu i wsp., 1973]. Stwierdzono także, że glikosfingolipidy oraz białka z kotwicą GPI (glikozylofosfatydylinozytol) lokalizują się w domenach w błonie komórkowej [Simons & Van Meer, 1988; Brown i wsp., 1992]. Simons i Ikonen [1997] podsumowali wcześniejsze wyniki i sformułowali hipotezę tratw lipidowych, która zakłada, że w wyniku oddziaływania sfingolipidów oraz cholesterolu tworzą się domeny lipidowe w błonie (Rycina 5). Zaproponowali, że domeny są platformami dla białek pozwalając tym samym na przekazywanie sygnałów. Następnie zdefiniowano tratwy lipidowe jako małe dynamiczne domeny o wielkości 10-200 nm bogate w cholesterol, sfingomielinę oraz lipidy z nasyconymi kwasami tłuszczowymi [Pike, 2006; Sezgin i wsp., 2017].

We wczesnych badaniach za model tratw lipidowych uznawano frakcję nierozpuszczalną w detergencie DRM (ang. *detergent-resistant membranes*), izolowaną za pomocą niejonowych detergentów z błon komórkowych [Simons & Ikonen, 1997]. Pozostała część błon komórkowych DSM (ang. *detergent-soluble membranes*) stanowiła frakcję rozpuszczalną w detergencie. Frakcja DRM była wzbogacona w cholesterol, sfingomielinę oraz niektóre białka np. białka z kotwicą GPI [Hanada i wsp., 1995].

Równolegle w eksperymentach na sztucznych modelach błon z mieszaniną cholesterolu oraz lipidów nienasyconych i nasyconych, zauważono współistnienie dwóch faz w skali μm : fazy ciekłokrystalicznej uporządkowanej L_o (ang. *liquid-ordered phase*) oraz fazy ciekłokrystalicznej nieuporządkowanej L_d (ang. *liquid-disordered phase*) [Ipsen i wsp., 1987; Kaiser i wsp., 2009]. Faza L_o , bogata w lipidy z nasyconymi kwasami tłuszczowymi i cholesterol jest rozważana jako model tratw lipidowych [Simons & Vaz, 2004]. Do modelowych sztucznych błon stosowanych do mikroskopowych obserwacji separacji na fazy L_o oraz L_d , należą ogromne liposomy GUV (ang. *giant unilamellar vesicle*) oraz płaska dwuwarstwa lipidowa na podłożu SLB (ang. *supported lipid bilayer*). Najbardziej podobnym do błony komórkowej modelem są tzw. pęcherzyki błony plazmatycznej GPMV (ang. *giant plasma*

membrane vesicle), otrzymywane z komórek. Podobnie jak w GUV i SLB, w pęcherzykach błony plazmatycznej obserwuje się fazy L_o i L_d w skali μm . W odróżnieniu od liposomów GMPV zawierają one lipidy oraz białka, które występują w błonie komórkowej [Veit & Thaa, 2011].

Zarówno frakcja DRM jak i faza ciekłokrystaliczna uporządkowana L_o nie odzwierciedlają w pełni domen, które występują w błonach komórkowych. Domeny w błonie komórkowej żywych komórek są dynamiczne oraz mają rozmiar poniżej 200 nm, przez to są trudne do uchwycenia w eksperymentach mikroskopowych. Jednym z rozwiązań, które pozwala na zbadanie traw lipidowych w komórce jest stosowanie metod mikroskopii wysokorozdzielczej [Sezgin i wsp., 2017].



Rycina 5 Schemat przedstawiający model tratw lipidowych. Zmodyfikowana ilustracja z publikacji [Ripa i wsp., 2021], udostępnionej na licencji CC BY 4.0.

1.3.2. Skład lipidowy błon komórkowych

Do zrozumienia w pełni fuzji wirusa grypy z komórkami, kluczowe jest uwzględnienie roli lipidów w tym procesie. Skład lipidowy błon komórkowych różni się w zależności od organelli komórkowych oraz typu komórek [van Meer i wsp., 2008]. Występuje także asymetria w składzie lipidowym pomiędzy zewnętrznym i wewnętrznym listkiem dwuwarstwy lipidowej niektórych organelli.

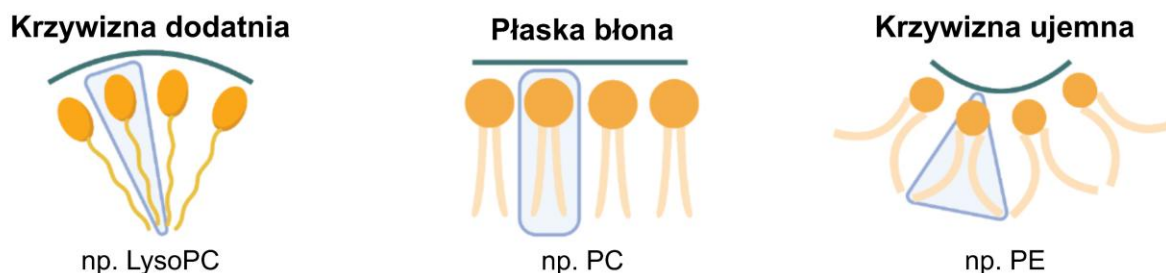
Znaczną część lipidów błon biologicznych komórek człowieka stanowią glicerofosfolipidy, które zbudowane są z hydrofilowej części, tzw. "głowy", oraz hydrofobowych ogonów węglowodorowych [Alberts i wsp., 2015]. Najbardziej powszechne glicerofosfolipidy to fosfatydylocholina (PC) (ponad 50% wszystkich fosfolipidów), fosfatydyloetanolamina

(PE), fosfatydyloseryna (PS) oraz fosfatydyloinozytol (PI). Zazwyczaj jeden z dwóch występujących łańcuchów węglowodorowych, tzw. ogonów lipidowych, zbudowany jest z nienasyconych kwasów tłuszczowych [van Meer i wsp., 2008]. Poza glicerofosfolipidami istotną część lipidów stanowią sfingolipidy oraz cholesterol. Zawartość sfingolipidów oraz cholesterolu wynosi odpowiednio około 10% oraz 50% wszystkich lipidów błony komórkowej [van Meer i wsp., 2008]. Do najczęściej występujących sfingolipidów należy sfingomielina (SM).

W czasie endocytozy skład lipidowy endosomów zmienia się. Wczesne endosomy mają skład lipidowy podobny do błony komórkowej. Późne endosomy, gdzie zachodzi fuzja wirusa grypy, posiadają natomiast mniej cholesterolu oraz PS w porównaniu do błony komórkowej [Kobayashi i wsp. 1998]. Natomiast skład lipidowy otoczki wirusowej odpowiada składowi lipidowemu błony komórkowej. Otoczka wirusowa jest zbudowana głównie z cholesterolu (ok. 50%), PS i SM [Gerl i wsp., 2012]. Stwierdzono, że wirus grypy prawdopodobnie pakuje się oraz uwalnia z miejsca w błonie komórkowej, bogatego w cholesterol [Zhang i wsp, 2000; Takeda i wsp., 2003].

Skład lipidowy błon komórkowych wpływa na fuzję z wirusem m.in. przez zmianę krzywizny błony, która zależy od kształtu lipidów lub może być indukowana przez białka. Z kolei kształt lipidu uwarunkowany jest stosunkiem wielkości "głowy" do wielkości ogonów węglowodorowych. Wyróżnia się takie kształty lipidów jak: stożek, cylindryczny lub odwrócony stożek [White i wsp., 2023]. Obecność lipidów o kształcie odwróconego stożka, takich jak lizofosfatydylocholina (LysoPC), promuje powstanie krzywizny dodatniej (ang. *positive curvature*). Z kolei obecność lipidów o kształcie stożka takich jak cholesterol, PE promuje powstanie krzywizny ujemnej (ang. *negative curvature*). PC oraz PS należą do lipidów o kształcie cylindrycznym, które tworzą płaskie błony (Rycina 6) [Meher & Chakraborty, 2019; White i wsp., 2023].

Hemifuzja oraz tworzenie poru fuzyjnego są procesami, które wymagają reorganizacji błony. W zależności od etapu fuzji, lipidy, które indukują krzywizny dodatnie lub ujemne błony, mogą promować lub hamować proces fuzji. Hemifuzję promuje obecność lipidów, które sprzyjają powstawaniu błon o krzywiznie ujemnej promując hemifuzję [Yang & Huang, 2002; Chernomordik & Kozlov, 2008]. Natomiast obecność lipidów o krzywiznie dodatniej sprzyja przejściu z etapu hemifuzji do powstania poru [Chernomordik i wsp., 1995].



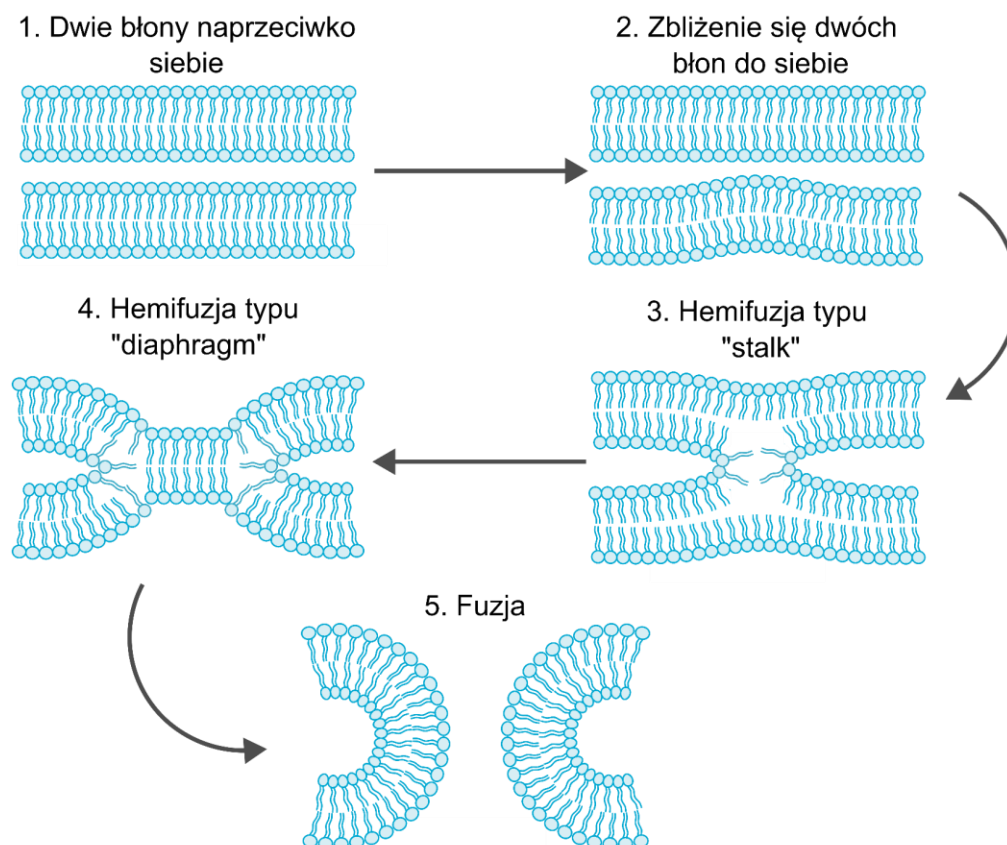
Rycina 6 Krzywizna błony w zależności od składu lipidowego. Skróty: LysoPC – lizofosfatydylocholina; PC – fosfatydylocholina; PE – fosfatydyloetanolamina. Zmodyfikowana ilustracja z publikacji [White i wsp., 2023], udostępnionej na licencji CC BY 4.0.

1.4. Proces fuzji wirusowej

Fuzja wirusowa jest niezwykle istotnym procesem w patogenezie wirusów, do którego konieczne są białka fuzyjne. Dzięki połączeniu otoczki wirusowej z błoną lipidową komórki wirusy otoczkowe mogą uwolnić swój materiał genetyczny do wnętrza komórki. Standardowy model fuzji zakłada, że proces ten zachodzi z udziałem stanów pośrednich, które są poniżej scharakteryzowane [Chernomordik & Kozlov, 2008; Harrison, 2015]. Według modelowego schematu fuzji (Rycina 7) na pierwszym etapie fuzji dochodzi do dehydratacji błon, co umożliwia zbliżenie się dwóch błon do siebie i oddziaływanie ze sobą. Następnie zachodzi proces hemifuzji, będący stanem pośrednim, w którym następuje połączenie dwóch błon ale bez mieszania się zawartości. Wyróżnione zostały dwie struktury występujące na etapie hemifuzji: struktura typu „stalk” oraz typu „diaphragm”. Początkowo błony tworzą strukturę typu „stalk”, czyli połączenie się zewnętrznych warstw dwóch błon lipidowych. W dalszym etapie następuje hemifuzja typu „diaphragm”, w którym dochodzi do połączenia wewnętrznych warstw dwóch błon. Następnie zachodzi pełna fuzja dwóch błon, prowadząca do utworzenia poru fuzyjnego. Por jest kanałem umożliwiającym mieszanie się zawartości, które pierwotnie były oddzielone dwuwarstwami lipidowymi. Na końcowym etapie dochodzi do rozszerzenia poru fuzyjnego, co umożliwia wymianę zawartości [Boonstra i wsp., 2018].

Fuzja błon rzadko przebiega spontanicznie, ponieważ stany pośrednie fuzji charakteryzują się wysoką energią aktywacji rzędu 30 $k_B T$ [François-Martin i wsp., 2017; Zheng i wsp., 2022]. Proces ten wymaga białek, które obniżają energię aktywacji. Wirusy otoczkowe posiadają białka lub kompleksy białkowe, które odpowiadają za fuzję otoczki wirusowej z błoną lipidową komórek gospodarza. Wirusowe białka fuzyjne zostały podzielone na trzy klasy ze względu na strukturę drugorzędową oraz podobieństwa funkcjonalne: klasę I, II oraz III. Białkiem fuzyjnym wirusa grypy jest hemaglutynina, należąca do klasy I, dla której charakterystyczne jest struktura α -helisy. Wszystkie białka z klasy I oraz II wymagają aktywacji poprzez cięcie proteolitycznemu oraz niskie pH lub związanie receptora [Harrison, 2008;

White & Whittaker, 2016]. Aby lepiej zrozumieć proces fuzji, konieczne jest zbadanie struktury i funkcji białek fuzyjnych, a także ich oddziaływania z lipidami.

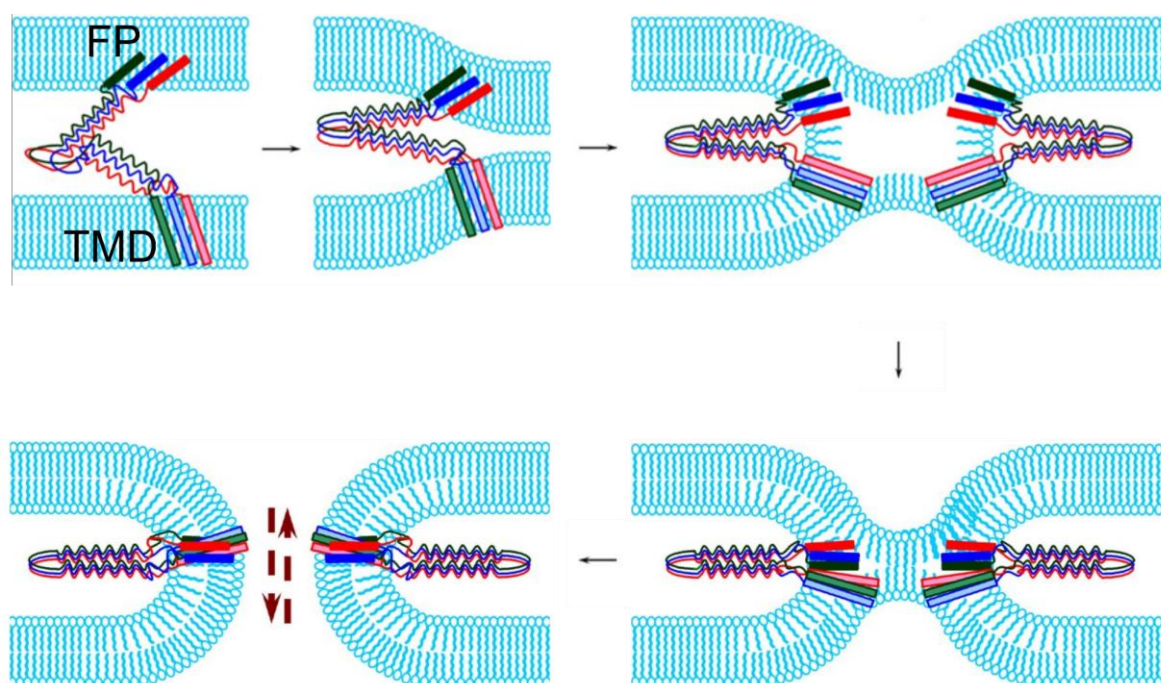


Rycina 7 Schemat przedstawiający etapy fuzji według modelu fuzji dwóch błon lipidowych. Rysunek autorski na podstawie publikacji [Joardar i wsp., 2022].

1.4.1. Fuzja wirusa grypy

Proces fuzji wirusa grypy typu A zachodzi z udziałem hemaglutyniny w późnych endosomach (Rycina 8). Po związaniu z receptorem reszt kwasu sjałowego, wirus wnika do komórki zazwyczaj za pomocą endocytozy. W późnych endosomach, w wyniku działania kwaśnego pH dochodzi do zmian konformacyjnych HA, które pierwotnie prowadzą do ekspozycji N-końcowego fragmentu białka peptydu fuzyjnego (FP). W zależności od podtypu aktywacja HA zachodzi przy pH w zakresie 4.6 - 6, najczęściej przy pH ok. 5 [Galloway i wsp., 2013]. Uwolniony FP oddziałuje z lipidami błony endosomalnej, łącząc tym samym dwie błony. W kolejnym kroku ektodomena HA ulega dalszym zmianom konformacyjnym, przyciągając N- i C- koniec białka oraz błony otoczki wirusowej oraz endosomalną. Dalej następuje połączenie dwóch błon prowadząc do hemifuzji. W inicjacji hemifuzji bierze udział FP. Co jednak istotne zarówno obecność FP, jak i domeny transbłonowej (TMD) jest konieczna do pełnej fuzji. Na etapie hemifuzji FP i TMD znajdują się w bliskiej odległości od siebie. Przypuszcza się, że hemifuzja wirusa grypy zachodzi prawdopodobnie dwuetapowo: powstanie struktur

“stalk” a następnie “diaphragm”. Ostatecznie formuje się por fuzyjny [Lee, 2010; Risselada i wsp., 2012]. Powstanie poru umożliwia uwolnienie wirusowego RNA, a tym samym dalsze etapy infekcji [Harrison, 2008; White i wsp., 2023]. Co istotne, pokazano, że do pełnej fuzji wystarczy jeden homotrimer HA [Günther-Ausborn i wsp., 2000, Imai i wsp., 2006], a kluczowymi fragmentami HA, prowadzącymi do pełnej fuzji wirusa, są najprawdopodobniej FP oraz TMD.



Rycina 8 Schemat fuzji wirusa grypy indukowanej przez hemaglutyninę w późnych endosomach (FP – peptyd fuzyjny, TMD – domena transbłonowa). Zmodyfikowana ilustracja z publikacji [Chang i wsp., 2008], udostępnionej na licencji CC BY 4.0.

1.4.2. Rola peptydu fuzyjnego (FP) w fuzji wirusa grypy

Peptyd fuzyjny jest to N-końcowy fragment podjednostki HA2 o długości 20-23 reszt aminokwasowych, który oddziałuje z lipidami błony późnego endosomu i pośredniczy w procesie fuzji. Sam FP indukuje hemifuzję nawet bez obecności innych części białka, nie powoduje jednak pełnej fuzji, gdyż do tego zjawiska wymagana jest obecność pozostałej części [Lousa & Soares, 2021].

Długość FP pozostaje kwestią sporną. W badaniach stosowane są różne modele tego peptydu. Pierwotnie za sekwencje odpowiadającą FP uznano N-końcowy fragment HA o długości 20 reszt aminokwasowych (HAfp20), a struktura oraz aktywność syntetycznego peptydu HAfp20 zostały scharakteryzowane przez serię eksperymentów [Lear & DeGrado, 1987; Skehel & Wiley, 2000; Sun & Weliky, 2009]. Jednak dłuższa wersja FP o długości 23 reszt aminokwasowych (HAfp23) charakteryzuje się większą aktywnością fuzyjną niż krótszy odpowiednik [Lorieau i wsp., 2010; Ghosh i wsp., 2015]. Co więcej, sekwencja aminokwasowa

FP HAfp23 jest zachowana w toku ewolucji wśród podtypów HA z różnych grup filogenetycznych [Cross i wsp., 2009; Worch, 2014].

Struktura drugorzędowa FP oraz zagłębienie peptydu w błonie są istotne dla aktywności fuzyjnej peptydu. W zależności od długości FP przyjmuje w błonie różną strukturę drugorzędową (Rycina 9). Z kolei w roztworach występuje w formie nieuporządkowanej [Han & Tamm, 2000]. HAfp20 przyjmuje w błonie przy pH 5 w przeważającej ilości strukturę otwartą, tzw. bumerangu (ang. *boomerang*), natomiast peptyd HAfp23 tworzy w błonie głównie w strukturę zamkniętą tzw. spinki do włosów (ang. *hairpin*) [Ghosh i wsp., 2013; Lorieau i wsp., 2013; Du i wsp., 2014]. HAfp23 jest prawdopodobnie głęboko zagłębiony w błonie [Michalski & Setny, 2021b; Worch i wsp., 2021], a w niskim pH, dzięki protonacji reszt aminokwasowych FP, stabilizowana jest konformacja peptydu przechodząca przez błonę (ang. *membrane-spanning conformation*) [Han i wsp., 2001; Lorieau i wsp., 2011; Lousa i wsp., 2020]. Struktura spinki do włosów oraz głębokie zagłębienie w błonie powiązane są z wysoką aktywnością HAfp23.

Ważny wpływ struktury FP na aktywność fuzyjną peptydu potwierdzają liczne badania prowadzone nad mutacjami. Wprowadzenie punktowych mutacji w sekwencji FP często prowadzi do spowolnienia procesu fuzji lub wręcz całkowitego zahamowania [Cross i wsp., 2009]. Syntetyczne peptydy FP z mutacjami, które znacząco zmieniają ich strukturę drugorzędową, mają obniżoną lub całkowicie zahamowaną aktywność fuzyjną [Cross i wsp., 2001; Wasniewski i wsp., 2004; Lai i wsp., 2006; Langley i wsp., 2009]. Przykładem mogą być mutanty G1V i W14A, które nie wykazują aktywności fuzyjnej i przyjmują w błonie strukturę bumerangu [Li i wsp., 2005; Lai i wsp., 2006]. Mutacje te wpływają nie tylko na strukturę FP, ale również na jego konformację w błonie lipidowej, co jest istotne w inicjacji fuzji.

Czynnikiem, który wpływa na aktywność FP jest pH roztworu, w którym się znajduje. FP ma kontakt z błoną endosomalną w późnych endosomach, gdzie pH wynosi około 5. Badania aktywności fuzyjnej syntetycznych peptydów HAfp20 i HAfp23 wykazały, że HAfp20 powoduje hemifuzję jedynie w kwaśnym pH [Murata i wsp., 1987, Wharton i wsp., 1988], natomiast HAfp23 jest aktywny również przy pH 7.4. Warto dodać, że większą aktywność fuzyjną wykazuje w pH równym 5 [Lousa i wsp., 2020]. Zależność aktywności fuzyjnej FP od pH wynika z protonacji reszt aminokwasowych i jest przykładem przystosowania wirusa grypy do fuzji w późnych endosomach.

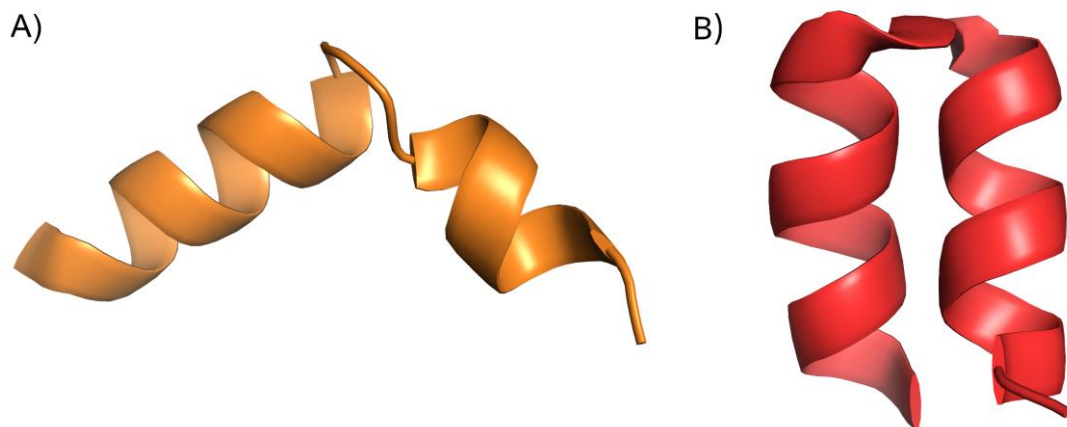
Prawdopodobnie aktywność fuzyjna FP wynika z kombinacji kilku mechanizmów, które pozwalają na połączenie dwóch błon. Jednym z proponowanych mechanizmów jest protruzja ogonów lipidowych, która polega na skierowaniu węglowodorowych ogonów fosfolipidów do roztworu [Lousa & Soares, 2021]. Protruzja rzadko zachodzi w dwuwarstwie lipidowej. To wskazuje na to, że może być indukowana przez FP. Serie badań z użyciem symulacji molekularnych oraz badania eksperymentalne potwierdziły, że w obecności FP istotnie

zwiększa się prawdopodobieństwo protruzji [Kasson i wsp., 2010; Victor i wsp., 2015; Zhang i wsp., 2023]. Również Larsson i Kasson udowadniają, że hemifuzja indukowana przez FP koreluje z protruzją lipidów [2013]. Symulacje molekularne z całym białkiem HA pokazały, że FP powoduje perturbację fosfolipidów doprowadzając do protruzji ogonów węglowodorowych [Pabis i wsp., 2020].

Pośrednio protruzja ogonów węglowodorowych lipidów jest powiązana z parametrem uporządkowania lipidów, który może być obserwowany za pomocą metod eksperymentalnych. Lokalny spadek w uporządkowaniu błony może prowadzić do protruzji [Larsson & Kasson, 2013]. Wpływ FP na uporządkowanie lipidów nie jest do końca poznany. Do jego charakteryzacji używany jest parametr uporządkowania lipidów (ang. *membrane lipid order*), który jest zdefiniowany jako miara uporządkowania ogonów węglowodorowych fosfolipidów w błonie [Owen i wsp., 2010]. W zależności od stosowanej metody FP może indukować zwiększenie lub zmniejszenie uporządkowania lipidów. Przeprowadzone badania eksperymentalne pokazują sprzeczne wyniki dotyczące wpływu FP na uporządkowanie lipidów. Na przykład symulacje molekularne wskazały, że FP powoduje zmniejszenie uporządkowania lipidów w bliskiej odległości od peptydu [Larsson & Kasson, 2013; Brice & Lazaridis, 2014; Victor i wsp., 2015]. Podobny efekt zmniejszenia uporządkowania lipidów przez HAfp23 zaobserwowano także w badaniach eksperymentalnych [Ghosh & Weliky, 2020]. Co więcej, HAfp23 indukował większe nieuporządkowanie niż krótszy odpowiednik HAfp20 [Worch i wsp., 2017]. Z kolei, inne badania eksperymentalne z peptydem HAfp20 wykazały, że FP zwiększa uporządkowanie lipidów [Ge & Freed, 2009, Chakraborty i wsp., 2017]. Rozbieżności te mogą wynikać m.in. z różnic w zastosowanych metodach badawczych, z odmiennych składów lipidowych modelowych błon oraz długości zastosowanego peptydu. Dodatkowo lokalne uporządkowanie lipidów może być inne niż globalne, dotyczące całej błony lipidowej.

Do procesu fuzji wymagana jest także globalna rearanżacja dwóch błon. Jednym z mechanizmów działania FP jest stabilizacja ujemnej krzywizny w błonie (ang. *negative curvature*), tym samym inicjując hemifuzję [Tenchov i wsp., 2013; Smrt i wsp., 2015].

Dotychczasowe doniesienia wskazują na niejednoznaczny sposób działania FP, który prowadzi do fuzji dwóch błon. Do zaproponowanych mechanizmów działania FP należą indukcja protruzji lipidów, zmiana uporządkowania lipidów oraz stabilizacja ujemnej krzywizny błony lipidowej. Mimo wielu badań mechanizm działania FP pozostaje nadal nieznanym. Na aktywność fuzyjną peptydu wpływa wiele czynników, takich jak pH, długość używanego FP czy też skład lipidowy błon ulegających fuzji, który zostanie omówiony w dalszych rozdziałach niniejszej pracy.



Rycina 9 Struktury peptydu fuzyjnego hemaglutyniny, A) Struktura bumerangu – FP o długości 20 reszt aminokwasowych (HAfp20) w miceli w pH 5 (PDB: 1IBN), B) Struktura spinki do włosów – FP o długości 23 reszt aminokwasowych (HAfp23) w miceli w pH 7.4 (PDB: 2KXA). Struktury wygenerowane na podstawie danych PDB przy użyciu programu Chimera.

1.4.3. Rola domeny transbłonowej (TMD) w fuzji wirusa grypy

Domena transbłonowa hemaglutyniny składa się z 26-27 reszt aminokwasowych oraz znajduje się na C-końcu podjednostki HA2. TMD w błonie przyjmuje strukturę α -helisy. W obecności trzech domen tworzą się homotrimery [Tatullian & Tamm, 2000; Victor i wsp., 2012; Mineev i wsp., 2013]. Należy podkreślić, że TMD różni się znacznie sekwencją i właściwościami fizykochemicznymi, pomiędzy grupami filogenetycznymi HA (grupą 1 oraz grupą 2), jednak zachowuje tę samą funkcję w białku. Podobieństwo między sekwencjami TMD pochodzącymi z podtypów H1 (grupa 1) i H3 (grupa 2), dla wirusów grypy, których gospodarzem jest człowiek, wynosi tylko 46% [Kubiszewski & Worch, 2020]. Sekwencja aminokwasowa TMD z grupy 2 charakteryzuje się większą hydrofobowością oraz amfipatycznością w porównaniu do TMD z grupy 1 [Kubiszewski & Worch, 2020]. TMD z różnych grup filogenetycznych HA prawdopodobnie różnią się także ustawieniem α helis w homotrimerze. Mniejsze upakowanie homotrimeru TMD hemaglutyniny z podtypu H6 (grupa 1) umożliwiło cięcie proteolityczne białka przez enzym restrykcyjny w tym regionie. Podczas gdy cięcie proteolityczne w rejonie TMD nie było obserwowane dla hemaglutyniny z grupy 2 [Kordyukova i wsp., 2011].

Główną funkcją TMD jest kotwiczenie całego białka HA w błonie, zarówno przed, jak i po procesie fuzji. Oprócz kotwiczenia białka w błonie lipidowej, TMD pełni istotną rolę w procesie fuzji. P FP indukuje hemifuzję, a z kolei TMD jest wymagana do pełnej fuzji wirusa grypy. Początkowo udział TMD w fuzji był pomijany [Barrett & Dutch, 2020]. Jednak w latach 90' przeprowadzono badania, w których zastępowano sekwencję TMD na GPI (glikozylofosfatydyloinozytol) oraz wykorzystywano mutantu HA z krótszą wersją TMD. Wymienione zmiany w sekwencji HA powodowały utratę zdolności białka do pełnej fuzji,

dochodziło tylko do hemifuzji [Kemble i wsp., 1994; Nüssler i wsp., 1997; Armstrong i wsp., 2000]. Dalsze badania wykazały, że wymagane jest co najmniej 17 reszt aminokwasowych TMD do zachowania procesu pełnej fuzji [Melikyan i wsp., 1999]. Natomiast zmiana natywnej sekwencji TMD hemaglutyniny na inną wirusową TMD nie wpłynęła na funkcję fuzyjną białka [Schroth-Diez i wsp., 1998]. Wydaje się, że do procesu fuzji nie jest wymagana specyficzna sekwencja aminokwasowa domeny w białku HA, TMD jest jednak niezbędna do inicjacji procesu przejścia pomiędzy hemifuzją a pełną fuzją. Mimo że TMD z podtypów HA należących do dwóch różnych grup znacznie różnią się od siebie, niewiele jest doniesień na temat badań, które porównują TMD z dwóch różnych grup filogenetycznych.

Pomimo że długość sekwencji TMD potrzebna do aktywności fuzyjnej HA została określona, mechanizm działania domeny transbłonowej pozostaje nadal nieznany. Jedną z hipotez zakłada, że synergiczne oddziaływanie pomiędzy FP i TMD umożliwia przejście z etapu hemifuzji do pełnej fuzji [Chang i wsp., 2008]. Zaproponowano, że interakcje pomiędzy FP:TMD mogą wpływać na proces fuzji, ponieważ w czasie hemifuzji FP oraz TMD znajdują się blisko siebie. W literaturze pojawiają się jednak sprzeczne doniesienia co do obecności tego oddziaływania. Chang i wsp. [2008] oraz Lai i Freed [2015] wskazują na słabe oddziaływanie pomiędzy FP i TMD. W badaniach peptydy odpowiadające FP i TMD wspólnie powodowały większe zaburzenie w strukturze błony niż każdy z nich osobno [Lai & Freed, 2015]. Z drugiej strony, Ranaweera i wsp. [2019], przy użyciu spektrometrii masowej HDX-MS (ang. *hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry*), wykazali brak kompleksów FP:TMD [2019]. Obecność oddziaływania FP:TMD w HA pozostaje wciąż nierozstrzygnięta. Potrzebne są dalsze badania, aby ustalić obecność oddziaływania FP:TMD oraz jego wpływ na proces fuzji.

Innym proponowanym mechanizmem działania TMD, który mógłby prowadzić do fuzji, jest oddziaływanie samej domeny z lipidami. Niektórzy badacze sugerują, że TMD oddziałując z lipidami może indukować zmianę ich uporządkowania (ang. *membrane lipid order*), co w konsekwencji może ułatwiać fuzję. Na przykład Tatulian i Tamm [2000] pokazali, że TMD (podtyp H3) powoduje zwiększenie uporządkowania lipidów i indukuje tworzenie uporządkowanych domen w błonie. Ge i Freed [2011] zasugerowali, że zwiększenie uporządkowania lipidów koreluje z dehydratacją powierzchni błony, co zmniejsza odpychanie hydratacyjne i umożliwia fuzję błon.

Oprócz wpływu na uporządkowanie lipidów, TMD może również indukować zmiany struktury błony, takie jak powstawanie krzywizn. Badania Ranaweery i wsp. [2019] wykazały, że obecność TMD z (podtypu H3) może indukować powstanie krzywizny dodatniej błony (ang. *positive membrane curvature*). Obecność dodatniej krzywizny błony wewnętrznego listka koreluje z przejściem pomiędzy hemifuzją a powstaniem poru fuzyjnego [Melikyan i wsp., 1997a]. TMD prawdopodobnie obniża barierę energetyczną procesu tworzenia poru, tym

samym pomaga w przejściu z fazy hemifuzji do pełnej fuzji [Pabis i wsp., 2020]. Jednak mechanizm działania domeny transbłonowej na błonę nie został do końca poznany.

Alternatywna hipoteza mechanizmu działania zakłada, że TMD może determinować konfigurację ektodomeny, pośrednio wpływając na aktywność fuzyjną białka [Barrett & Dutch, 2020]. Dotychczas opublikowano tylko jedną strukturę białka zawierającą TMD, jest to HA podtypu H1 [Benton i wsp., 2018]. Wyniki tych badań sugerują, że TMD wraz z elementem łączącym (ang. *linker*), wpływają na nachylenie ektodomeny względem błony. Mieści się ono w zakresie od 0° do 52°. Co istotne, ustawienie helisy TMD w homotrimerze, zmienia się w zależności od orientacji ektodomeny [Benton i wsp., 2018]. Zaobserwowano, że w przypadku, gdy HA jest związana z przeciwciałem blokującym infekcyjność wirusa, nachylenie ektodomeny jest mniejsze i wynosi od 0° do 20°. Zmniejszenie dostępnych orientacji ektodomeny prawdopodobnie zahamowało proces fuzji. Nie jest do końca jasne, czy za orientację ektodomeny odpowiadają zmiany ustawienia helis TMD w homotrimerze, czy udział łącznika. Prawdopodobnie swoboda konformacyjna ektodomeny jest istotnym elementem, który odpowiada za proces fuzji. Pelen mechanizm tego procesu nie został jednak nadal wyjaśniony, dlatego konieczna jest kontynuacja badań z peptydami oraz z całym białkiem HA. Warto także wziąć pod uwagę różnice w strukturze TMD z różnych grup filogenetycznych, które mogą mieć wpływ na aktywność fuzyjną całego białka.

1.4.4. Rola acetylacji oraz ogona cytoplazmatycznego (CT) w fuzji

Większość znanych podtypów HA ulega acetylacji w trzech miejscach w rejonie TMD oraz ogona cytoplazmatycznego (CT). Do reszt cysteiny na końcu sekwencji TMD przyłączana jest reszta kwasu stearynowego lub palmitynowego, podczas gdy dwie reszty cysteiny znajdujące się w rejonie CT ulegają palmitynacji [Kordyukova i wsp., 2008; Veit i wsp., 2013]. Dotychczasowe wyniki badań dotyczące roli acetylacji w procesie fuzji są niejednoznaczne.

W badaniach dotyczących roli acetylacji w fuzji używano modelu, w którym HA z mutacjami acetylacji ulegały ekspresji w komórkach eukariotycznych. Wykorzystano test fuzji między komórkami zawierającymi HA i komórkami bez HA. Następnie porównywano aktywność komórek z deacetylowanymi HA z aktywnością komórek z HA bez mutacji. Seria eksperymentów wykazała, że acetylacja jest istotna dla aktywności fuzyjnej zarówno dla HA z grupy 1, jak i 2, jednak wyniki nie były jednoznaczne dla wszystkich podtypów. W przypadku podtypów H1, H2, H7 mutacje acetylowanych reszt skutkowały zahamowaniem fuzji [Naeve & Williams, 1990; Sakai i wsp., 2002; Wagner i wsp., 2005]. Natomiast deacetylacja reszt aminokwasowych podtypu H3 nie spowodowała zmian w aktywności fuzyjnej pomiędzy komórkami [Steinhauer i wsp., 1991].

W alternatywnym eksperymencie wykorzystano metodę, w której użyto cząstki wirusopodobne VLP (ang. *virus-like particle*,) zawierające deacylowane HA (podtypu H1 lub H3) [Chlanda i wsp., 2017]. VLP to cząstki, które przypominają wirusy i posiadają białka powierzchniowe wirusa ale nie zawierają wirusowego materiału genetycznego. Cząstki wirusopodobne zawierające HA mogą ulegać fuzji z błonami. W teście fuzji pomiędzy VLP a liposomami zaobserwowano pełną fuzję zarówno dla VLP z deacylowanymi HA podtypu H1 jak i H3 [Chlanda i wsp., 2017]. Różnice w wynikach eksperymentów mogą być związane z zastosowaniem różnych modeli fuzji: fuzji pomiędzy komórkami oraz cząstkami VLP i liposomami. Co istotne, acetylacja wydaje się specyficzna dla podtypu HA. Tabela 1 podsumowuje wyniki eksperymentów z mutacjami wszystkich reszt aminokwasowych ulegających acetylacji HA, z podziałem na podtypy opisane w literaturze.

C-końcowy fragment HA CT i jego wpływ na proces fuzji zostały dotychczas przebadane w niewielkim stopniu. W eksperymentach z fuzją pomiędzy komórkami pokazano, że sam CT nie wpływał na kinetykę oraz wielkość poru fuzyjnego [Melikyan i wsp., 1997b]. Natomiast symulacje molekularne wykazały, że obecność CT jest konieczna do przejścia pomiędzy konfiguracją prostą trzech TMD do konformacji nachylonej [Michalski & Setny, 2023a]. Sugeruje to, że CT może wpływać pośrednio na konfigurację TMD i tym samym na fuzję wirusa grypy, nie zostało to jednak dotychczas przebadane eksperymentalnie.

Tabela 1 Podsumowanie eksperymentów z mutacjami wszystkich reszt aminokwasowych ulegającym acetylacji w hemaglutyniny (HA) z podziałem na podtypy.

Podtyp HA	Metoda badania fuzji	Fuzja	Referencja
H1, H2, H7	fuzja między komórkami syntezującymi HA a komórkami bez HA	-	[Sakai i wsp., 2002], [Naeve & Williams, 1990], [Wagner i wsp., 2005]
H3	fuzja między komórkami syntezującymi HA a komórkami bez HA	+	[Steinhauer i wsp., 1991]
H1	fuzja pomiędzy cząstkami VLP z HA a liposomami	+	[Chlanda i wsp., 2017]
H3	fuzja pomiędzy VLP z HA a liposomami	+	[Chlanda i wsp., 2017]

Gdzie: (-) oznacza zahamowanie fuzji, (+) zachowana aktywność fuzja

1.5. Rola składu lipidowego w fuzji wirusa grypy

Aktywność fuzyjna HA zależy od składu lipidowego dwóch błon uczestniczących w fuzji: błony wirionu i błony endosomalnej. Dwa kluczowe fragmenty HA, czyli FP i TMD, odgrywają w tym procesie różne role i oddziałują z innymi błonami. Podczas gdy FP oddziałuje z lipidami późnych endosomów, inicjując fuzję, TMD umożliwia przejście z hemifuzji do pełnej fuzji. Oprócz tego TMD odpowiada za zakotwiczenie w błonie wirionu i jednocześnie wpływa na jej skład lipidowy.

1.5.1. Rola cholesterolu w fuzji wirusa grypy

Cholesterol jest jednym z najważniejszych lipidów wpływających na aktywność fuzyjną zarówno całego białka HA, jak i FP. Warto podkreślić, że błona otoczki wirionu zawiera około 50% cholesterolu, a w późnych endosomach, z którymi oddziałuje FP zaobserwowano występowanie domen bogatych w cholesterol [Sobo i wsp., 2007]. Rolę tego lipidu w fuzji błon potwierdzają badania Biswasa i wsp. [2008], w których stwierdzono zależność indukcji fuzji wywoływanej przez HA (podtyp H3) od obecności cholesterolu. Z kolei Domańska i wsp. [2013] pokazali, że niskie stężenie cholesterolu w dwóch błonach ulegających fuzji skutkuje zahamowaniem procesu fuzji wirusa grypy. Podobnie sam FP wykazywał większą aktywność fuzyjną w błonie z cholesterolem [Worch i wsp., 2017].

Cholesterol może wpływać na fuzję przez zmianę struktury błony lipidowej, jak i oddziaływanie z białkami fuzyjnymi przez motywy cholesterolowe. Pokazano, że cholesterol zmienia grubość i płynność błony oraz indukuje powstanie krzywizn ujemnych, które promują hemifuzję [Yang i wsp., 2016]. Dokładny mechanizm, w jaki sposób cholesterol wpływa na aktywność fuzyjną nie został dotychczas poznany. Prawdopodobnie zarówno oddziaływanie FP, oraz TMD z cholesterolem mają wpływ na aktywność fuzyjną białka HA.

1.5.2. Lokalizacja hemaglutyniny w błonie komórkowej

Lokalizacja HA w błonie komórkowej zainfekowanej komórki jest kluczowa dla miejsca składania wirusa i tym samym dla składu lipidowego otoczki wirionu [Leser & Lamb, 2005]. Hemaglutynina należy do białek błonowych, które jako jedne z pierwszych były powiązane z domenami bogatymi w cholesterol i sfingomielinę, zwanymi tratwami lipidowymi [Skibbens i wsp., 1989; Simons & Kai, 1997]. We wczesnych badaniach nad HA zaobserwowano, że białko lokalizuje się we frakcjach nierozpuszczalnych w detergentach DRM, które są modelem tratw lipidowych [Skibbens i wsp., 1989]. Obecność HA w frakcji DRM została wykryta zarówno dla HA z podtypów z grupy filogenetycznej 1, jak i 2. Wykazano, że większość białka HA z podtypów H3, H2 i H1 znajdowało się w frakcjach DRM [Takeda i wsp., 2003; Tall i wsp.,

2003; Leser & Lamb, 2005; Ohkura i wsp., 2014]. Co więcej, za pomocą mikroskopii elektronowej oraz superrozdzielczej mikroskopii FPALM (ang. *fluorescence photoactivation localization microscopy*) badacze pokazali, że HA (podtyp H2) lokalizuje się w komórkach w domenach o wielkości od 40 nm do wielu μm [Hess i wsp., 2005; Hess i wsp., 2007].

Do lepszego zrozumienia preferencyjnej lokalizacji HA w błonie naukowcy zastosowali modele błon lipidowych, które zawierały fazy ciekłokrystaliczne uporządkowane L_o (model tratw lipidowych) i ciekłokrystaliczne nieuporządkowane L_d . W eksperymentach użyto sztuczny model błon lipidowych: liposomy GUV oraz pęcherzyki błony plazmatycznej GPMV pozyskane z komórek. HA (podtypu H7, H2) lokalizowały się w domenach nieuporządkowanych L_d zarówno w liposomach GUV, jak i w GMPV [Nikolaus i wsp., 2010; Wilson i wsp., 2015]. Z kolei symulacje molekularne z HA (podtyp H3) pokazały, że białko to znajduje się pomiędzy fazami L_o i L_d [Parton i wsp., 2013]. Badania z DRM oraz mikroskopowe potwierdzają lokalizację HA z obu grup filogenetycznych w tratwach lipidowych. Natomiast w modelach błon zawierających domeny L_o i L_d lokalizacja białka w danej domenie może zależeć od podtypu HA. Do lepszego zrozumienia lokalizacji HA w błonie komórkowej kluczowe jest wzięcie pod uwagę różnic pomiędzy podtypami HA.

1.5.3. Rola TMD i acetylacji w lokalizacji hemaglutyniny

Umiejscowienie HA w błonie komórkowej zależy przede wszystkim od fragmentu białka TMD oraz acetylacji reszt cysteinowych [Scheiffele i wsp., 1997; Melkonian i wsp., 1999]. Zmiana sekwencji TMD z białka HA (podtyp H2) na sekwencje TMD pochodzącą z innego białka transbłonowego, które nie pośredniczy w fuzji, skutkuje brakiem HA we frakcji DRM [Melikyan i wsp. 1999].

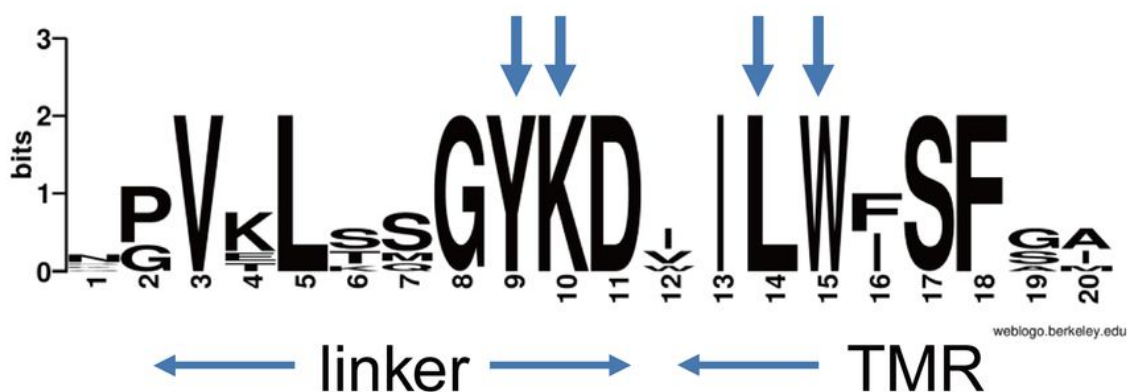
Warto zauważyć, że sekwencje aminokwasowe TMD HA z grup filogenetycznych 1 oraz 2 znacznie różnią się od siebie. Kluczowa w lokalizacji hemaglutyniny z grupy 2 w błonie wydaje się obecność w sekwencji łącznika oraz TMD reszt aminokwasowych, które potencjalnie mogą oddziaływać z cholesterolem [de Vries i wsp., 2015; Hu i wsp., 2019]. W sekwencji aminokwasowej HA z grupy 2 wykryto motyw wiążący cholesterol CCM (ang. *cholesterol consensus motif*) [Hanson i wsp., 2008]. CCM jest sekwencją F/Y-R/K-I/V/L-Y/W, w której reszty aminokwasowe znajdujące się na dwóch helisach transbłonowych oddziałują z cholesterolem (Rycina 10) [De Vries i wsp., 2015]. Mutanty HA (podtyp H7) z zamienionym motywem CCM na reszty alaniny charakteryzowały się zmniejszoną lokalizacją w tratwach lipidowych, i w mniejszym stopniu wiązało się z odpowiednikiem cholesterolu [Engel i wsp., 2010; de Vries i wsp., 2015; Hu i wsp., 2019].

Motyw CCM nie jest obecny w grupie 1 HA, natomiast w tej grupie występuje sekwencja aminokwasowa (Y-K/Q...I-Y), która jest określana jako potencjalny odpowiednik CCM [Hu i

wsp., 2019]. Wymieniona sekwencja znajduje się na końcu regionu łącznika oraz na początku TMD. Mutacje w obrębie tego motywu powodują, że HA (podtyp H2) w mniejszym stopniu lokalizują się we frakcji nierozpuszczalnej w detergencie DRM w porównaniu do białka niezmutowanego [Lin i wsp., 1998]. Zmiana lokalizacji HA sugeruje, że reszty aminokwasowe znajdujące się na początku TMD mogą oddziaływać z cholesterolem, wpływając na umiejscowienie w błonie. Jednakże symulacje molekularne z TMD podtypu H1 wykazały brak specyficznych oddziaływań między TMD a cholesterolem [Michalski & Setny, 2023a].

Właściwości strukturalne TMD mogą również wpływać na lokalizację HA w błonie. Jednym z parametrów opisującym strukturę domen transbłonowych jest współczynnik dostępności powierzchni ASA (ang. *accessible surface area*), który określa stopień ekspozycji reszt aminokwasowych do środowiska lipidowego [Yuan i wsp., 2006]. Badania sugerują, że TMD z mniejszym współczynnikiem ASA preferencyjnie lokalizują się w tratwach lipidowych [Lorent i wsp., 2017]. Analiza porównawcza TMD z podtypów H1 (grupa 1) i H3 (grupa 2) wykazała, że TMD z H1 charakteryzuje się mniejszym współczynnikiem ASA. Wskazuje to, że podtyp H1 bardziej preferencyjnie lokalizuje się w tratwach lipidowych niż podtyp H3 [Kubiszewski-Jakubiak & Worch, 2020].

Poza sekwencją aminokwasową oraz strukturą TMD, za lokalizację HA z grupy 1 w błonie mogą odpowiadać acetylacje. Pokazano, że S-acetylacje są wymagane do lokalizacji HA (podtyp H2) we frakcji DRM [Melkonian i wsp., 1999]. Kwestią nie do końca jasną pozostaje lokalizacja HA w błonie w zależności od podtypów hemaglutyniny z różnych grup filogenetycznych.



Rycina 10 Motyw wiążący cholesterol (CCM) w sekwencjach hemaglutynin należących do grupy 2 (zaznaczony niebieskimi strzałkami). Oryginalna ilustracja z publikacji [Hu i wsp., 2019], za zgodą wydawnictwa. Zgoda udzielona przez Copyright Clearance Center.

1.6. Metody badawcze używane w badaniu błony lipidowej

Charakteryzacja błony lipidowej jest ważnym aspektem badań nad fuzją wirusa grypy. Do najczęściej używanych metod w badaniu błony lipidowej należą metody fluorescencyjne. Ich zaletami są wysoka wrażliwość na bliskie środowisko oraz szerokie możliwości wykorzystania w eksperymentach.

Fluorescencja jest zjawiskiem emisji światła przez cząstkę, która wcześniej absorbowiała światło. W wyniku absorpcji światła cząstka przechodzi ze stanu podstawowego (S_0) do singletowego stanu wzbudzonego (S_1), a następnie powraca do S_0 oddając energię w sposób bezpromienisty lub przez emisję światła (fluorescencja). Cząstka może również przejść ze stanu S_1 do stanu trypletowego (T_1), a następnie tracić energię w sposób promienisty (fosforescencja) lub bezpromienisty i powracać do stanu S_0 . Najważniejszymi właściwościami, używanymi do opisu fluoroforów są wydajność kwantowa oraz czas życia fluorescencji. Wydajność kwantowa jest to stosunek fotonów zaabsorbowanych do wyemitowanych przez fluorofor. Natomiast czas życia fluorescencji opisuje średni czas, w którym fluorofor znajduje się w stanie wzbudzonym [Lakowicz, 2006].

Dzięki obserwacji różnych parametrów fluorescencji, takich jak intensywność fluorescencji w zależności od długości fali i czasu, a także zmiany czasów życia fluorescencji, możliwe jest zbadanie wielu własności fizyko-chemicznych błon lipidowych. Metody fluorescencyjne wykorzystywane są do analizy m.in. mobilności lipidów w błonie, oddziaływania lipidów z białkami, lokalizacji białek błonowych, przeprowadzenia testów fuzji błon, czy do zbadania uporządkowania lipidów. Znajdują zastosowanie zarówno w sztucznych modelach lipidowych, takich jak liposomy czy płaskie monowarstwy błonowe, jak i w badaniach komórkowych [Chen i wsp., 2006; Demchenko i wsp., 2015].

Uzupełnieniem badań błony lipidowej są metody oparte na rozpraszaniu światła, które pozwalają na zbadanie np. wielkości liposomów. Wykorzystanie zarówno metod fluorescencyjnych, jak i rozpraszania światła pozwala na lepsze scharakteryzowanie błon lipidowych [Edwards & Baeumner, 2006].

1.6.1. Mikroskopia FRET-FLIM

Fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*) jest procesem polegającym na bezpromienistym przekazaniu energii między dwiema cząstkami w stanie wzbudzonym donorem i w stanie podstawowym akceptorem, którego spektrum absorpcji pokrywa się ze spektrum emisji donora. FRET zachodzi pomiędzy fluoroforami znajdującymi się w bliskiej odległości od siebie, od około 20 Å do 60 Å. Na wydajność tego procesu wpływają przede wszystkim odległość między donorem

i akceptorem, stopień nakładania się spektrum emisji fluorescencji donora i wzbudzenia akceptora.

Metoda FRET jest powszechnie używana w badaniach biochemicznych oraz biofizycznych do analizy odległości pomiędzy cząstkami, w tym do badania błon biologicznych. Znajduje zastosowanie w testach fuzji błonowej oraz lokalizacji białek w błonie. Wydajność FRET można określić za pomocą zmian czasów życia fluorescencji donora przy obecności akceptora [Lakowicz, 2006; Loura & Prieto, 2011].

Wydajność przeniesienia energii FRET jest opisana za pomocą wzoru:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1.1)$$

Gdzie: τ_D - czas życia fluorescencji donora przy braku obecności akceptora, R_0 - odległość Förstera, odległość, przy której transfer energii zachodzi z wydajnością 50%, r - odległość donora do akceptora

Mikroskopia czasów życia fluorescencji FLIM (ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy*), jest to technika obrazowania, w której analizowane są czasy życia fluorescencji fluoroforów. W eksperymentach czasowo-rozdzielczych FLIM rejestruje się krzywe zaniku intensywności fluorescencji po wzbudzeniu próbki pulсовым źródłem światła, osobno dla każdego piksela. W celu wyznaczenia czasów życia fluorescencji do zarejestrowanej krzywej dopasowuje się funkcję eksponentialną zaniku zgodnie ze wzorem [Lakowicz, 2006; Periasamy & Mazumder, 2015].

$$I(t) = \sum_i Amp_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad (1.2)$$

Gdzie: Amp_i - amplituda składowej i , τ_i - czas życia fluorescencji składowej i , i - liczba składowych

Czas życia fluorescencji barwników jest wrażliwy na zmiany w środowisku, takie jak polarność, uporządkowanie lipidów i oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami [Stöckl i wsp., 2008; Berezin & Achilefu, 2010]. Parametr ten jest niezależny od stężenia barwnika, intensywności fluorescencji czy zjawiska fotowysbielenia, co czyni go użytecznym w badaniach biologicznych. Nawet niewielkie zmiany w środowisku mogą prowadzić do wykrywalnych różnic w czasie życia fluorescencji.

Metoda FLIM-FRET pozwala na analizę wydajności transferu energii na podstawie pomiaru czasów życia fluorescencji fluoroforu. W eksperymentach obserwuje się skrócenie czasu życia fluorescencji donora w obecności akceptora, w wyniku FRET. W przeciwieństwie

do pomiarów FRET, w których analizuje się zmiany w intensywności sygnału, zaletą FLIM-FRET jest niezależność od zjawiska fotowysbielenia czy różnic w stężeniu fluoroforów [Lakowicz, 2006]. Metoda FLIM-FRET jest używana w badaniach błon biologicznych, m.in. fuzji wirusowej [Carlon-Andres & Padilla-Parra, 2020].

1.6.2. Spektroskopia korelacji fluorescencji FCS

Spektroskopia korelacji fluorescencji FCS (ang. *fluorescence correlation spectroscopy*) polega na śledzeniu fluktuacji sygnału fluorescencji emitowanego przez pojedyncze cząstki. Fluktuacje te wynikają ze swobodnej dyfuzji cząstek, które losowo wchodzi i wychodzi z objętości pomiarowej. Metoda ta pozwala m.in. na zbadanie dyfuzji translacyjnej oraz wyznaczenie współczynnika dyfuzji cząstki.

Aby możliwa była obserwacja pojedynczych cząstek, wymagane jest zastosowanie bardzo niskiego stężenia barwnika (0,1-100 nM) oraz małej objętości pomiarowej (rzędu femtolitrów). W ten sposób ogranicza się liczbę analizowanych cząstek do kilku w niewielkim obszarze detekcji [Petrov & Schwille, 2008]. Niewielką objętość pomiarową uzyskuje się dzięki zastosowaniu mikroskopu konfokalnego, w którym przyjmuje ona kształt elipsoidy (Rycina 11A) i opisana jest za pomocą funkcji:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} \omega_0^2 z_0 \quad (1.4)$$

Gdzie: ω_0 , z_0 - półosie elipsoidy

Pomiar FCS opiera się na obserwacji fluktuacji sygnału fluorescencji w czasie, które są następnie analizowane za pomocą korelatora, który generuje krzywą autokorelacji (Rycina 11B). Analiza polega na porównaniu sygnału początkowego do sygnału po niewielkim okresie czasu (poniżej mikrosekund). Fluktuacje sygnału pochodzące od swobodnie dyfundujących cząstek wykazują korelację w czasie, w przeciwieństwie do szumu. Podczas pomiaru korelator oblicza krzywą autokorelacji zgodnie ze wzorem:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(0)F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} - 1 \quad (1.3)$$

Gdzie: $F(t)$ - intensywność fluorescencji, τ - czas korelacji

Do otrzymanej krzywej dopasowuje się odpowiedni model funkcji autokorelacji, który pozwala na wyznaczenie czasu dyfuzji cząstek (τ_d). W przypadku eksperymentów, w których bada się swobodną dyfuzję cząstek w roztworze w modelu uwzględnia się wkład dyfuzji

translacyjnej oraz wpływ przejścia fluoroforu w stan trypletowy (Równanie 1.4). W wyniku przejścia fluoroforu ze stanu singletowego (S_1) w stan trypletowy (T_1) pojawiają się dodatkowe fluktuacje w sygnale, które należy uwzględnić, żeby prawidłowo wyznaczyć parametry dyfuzji. Zjawisko to powszechnie występuje dla organicznych barwników w stanie wzbudzonym, dlatego konieczne jest uwzględnienie tego parametru w funkcji autokorelacji [Schönle i wsp., 2014]. Poniżej podano model funkcji autokorelacji dla eksperymentów w trójwymiarowej przestrzeni, dla jednego fluoroforu [Weidemann & Schwille, 2009]:

$$G(\tau) = 1 + G_t * G_d \quad (1.4)$$

$$G_t = 1 + \frac{f_T}{1 - f_T} \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_T}\right) \quad (1.5)$$

$$G_d = \frac{1}{cV_{eff}} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_D}\right)^{1/2}} \quad (1.6)$$

Gdzie: G_t - autokorelacja trypletu, G_d - autokorelacja dyfuzji translacyjnej, f_T - intensywność fluorescencji trypletu, τ - czas korelacji, τ_T - czas dyfuzji trypletu, c - stężenie barwnika fluorescencyjnego, V_{eff} - objętość pomiarowa, τ_D - czas dyfuzji fluoroforu, κ - parametr strukturalny $\kappa = z_0/\omega_0$

W przypadku eksperymentów w błonie lipidowej, pomiary są wykonywane w dwuwymiarowej przestrzeni. Dla jednego fluoroforu w dwuwymiarowej przestrzeni stosuje się model matematyczny funkcji autokorelacji:

$$G(\tau) = 1 + \left(1 + \frac{f_T}{1 - f_T} \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_T}\right)\right) * \frac{1}{cV_{eff}} * \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \quad (1.8)$$

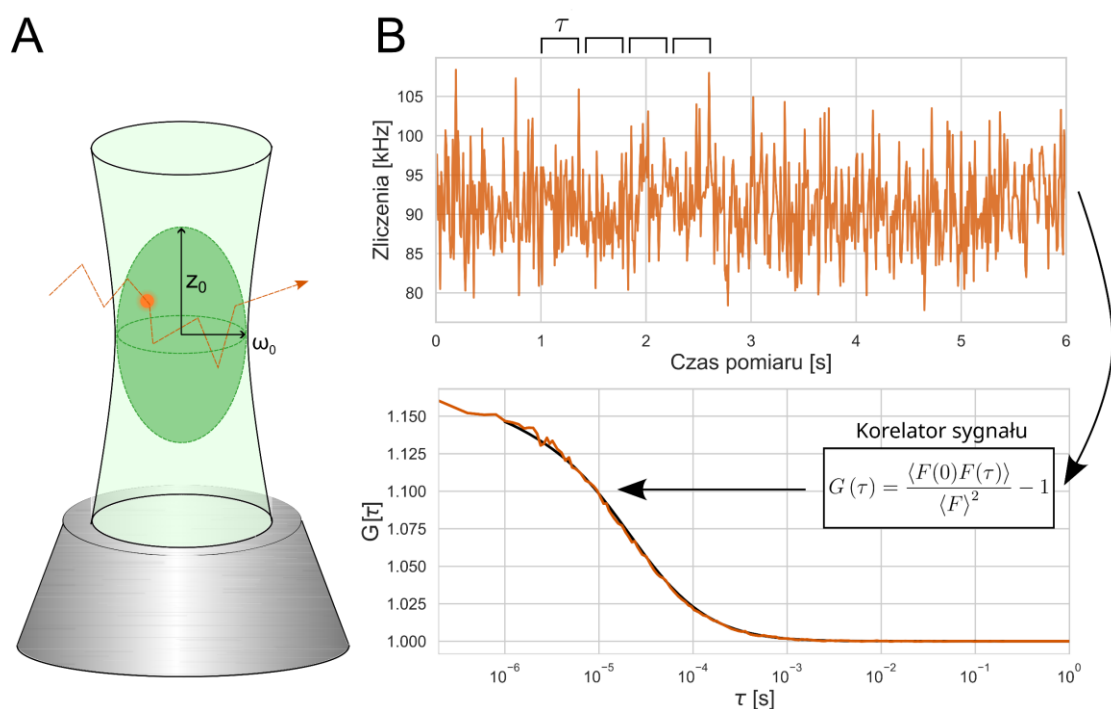
Gdzie: f_T - intensywność fluorescencji trypletu, τ - czas korelacji, τ_T - czas dyfuzji trypletu, c - stężenie barwnika fluorescencyjnego, V_{eff} - objętość pomiarowa, τ_D - czas dyfuzji fluoroforu

Na podstawie pomiarów FCS możliwe jest wyznaczenie współczynnika dyfuzji cząstki (D), która oblicza się w oparciu o czas dyfuzji oraz wartości promienia bocznego objętości pomiarowej (ω_0) zgodnie ze wzorem:

$$\omega_0 = \sqrt{4\tau_d D} \quad (1.7)$$

Gdzie: D- współczynnik dyfuzji ($\mu\text{m}^2/\text{s}$), τ_d czas dyfuzji (μs), ω_0 - promień boczny (μm)

Koncepcja techniki została pierwotnie sformułowana przez Magdego i wsp. [1972] do obserwacji fluktuujących cząstek w roztworze koloidalnym. Obecnie metoda FCS jest szeroko stosowana w biologii do badania dynamiki cząstek. Oprócz dyfuzji opisanej w tym rozdziale, może być stosowana do analizy transportu aktywnego, stechiometrii chemicznej, oddziaływań pomiędzy dwoma fluoroforami m.in. oligomeryzacji białek. Metoda znajduje również zastosowanie w pomiarach mobilności białek oraz lipidów w błonach lipidowych. FCS może być wykorzystywana w badaniach in vitro jak i in vivo m.in. w roztworach, komórkach oraz organizmach modelowych (ryby i muszki owocowe) [Sankaran & Wohland, 2023]. Do zalet tej techniki należy wysoka czułość rzędu pojedynczych cząstek oraz możliwość obserwacji dynamiki cząstek [Petrov & Schwille, 2008; Weidemann & Schwille, 2009].



Rycina 11 Schemat ilustrujący zasadę działania techniki FCS, A) Objętość pomiarowa w kształcie elipsoidy, z_0 , ω_0 – półosie elipsoidy, B) Przykładowy pomiar fluktuacji fluorescencji w czasie, wzór na krzywą autokorelacji obliczoną podczas eksperymentu za pomocą korelatora sygnału oraz krzywa autokorelacji (pomarańczowa) z dopasowaną funkcją autokorelacji (czarna). Rysunek autorski na podstawie [Weidemann & Schwille, 2009].

1.6.3. Dynamiczne rozpraszanie światła DLS

Dynamiczne rozpraszanie światła DLS (ang. *dynamic light scattering*) to technika umożliwiająca pomiar wielkości cząstek w roztworze, jest wykorzystywana m.in. do mierzenia wielkości liposomów. W metodzie tej wykorzystuje się zjawisko rozpraszania światła, które polega na zmianie kierunku rozchodzenia się światła w wyniku oddziaływania fotonów z cząstkami obecnymi w roztworze.

W metodzie DLS obserwuje się czasowe fluktuacje intensywności rozproszonego światła, które wynikają z przypadkowych ruchów cząstek w roztworze zwanymi ruchami Browna. Wykorzystywana jest zależność, że mniejsze cząstki dyfundują szybciej, generując większe fluktuacje sygnału niż większe cząstki (Rycina 12a). Do analizy tych fluktuacji, podobnie jak w metodzie FCS omawianej w poprzednim rozdziale, wykorzystuje się funkcje autokorelacji. Jeżeli cząstki są duże, sygnał zmienia się powoli, a korelacja utrzymuje się przez dłuższy czas. Natomiast dla mniejszych cząstek korelacja zanika szybciej (Rycina 12b). Na podstawie dopasowanej funkcji autokorelacji intensywności rozproszonego światła możliwe jest określenie współczynnika dyfuzji cząstek w roztworze [Stetefeld i wsp., 2016].

Następnie wyznaczany jest promień hydrodynamiczny, zdefiniowany jako średnica kuli, która porusza się z taką samą prędkością dyfuzji jak badana cząstka. Zależność między promieniem hydrodynamicznym a współczynnikiem dyfuzji translacyjnej jest opisana równaniem Stokesa-Einsteina:

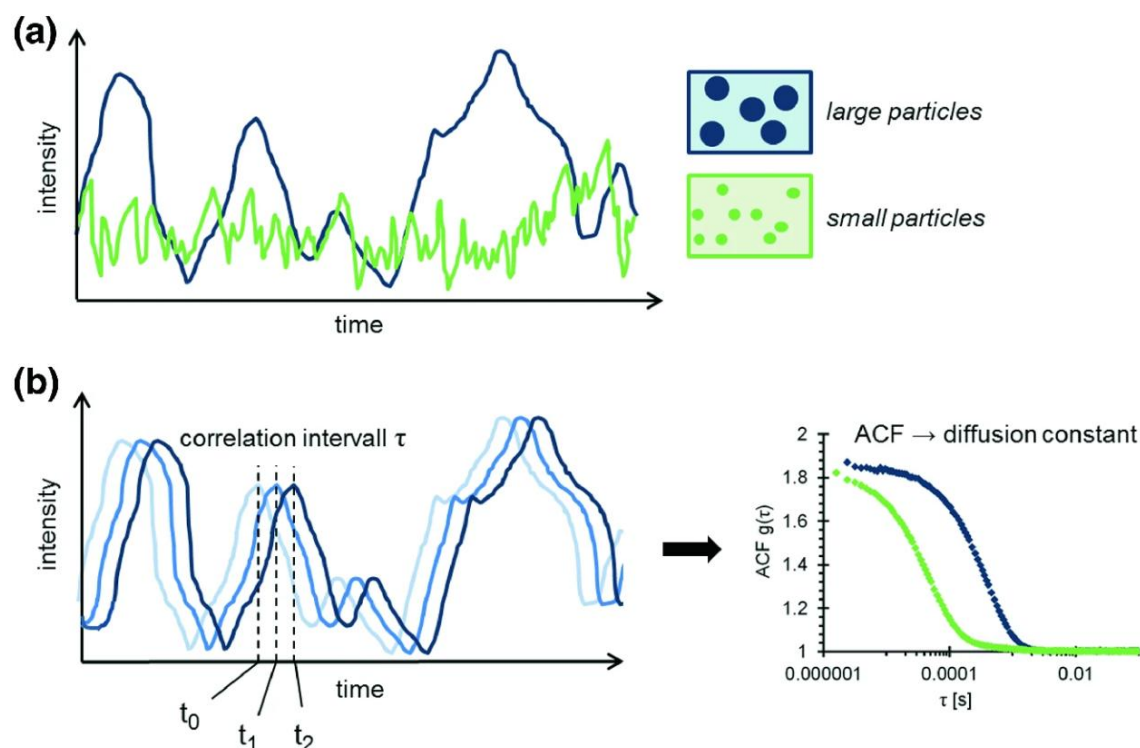
$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (1.9)$$

Gdzie: $d(H)$ - promień hydrodynamiczny cząstki, k_B - stała Boltzmanna, T - temperatura, D - współczynnik dyfuzji translacyjnej, η - lepkość roztworu

W zależności od wielkości cząstek, do lepszego scharakteryzowania ich wielkości stosuje się teorię rozpraszania światła Rayleigha oraz Mie. Rozpraszanie światła przez małe cząstki, których rozmiar wynosi poniżej 1/10 długości fali, jest opisane przez teorię Rayleigha. Zgodnie z teorią Rayleigha rozpraszanie światła jest procesem izotropowym i zależnym od wielkości cząstek. Natomiast dla cząstki o wielkości zbliżonej do długości fali światła stosuje się teorię Mie. W tym przypadku wykres intensywności rozproszonego światła tworzy złożoną funkcję maksimów i minimów, która jest zależna od kąta rozpraszania [Stetefeld i wsp., 2016].

Do bardziej precyzyjnych pomiarów wielkości cząstek wykorzystuje się wielokątowe dynamiczne rozpraszanie światła MADLS (ang. *multi-angle dynamic light scattering*). W przypadku pomiarów DLS fluktuacje intensywności światła w czasie obserwuje się pod jednym kątem, najczęściej wstecznym, około 170°. Metoda MADLS pozwala na dokładniejszy pomiar

wielkości cząstek oraz analizę ich liczby w roztworze na podstawie rozpraszania światła pod trzema kątami [Bryant i wsp., 1995; Austin i wsp., 2020].



Rycina 12 Zasada pomiaru dynamicznego rozpraszania światła (DLS), a) Intensywność rozproszonego światła w czasie dla małych oraz dużych cząstek, b) Funkcja autokorelacji dla przykładowych małych oraz dużych cząstek. Oryginalna ilustracja z publikacji [Falke & Betzel, 2019], za zgodą wydawnictwa. Zgoda udzielona przez Copyright Clearance Center.

2. Cele pracy

Proces fuzji wirusa grypy z błoną późnych endosomów jest indukowany przez hemaglutyninę, białko powierzchniowe wirusa. Pomimo wielu badań, mechanizm tego procesu nadal pozostaje niewyjaśniony. Do najważniejszych fragmentów HA, które biorą udział w fuzji, należą FP i TMD. Pokazano, że obecność zarówno FP, jak i TMD jest konieczna do przeprowadzenia pełnej fuzji wirusowej. Podczas gdy FP oddziałuje z lipidami błony późnych endosomów i inicjuje hemifuzję, rola TMD w tym procesie pozostaje słabo poznana. Co istotne, podczas gdy sekwencje aminokwasowe FP są zachowane w toku ewolucji wśród dwóch grup filogenetycznych HA, sekwencje TMD wykazują znaczne różnice, pełniąc jednocześnie tę samą funkcję. Mechanizm, w jaki sposób TMD umożliwia przejście z hemifuzji do pełnej fuzji, jest nieznany.

Jedna z hipotez, przedstawiona przez Changa i wsp. [2008], zakłada, że bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy FP i TMD prowadzi do pełnej fuzji wirusa grypy. Jednak możliwość takiego oddziaływania nie została jednoznacznie potwierdzona. Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zweryfikowanie możliwości oddziaływania FP:TMD oraz zbadanie jego roli w procesie fuzji. W związku z tym przedstawiono następującą hipotezę badawczą: Domena transbłonowa oddziałuje z peptydem fuzyjnym hemaglutyniny w sposób synergiczny, co prowadzi do zwiększonej aktywności fuzyjnej peptydu fuzyjnego.

W celu weryfikacji przedstawionej hipotezy zaplanowano cele szczegółowe:

1. Zweryfikowanie, czy syntetyczne peptydy odpowiadające sekwencjom aminokwasowym TMD z podtypów H1 i H3 są wbudowane w błonę lipidową.
2. Zbadanie aktywności błonowej oraz fuzyjnej indywidualnych peptydów FP i TMD oraz ich mieszanek.
3. Zbadanie wpływu peptydów FP,TMD oraz mieszanek FP i TMD na uporządkowanie lipidów.

Dodatkowym celem pracy było zbadanie różnic pomiędzy TMD pochodzącymi z dwóch różnych grup filogenetycznych (podtypów H1 oraz H3) HA. Dalekosiężnym celem pracy było zrozumienie roli TMD w procesie fuzji wirusa grypy indukowanej przez HA.

3. Materiały i metody

3.1. Stosowane odczynniki, bufony oraz lipidy

Odczynniki chemiczne stosowane w eksperymentach przedstawia Tabela 2.

Tabela 2 Odczynniki chemiczne

Odczynnik	Producent
Akrylamid	Sigma
Chlorek sodu NaCl	Sigma
Chlorek wapnia CaCl ₂	Sigma
Chloroform	Merck
Etanol	Merck
HEPES	Roth
Kwas chromowy	CHEMPUR
Kwas cytrynowy	Roth
Metanol	POCH
N-acetylo-L-tryptofan amid (NATA)	Sigma
N-acetylo-L-tyrozyna (NALT)	SAFC
Sacharoza	Sigma
Triton X-100	Roth
Wodorotlenek sodu NaOH	Sigma

Bufory użyte w eksperymentach przedstawia Tabela 3.

Tabela 3 Spis wykorzystanych buforów

Bufor	Skład buforu
buforu pH 5	10 mM kwas cytrynowy, 150 mM NaCl
bufor pH 5 z wapniem	10 mM kwas cytrynowy, 150 mM NaCl, 3 mM CaCl ₂
bufor pH 7,4	10 mM HEPES, 150 mM NaCl

Listy stosowanych lipidów oraz barwników fluorescencyjnych przedstawia odpowiednio Tabela 4 oraz Tabela 5.

Tabela 4 Spis stosowanych lipidów

Lipid	Producent
Cholesterol	Avanti Polar Lipids
PEG PE	Avanti Polar Lipids
POPC	Avanti Polar Lipids

Wszystkie stosowane lipidy zostały rozpuszczone w roztworze chloroformu.

Tabela 5 Spis stosowanych barwników fluorescencyjnych

Barwnik fluorescencyjny	Producent
Alexa 488	Invitrogen
Atto 488 DOPE	ATTO-TEC
kalceina	Sigma
NBD-PE (16:0 NBD PE)	Invitrogen
C6-NBD-PE (16:0-06:0 NBD PE)	Avanti Polar Lipids
Dansyl-PE	Avanti Polar Lipids
Rh-PE	Invitrogen

Barwniki zostały rozpuszczone w roztworze chloroformu, etanolu lub mieszaninie chloroform:metanol.

3.2. Stosowane peptydy oraz cząstki wirusopodobne VLP

Stosowane syntetyczne peptydy przedstawia Tabela 6.

Tabela 6 Spis stosowanych syntetycznych peptydów razem z sekwencjami aminokwasowymi, molowymi współczynnikiem absorpcji oraz producentem.

Nazwa	Sekwencja aminokwasowa	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Producent
FP	GLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGS GKKKKD	12490	Lipopharm
W14A	GLFGAIAGFIEGGAQGMVDGWYGS GKKKKD	6990	Lipopharm
E11A	GLFGAIAGFIAGGWQGMVDGWYGS GKKKKD	12490	Lipopharm
H1	ILAIYSTVASSLVLV VSLGAIS GKKKKD	1490	Biomatik
H1long	YQILAIYSTVASSLVLV VSLGAIS GKKKKD	2980	Biomatik
H3	LWISFAISCFLLCVALLGFIMSGKKKKD	5500	Biomatik
H3long	GYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIMSGKKKKD	12490	Lipopharm

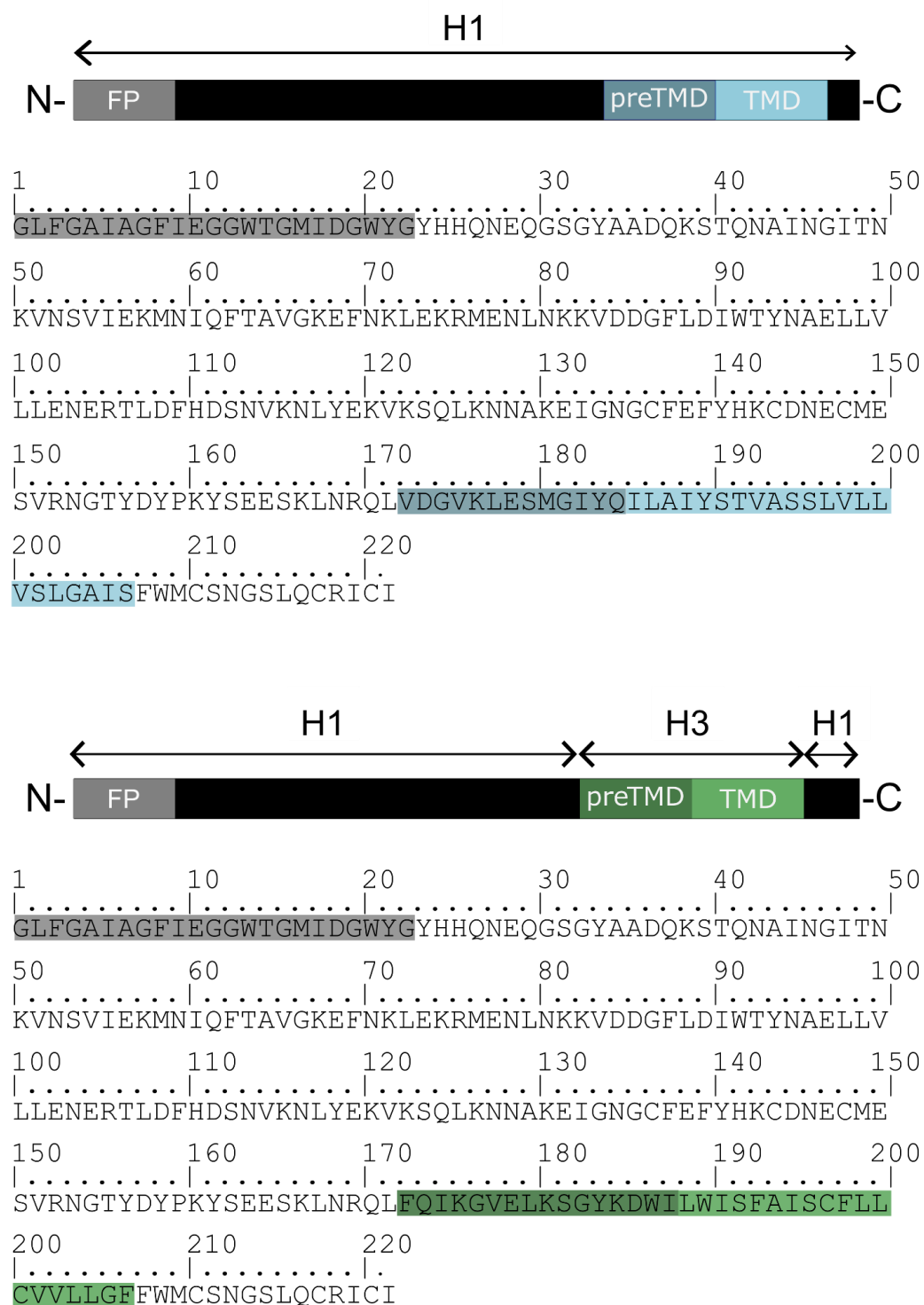
W każdym przypadku peptydy były czyste w >95%. Peptyd FP odpowiada fragmentowi peptydu fuzyjnego z podtypu H2 hemaglutyniny. Peptydy H1 oraz H3 odpowiadają sekwencji aminokwasowej domeny transbłonowej (TMD) hemaglutyniny odpowiednio z podtypów H1 oraz H3. Peptydy H1long oraz H3long zostały wydłużone względem peptydów H1 oraz H3 o dodatkowe reszty aminokwasowe znajdujące się przed sekwencją TMD w regionie łącznika. Przygotowano wodne roztwory 1 mg/ml każdego z syntetycznych peptydów. Następnie zmierzono ich stężenie przy użyciu prawa Lamberta-Beera, mierząc absorbancję przy 280 nm za pomocą spektrofotometru NanoPhotometer NP80 (Implen). Do pomiarów stężenia peptydów stosowano odpowiednich molowych współczynników absorpcji dla każdego peptydu. Do eksperymentów używano 100 μ M roztworów peptydów.

Cząstki wirusopodobne VLP (ang. *virus-like particles*) zostały przygotowane przez dr. Szymona Kubiszewskiego-Jakubiaka we współpracy z dr Łucją Kowalewską oraz Michałem Bykowskim na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Przygotowanie cząstek VLP zostało opisane w artykule [Borkowska i wsp., 2024].

W eksperymentach zostały użyte dwa rodzaje cząstek wirusopodobnych:

- H1-TMD-H1 zawierające hemaglutyninę pełnej długości podtypu H1
- H1-TMD-H3 zawierające hemaglutyninę podtypu H1 z fragmentem TMD pochodzącym z podtypu H3

Sekwencje podjednostki HA2 obecne w cząstkach H1-TMD-H1 oraz H1-TMD-H3 przedstawia Rycina 13. Do zbadania aktywności fuzyjnej cząstek wymagane było cięcie proteolityczne prekursora HA0 na podjednostki HA1 oraz HA2. Przed wykonaniem testów aktywności cząstki wirusopodobne były trawione przez noc w temperaturze 4°C za pomocą proteazy Xa (NEB).



Rycina 13 Sekwencje aminokwasowe podjednostek HA2 hemaglutyniny w cząstkach wirusopodobnych H1-TMD-H1 i H1-TMD-H3, ilustracja autorska.

3.3. Preparatyka liposomów i dwuwarstw lipidowych

3.3.1. Liposomy GUV

Do przygotowania liposomów typu GUV (ang. *giant unilamellar vesicle*) wykonano standardową metodę elektroformacji [Angelova & Dimitrov, 1986]. W tym celu wykorzystano teflonową komorę z platynowymi drutami. Przed każdym użyciem komorę czyszczono w etanolu. W procesie przygotowania na każdy drut nakładano 5 µl mieszanki lipidowej o stężeniu 1 mg/ml. Następnie druty suszono 15 minut pod próżnią. W kolejnym kroku do komory dodawano 300 µl 0,3 M sacharozy i wykonywano elektroformację z następującymi parametrami: prąd zmienny AC 3V (pik do pik) z częstotliwością 10 Hz przez 2 godziny i 2 Hz przez 30 minut. Do obrazowania liposomów przygotowano własnoręcznie wykonane komory. Do przygotowania komór wykorzystano probówki typu eppendorf, które zostały przyklejone do szkiełka (24 × 60 mm, #1,5, Carl Roth) za pomocą kleju optycznego (Norland Optical Adhesive 63). Do każdej komory dodano 250 µl buforu oraz 40 µl liposomów GUV powstałych po elektroformacji. Osmotyczność buforu została dostosowana do osmotyczności 0,3 M sacharozy za pomocą osmometru 800CLG TRIDENT MED S.C., co zapobiegało powstawaniu szoku osmotycznego i rozpadowi liposomów GUV. W każdym przypadku liposomy były przygotowane i obrazowane tego samego dnia.

3.3.2. Liposomy LUV

Liposomy typu LUV (ang. *large unilamellar vesicle*) przygotowano susząc odpowiednią ilość lipidów rozpuszczonych w chloroformie pod strumieniem azotu, a następnie lipidy pozostawiano na 4 godziny pod próżnią do całkowitego wyparowania rozpuszczalnika. Kolejno uwadniano film lipidowy przez 2 godziny z wytrząsaniem za pomocą buforu do finalnego stężenia 5 mg/ml lipidów. W późniejszym etapie liposomy zamrażano w ciekłym azocie i rozmrażano w 55°C na łaźni wodnej. Cykl zamrażania i rozmrażania powtarzano pięciokrotnie. W następnym kroku liposomy przeciskano przez filtr poliwęglanowy o wielkości 100 nm (Whatman) za pomocą ekstrudera Avanti Mini Extruder. Liposomy przeciskano przez filtr 21 razy. Wielkość liposomów sprawdzano za pomocą pomiarów DLS (ang. *dynamic light scattering*). Liposomy były przygotowane i zużywane w przeciągu jednego tygodnia.

3.3.3. Liposomy SUV

Liposomy typu SUV (ang. *small unilamellar vesicle*) przygotowano susząc odpowiednią ilość lipidów rozpuszczonych w chloroformie pod strumieniem azotu. Następnie pozostawiano na 4 godziny pod próżnią do całkowitego wyparowania rozpuszczalnika. Kolejno uwadniano film lipidowy za pomocą buforu do finalnego stężenia 5 mg/ml lipidów. Film uwadniano przez 2 godziny z wytrząsaniem. W późniejszym etapie liposomy sonikowano przez 10 minut

używając sonikatora tipsowego Branson S250D z końcówką ¼ " w cyklu 5 s sonikacji i 5 s paazy z amplitudą 10%. Powstałych po sonikacji osad odwirowano z użyciem wirówki Eppendorf Centrifuge 5403 R. Próbkę wirowano kilkakrotnie przy 19000 x G przez 5 minut. Wielkość liposomów po sonikacji kontrolowano za pomocą pomiarów DLS. Liposomy były przygotowane i zużywane w przeciągu jednego tygodnia.

3.3.4. Dwuwarstwa lipidowa typu SLB

Przygotowanie oraz płukanie błony SLB (ang. *supported lipid bilayer*) zostały zoptymalizowane, co zostało szczegółowo opisane w rozdziale 4.7. Po zoptymalizowaniu procesu błona SLB była przygotowana zgodnie z opisem przedstawionym w tym rozdziale. Początkowo przygotowano liposomy typu LUV zgodnie z procedurą opisaną w 3.3.2. Przygotowano liposomy o składzie POPC/cholesterol/PEG PE (55/40/5 mol%) z barwnikiem fluorescencyjnym Atto 488 DOPE i stężeniu lipidów 1 mg/ml. Do pomiarów FCS używano barwnika Atto 488 DOPE w stężeniu 0,02 mol%, natomiast do obrazowania w stężeniu 0,2 mol%. Przed każdym przygotowaniem błony typu SLB szkiełko czyszczono przez pół godziny w kwasie chromowym. Następnie szkiełko płukano wodą i przyklejano odciętą probówkę typu eppendorf. Następnie na wyczyszczone szkło dodawano 150 µl roztworu składającego się z 130 µl buforu pH 5 z 3 mM CaCl₂ oraz 20 µl liposomów typu LUV. Liposomy inkubowano ze szkiełkiem przez 30 minut. Po inkubacji płukano komorę 20 x 200 µl za pomocą buforu pH 5. Funkcjonalność otrzymanej błony została oceniona przez zbadanie mobilności lipidów za pomocą FCS. Dalej SLB została wykorzystana do zbadania aktywności fuzyjnej cząstek wirusopodobnych.

3.3.5. Pomiar wielkości cząstek za pomocą DLS/MADLS

Pomiary z użyciem dynamicznego rozpraszania światła DLS (ang. *dynamic light scattering*) zostały wykorzystane do zmierzenia średniej wielkości liposomów. Wielokątowe dynamiczne rozpraszanie światła MADLS (ang. *multi-angle light scattering*) pozwoliło na pomiar liczby cząstek na ml. Pomiary DLS oraz MADLS zostały wykonane z użyciem Malvern Zetasizer Ultra. Do każdego pomiaru, zarówno DLS, jak i MADLS wykorzystano 70 µl próbki, która była mierzona w kuwecie 3 x 3 mm (Hellma Analytics), w temperaturze 25°C.

3.4. Testy aktywności peptydów

3.4.1. Badanie wbudowania peptydów w błonę za pomocą FRET

W celu sprawdzenia czy peptydy odpowiadające TMD wbudowują się w błonę, przeprowadzono test oparty o zjawisko FRET [Dennison i wsp. 2009; Zhang i wsp., 2013]. W tym celu przygotowano liposomy typu SUV o składzie POPC zawierające 0,2 mol% dansyl-PE oraz liposomy bez barwnika. Dansyl pełnił funkcję akceptora w błonie. Donorem były aromatyczne reszty aminokwasowe peptydów, odpowiednio reszty tyrozyny (Tyr) dla peptydów H1 i H1long, oraz reszty Trp dla H3 i H3long. Pomiary zostały wykonane na spektrofлуorymetrze Horiba FluoroMax-4 Spectrofluorometer w temperaturze 20°C w kuwecie 4 x 10 mm (Hellma). Fluorescencję wzbudzano odpowiednio przy 280 nm dla Tyr oraz 295 nm dla Trp. Emisję fluorescencji dansyl-PE obserwowano w zakresie 420-540 nm dla Tyr oraz 420-560 nm dla Trp. Peptydy były dodawane w końcowym stężeniu 2 μ M do liposomów o końcowym stężeniu lipidów 100 μ M (1:50 peptyd:lipid). W trakcie eksperymentu zmierzono widma emisji fluorescencji dla liposomów z barwnikiem dansyl-PE w obecności oraz bez odpowiedniego peptydu. Dodatkowo jako tło zmierzono liposomy bez barwnika. Po odjęciu tła od widm fluorescencji intensywność fluorescencji została znormalizowana. Pomiary zostały wykonane w dwóch niezależnych powtórzeniach.

3.4.2. Wygaszanie fluorescencji tryptofanu/tyrozyny za pomocą akrylamidu

Pomiary wygaszania fluorescencji reszt Trp i Tyr pozwoliły na zbadanie dostępności aromatycznych reszt aminokwasowych dla wygaszacza fluorescencji, i tym samym sprawdzenie, czy badane peptydy są transbłonowe [Chang i wsp., 2008]. Do wygaszania fluorescencji użyto akrylamidu, który wygasza fluorescencję zarówno reszt Trp jak i Tyr [Follenius & Gerard, 1983; Aran Terol i wsp. 2015]. Akrylamid nie wygasza wydajnie fluorescencji reszt aromatycznych, które są wbudowane głęboko w błonie na przykład reszt aromatycznych w peptydach transbłonowych [Moro i wsp., 1993]. Początkowo wykonano eksperymenty wygaszania fluorescencji analogów Trp i Tyr odpowiednio N-acetylo-L-tryptofanu (NATA) oraz N-acetylo-L-tyrozyny (NALT) w buforze pH 5. Końcowe stężenie NATA i NALT wynosiło 20 μ M. Następnie wykonano pomiary z użyciem peptydów H1, H1long, H3 oraz H3long. W eksperymentach porównywano sygnał fluorescencji Trp i Tyr dla peptydów w buforze pH 5 oraz po dodaniu liposomów typu SUV. Końcowe stężenie peptydów i lipidów wynosiło odpowiednio 2 μ M oraz 100 μ M (1:50 peptyd:lipid). Wszystkie pomiary wykonywano na spektrofлуorymetrze Horiba Fluoromax-4 w temperaturze 20°C w kuwecie 4 x 10 mm (Hellma). Fluorescencję Trp oraz NATA wzbudzano przy długości fali 295 nm, a Tyr i NALT przy 280 nm. Następnie mierzono spektrum emisji fluorescencji w zakresie 310-400 nm dla

Trp i NATA oraz 290-400 nm dla Tyr i NALT. W eksperymencie miareczkowano wybrany peptyd lub analog aminokwasów NATA/NALT kolejnymi dodatkami 2 M akrylamidu, dodając po 5 μ l akrylamidu aż do uzyskania końcowego stężenia 48 μ M. Po każdym dodatku inkubowano 5 minut próbkę z akrylamidem. Pomiaru zostały wykonane w trzech niezależnych powtórzeniach.

Do dalszych analiz wybrano wartości intensywności fluorescencji odpowiadające maksimum emisji reszt Trp i Tyr, odpowiednio 340 nm (dla H3, H3long i NATA) oraz 305 nm (dla H1, H1long i NALT). W przypadku dla reszt Tyr (wzbudzanych przy 280 nm) stosowano poprawkę fluorescencji na efekt filtru wewnętrznego, ze względu na znaczną absorpcję akrylamidu przy tej długości fali. Pomiaru absorbancji wykonano przy użyciu spektrofotometru NanoPhotometer NP80 (Implen) w tej samej kuwecie 4 x 10 mm (Hellma), w której były przeprowadzane pomiary fluorescencji. Mierzono absorbancje akrylamidu od 0 do 48 μ M w buforze pH 5. Przy wzbudzeniu 295 nm stosowanym dla reszt Trp absorpcja akrylamidu dla maksymalnego stężenia akrylamidu wynoszącego 48 μ M była nieznaczająca.

Skorygowana fluorescencja została obliczona dla długości fali 305 nm dla eksperymentów z NALT oraz z peptydami H1, H1long zgodnie ze wzorem [Lakowicz, 2006]:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{\frac{(A_{EX} + A_{EM})}{2}} \quad (3.1)$$

Gdzie: F_{corr} - skorygowana intensywność fluorescencji przy 305 nm, F_{obs} - obserwowana intensywność fluorescencji przy 305 nm, A_{EX} oraz A_{EM} - absorbancja akrylamidu przy 280 i 305 nm.

W celu wyznaczenia stałej Sterna-Volmera do otrzymanych danych była dopasowana krzywa z użyciem wzoru [Lakowicz, 2006]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (3.2)$$

Gdzie: F_0 - intensywność fluorescencji bez obecności wygaszacza, F - intensywność fluorescencji w obecności wygaszacza o stężeniu $[Q]$, K_{SV} - stała Sterna-Volmera

3.4.3. Test aktywności fuzyjnej - mieszania lipidów (ang. *lipid mixing*)

Do zbadania aktywności fuzyjnej peptydów używano testu opartego na FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*). Stosowany test mieszania lipidów (ang. *lipid mixing*) pozwala na wykrycie hemifuzji oraz fuzji pomiędzy liposomami, nie pozwala jednak na rozróżnienie hemifuzji od fuzji. W wyniku hemifuzji lub fuzji liposomów zawierających donora i akceptora z niebarwionymi liposomami dochodzi do oddalenia od siebie donora i akceptora. Tym samym obserwuje się spadek efektywności transferu FRET. Test przeprowadzano na czytniku płytek TECAN na 96-dołkowych płytach (Greiner, F-bottom, chimney well) w temperaturze pokojowej. W pomiarach mierzono zmianę sygnału fluorescencji akceptora przy wzbudzeniu przy 463 nm i emisją przy 590 nm. W eksperymentach wykorzystano liposomy LUV o składzie POPC lub POPC/chol (60/40 mol%) z odpowiednimi barwnikami oraz liposomy niebarwione. Bezpośrednio do pomiarów przygotowano dwie partie liposomów: barwione (zawierały 1 mol% NBD-PE i 1 mol% N-Rh-PE) oraz niebarwione, które zostały mieszane w proporcji 1:9 (barwione/niebarwione) przy końcowym stężeniu lipidów wynoszącym 100 μM . Początkowo zmierzono sygnał fluorescencji samych liposomów, odpowiadający braku fuzji 0%. Następnie do roztworu dodawano peptyd lub mieszanek peptydów w końcowym stężeniu 2 μM (1:50 lipid:peptyd), wymieszano roztwór za pomocą pipety i mierzono intensywność fluorescencji przez następne 15 minut. Do dalszej analizy używano sygnału fluorescencji po 850 s, w momencie, gdy sygnał się ustabilizował. Na końcu do roztworu dodano 4 μl 10% Tritonu X-100 w celu rozpuszczenia liposomów. Końcowy sygnał fluorescencji odpowiadał 100% aktywności fuzyjnej. Na podstawie wartości początkowej oraz końcowej obliczano wartość procentową aktywności peptydu lub mieszanek peptydowych. Eksperymenty wykonano w dwóch lub trzech niezależnych seriach, z osobnym przygotowaniem liposomów typu LUV. Pomiary w każdej serii zostały wykonane w 4 powtórzeniach. Dodatkowo wykonano eksperyment z liposomami o składzie POPC/chol (60/40 mol%) przy stałym stężeniu lipidów wynoszącym 100 μM i zmiennym stężeniu peptydu FP. Wykorzystano mieszanki o finalnym stężeniu FP: 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4 oraz 10 μM . Dla każdego stężenia FP eksperyment został powtórzony trzy razy. Sposób pomiaru był taki sam jak opisany wcześniej dla peptydu o stężeniu 2 μM .

3.4.4. Test aktywności błonowej - wyciekanie barwnika z liposomów (ang. *leakage assay*)

W celu zbadania aktywności błonowej skutkującej wyciekaniem zawartości z liposomów użyto testu aktywności błonowej (ang. *leakage assay*). Test został oparty na zmianie intensywności fluorescencji kalceiny zamkniętej w liposomach. Kalceina została zamknięta w liposomach w stężeniu powodującym samowygaszenie się barwnika. Wyciek barwnika z

liposomów, powodował spadek samowygaszania barwnika i tym samym wzrost intensywności fluorescencji. Test przeprowadzano na czytniku płytek TECAN na 96-dołkowych płytach (Greiner, F-bottom, chimney well) w temperaturze pokojowej. W pomiarach wykorzystano wzbudzenie barwnika fluorescencyjnego przy 495 nm i obserwowano emisję przy 515 nm. W pierwszym etapie przygotowano 112 mM roztwór kalceiny w 0,27 M NaOH, zgodnie z opisem z [Dutta i wsp., 2020]. W eksperymentach wykorzystano liposomy LUV o składzie POPC lub POPC/chol (60/40 mol%) o stężeniu 5 mg/ml. Podczas przygotowania liposomów LUV barwnik został zamknięty w liposomach przez uwodnienie filmu lipidowego roztworem barwnika. Następnie wolna kalceina oraz liposomy zostały rozdzielone za pomocą chromatografii żelowej SEC (ang. *size exclusion chromatography*) z użyciem kolumn PD-10 (GE Healthcare). Zbierano frakcje po około 100 μ l, najbardziej stężone frakcje liposomów zostały wybrane do dalszych pomiarów. Do każdego dołka dodano liposomy w końcowym stężeniu lipidów wynoszącym 100 μ M. Stężenie lipidów zostało oszacowane na podstawie stopnia rozcieńczenia liposomów na kolumnie. Po wymieszaniu próbek zmierzono początkowy sygnał odpowiadający 0% wyciekaniu barwnika z liposomów. Następnie do roztworu dodano peptyd lub mieszanę peptydów w finalnym stężeniu 2 μ M (1:50 lipid:peptyd), wymieszano roztwór za pomocą pipety i mierzono intensywność fluorescencji przez następne 15 minut. Do dalszej analizy używano sygnału fluorescencji po 850 s, w momencie kiedy sygnał się ustabilizował. Na końcu do roztworu dodano 4 μ l 10% Tritonu X-100 w celu rozpuszczenia liposomów i zmierzono intensywność fluorescencji. Końcowy sygnał fluorescencji odpowiadał 100% wyciekaniu barwnika z liposomów. Na podstawie wartości początkowej oraz końcowej obliczano wartość procentową aktywności peptydu lub mieszanek peptydowych. Eksperymenty wykonano w dwóch lub trzech niezależnych seriach, z osobnym przygotowaniem liposomów. Pomiary w każdej serii zostały wykonane w czterech powtórzeniach.

3.4.5. Kinetyka aktywności błonowej - wyciekania barwnika z liposomów

Do pomiaru kinetyki aktywności błonowej peptydów FP WT, E11A, W14A wykorzystano test wyciekania barwnika z liposomów. Pomiary zostały wykonane na spektrofлуorymetrze Cary Eclipse (Varian) w kuwecie 4 x 10 mm (Hellma) w temperaturze 20°C. W pierwszym etapie przygotowano 112 mM roztwór kalceiny w 0,27 M NaOH, przygotowany zgodnie z [Dutta i wsp., 2020]. W eksperymentach wykorzystano liposomy LUV o składzie POPC lub POPC/chol (60/40 mol%) przygotowane w buforze pH 5 lub buforze pH 7,4. Barwnik został zamknięty w liposomach LUV przez uwodnienie filmu lipidowego roztworem barwnika. Następnie wolna kalceina oraz liposomy zostały rozdzielone za pomocą chromatografii żelowej SEC (ang. *size exclusion chromatography*) z użyciem kolumn PD-10 (GE Healthcare). W przypadku pomiarów w pH 7,4 liposomy zostały przygotowane, wypłukane z kolumny oraz

rozcieńczane w buforze pH 7,4. Fluorescencję wzbudzano przy 495 nm, natomiast emisję obserwowano przy 515 nm. W pierwszej kolejności obserwowano przez 2 minuty intensywność fluorescencji samych liposomów w stężeniu 100 μ M lipidów (0% wyciekania), aż do ustabilizowania się sygnału. Następnie dodano peptyd w końcowym stężeniu 2 μ M (1:50 peptyd:lipid) i mieszano roztwór przez 1 minutę na mieszadle magnetycznym, po czym obserwowano kinetykę reakcji przez 2000 s. Po tym czasie sygnał ustabilizował się. W następnym kroku rozpuszczano liposomy, dodając 10 μ l 10% Tritonu X-100, i mierzono przez 2 minuty sygnał (100% wyciekania). Wykonano trzy niezależne pomiary dla każdego peptydu, średnie wartości zostały obliczone.

3.5. Obrazowanie mikroskopowe

3.5.1. Obrazowanie mikroskopowe FLIM

Do pomiarów mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji FLIM (ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy*) wykorzystano mikroskop konfokalny Leica TCS SP8 z obiektywem 63x z immersją wodną (apertura numeryczna 1,2). Pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej i zbierano obrazy z rozdzielczością 512x512 pikseli. Fluorescencję wzbudzano za pomocą białego lasera przy długości fali 488 nm z częstotliwością 20 MHz. Emisję fluorescencji zbierano w zakresie 500-600 nm z użyciem filtra *bandpass* 500-550. Do obrazowania przygotowano liposomy GUV o składzie POPC lub POPC/chol (60/40 mol%) z 0,25 mol% C6-NBD-PE. W eksperymencie obrazowano pojedyncze liposomy GUV aż do uzyskania około 1500 zliczeń. W badaniach wykonano pomiary z liposomami bez dodatku peptydu jako kontrolne eksperymenty oraz z odpowiednimi peptydami i mieszankami peptydów dodawanych do roztworu. Końcowe stężenie peptydów wynosiło 3 μ M. Każdorazowo inkubowano liposomy oraz peptydy 30 minut przed rozpoczęciem pomiarów. Dla każdych warunków (bez peptydu, z każdym peptydem oraz z mieszankami) zostało wykonane co najmniej 30 zdjęć liposomów GUV w minimum dwóch niezależnych seriach pomiarowych. Dekonwolucję oraz dopasowanie krzywych do danych przeprowadzano w programie SymPhoTime 64. W celu dopasowania krzywych eksponencjalnych użyto metody dekonwolucji z wygenerowanym przez program sygnałem IRF (ang. *instrument response function*).

W każdym przypadku do uzyskanych danych zaniku intensywności fluorescencji dopasowano dwuekspotencjalne krzywe zaniku, zgodnie ze wzorem [Lakowicz, 2006]:

$$I(t) = \sum_i Amp_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad (3.3)$$

Gdzie: Amp_i - amplituda składowej i , τ_i - czas życia fluorescencji składowej i , i - liczba składowych

Dopasowanie dwuekspotencjalnych krzywych zaniku umożliwiło obliczenie średnich czasów życia fluorescencji po amplitudzie, zgodnie ze wzorem:

$$\tau_{amp} = \frac{\sum_i Amp_i \tau_i}{\sum_i Amp_i} \quad (3.4)$$

Gdzie: τ_{amp} - średnia z czasów życia fluorescencji po amplitudzie, Amp_i - amplituda składowej i , τ_i - czas życia fluorescencji składowej i

W każdym badanym przypadku sprawdzał się dwuekspotencjalny model krzywych zaniku do danych eksperymentalnych. W eksperymentach używano fluoroforu C6-NDE-PE, wyznakowanego barwnikiem fluorescencyjnym NBD przyłączonym do szóstego atomu węgla jednego z łańcuchów węglowodorowych.

3.5.2. Pomiary mobilności dwuwarstwy lipidowej za pomocą FCS

W celu sprawdzenia, czy otrzymana dwuwarstwa lipidowa na podłożu SLB miała zachowaną mobilność lipidów, wykorzystano metodę spektroskopii korelacji fluorescencji FCS (ang. *fluorescence correlation spectroscopy*). Eksperymenty FCS pozwoliły na wyznaczenie współczynnika dyfuzji znakowanych lipidów w błonie SLB o składzie POPC/cholesterol/PEG PE/Atto 488 DOPE (55/40/5/0,02 mol %). Pomiary zostały wykonane na mikroskopie Zeiss LSM 780 z obiektywem 40x z immersją wodną (apertura numeryczna = 1,2) w temperaturze pokojowej. Próbkę wzbudzano laserem argonowym o długości fali 488 nm, emisję zbierano w zakresie 500-650 nm.

Na początku każdej serii pomiarowej wykonywano kalibrację objętości konfokalnej (V_{eff}). Kalibracja jest niezwykle istotna, ponieważ umożliwia bezpośrednie porównywanie wyników między seriami pomiarowymi. Skorygowano także położenie pierścienia korekcyjnego obiektywu, aby intensywność fluorescencji w czasie pomiaru była najwyższa. W celu wyznaczenia objętości konfokalnej za pomocą FCS konieczny jest barwnik o znanym współczynniku dyfuzji. Na podstawie pomiarów FCS dla barwnika można było wyznaczyć

promień elipsoidy pomiarowej. Do kalibracji wykorzystano 25 nM roztwór Alexa 488 o znanym współczynniku dyfuzji $D = 414 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [Petrov i wsp., 2006]. W jednym eksperymencie wykonywano 6 pomiarów, w których obserwowano intensywność fluorescencji barwnika przez 10 s, następnie wszystkie 6 pomiarów uśredniono. W każdej serii pomiarowej wykonywano trzy eksperymenty, a wyniki zostały wykorzystane do dalszej analizy. Następnie do otrzymanych danych eksperymentalnych dopasowano krzywe funkcji autokorelacji. Dopasowania zostały wykonane w programie Zeiss ZEN.

Dla eksperymentów kalibracyjnych w roztworze dopasowywane zostały krzywe zgodnie ze wzorem funkcji autokorelacji dla eksperymentów w przestrzeni trójwymiarowej dla jednego fluoroforu z uwzględnieniem trypletu:

$$G(\tau) = 1 + \left(1 + \frac{f_T}{1 - f_T} \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_T}\right)\right) * \frac{1}{cV_{eff}} * \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_D}\right)^{1/2}} \quad (3.5)$$

Gdzie: f_T - intensywność fluorescencji trypletu, τ - czas korelacji, τ_T - czas dyfuzji trypletu, c - stężenie barwnika fluorescencyjnego, V_{eff} - objętość pomiarowa, τ_D - czas dyfuzji fluoroforu, κ - parametr strukturalny

W eksperymentach w roztworze przyjęto, że parametr strukturalny κ wynosi 5. Przykładowe wyniki eksperymentu FCS dla roztworu Alexa 488 przedstawiają Rycina Z 1 oraz Tabela Z 1 znajdujące się w załączniku.

Na podstawie dopasowanej krzywej program Zeiss ZEN wyznaczył czas dyfuzji (τ_D) barwnika Alexa 488, który wynosił ok. 20 μs . Następnie na podstawie współczynnika dyfuzji oraz wyznaczonego czasu dyfuzji barwnika Alexa 488 obliczono promień elipsoidy objętości pomiarowej.

Wyznaczono promień objętości pomiarowej zgodnie ze wzorem:

$$\omega_0 = \sqrt{4\tau_d D} \quad (3.6)$$

Gdzie: D - współczynnik dyfuzji ($\mu\text{m}^2/\text{s}$), τ_d czas dyfuzji (μs), ω_0 - promień boczny (μm)

Promień boczny elipsoidy objętości pomiarowej wynosił około 0,2 μm . Wyznaczony promień został wykorzystany do obliczenia współczynników dyfuzji dla barwnika Atto 488 DOPE wbudowanego w błonę SLB.

Po kalibracji objętości pomiarowej, wykonywano eksperymenty z barwnikiem Atto 488 DOPE w błonie SLB. Początkowo obrazowano błonę SLB w celu wybrania odpowiedniego miejsca do eksperymentów FCS. Zbierano obrazy z rozdzielczością 512x512 pikseli. Próbkę

wzbudzano laserem argonowym o długości fali 488 nm, a emisję zbierano w zakresie 500-650 nm. Błona SLB charakteryzuje się niewielką grubością około kilkunastu nm [Andersson & Köper, 2016]. Ze względu na niewielką grubość błony SLB, miejsce pomiaru FCS w płaszczyźnie z musiało zostać dokładnie dostosowane podczas pierwszego kontrolnego pomiaru w każdym eksperymencie. Płaszczyzna z została dostosowana dla maksimum intensywności fluorescencji. W każdym pomiarze przeprowadzano sześć powtórzeń po 10 s każdy. Dla każdego eksperymentu wybrano od 4 do 5 powtarzalnych pomiarów, które następnie uśredniono. Dla uzyskanych wyników eksperymentów FCS w błonie SLB dopasowano funkcję autokorelacji zgodnie ze wzorem (3.5). W związku z tym, że pomiary były przeprowadzane w płaszczyźnie dwuwymiarowej, wykorzystano wzór (1.8), przedstawionym w rozdziale 1. Eksperymenty FCS dla błony SLB wykonano w 19 powtórzeniach. Eksperymenty zostały wykonane w dwóch niezależnych seriach pomiarowych, z osobnym przygotowaniem liposomów LUV oraz błony SLB.

3.5.3. Obrazowanie mikroskopowe FLIM-FRET

Pomiary FLIM-FRET wykonano w celu sprawdzenia aktywności fuzyjnej cząstek VLP H1-TMD-H1 i H1-TMD-H3 z błoną SLB. FLIM-FRET wykonano na mikroskopie Leica TCS SP8 z obiektywem 63x z immersją wodną (apertura numeryczna = 1,2). Pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej i zbierano obrazy z rozdzielczością 512x512 pikseli. Fluorescencję wzbudzano za pomocą białego lasera przy długości fali 488 nm z częstotliwością 20 MHz. Emisję fluorescencji zbierano w zakresie 500-600 nm z użyciem filtra bandpass 500-550. W wyniku FRET obserwowano zmiany w czasie życia donora NDB-PE. Test pozwala na wykrycie hemifuzji oraz fuzji. Do porównania wartości czasów życia fluorescencji po dodaniu cząstek VLP wykorzystano kontrolę pozytywną oraz kontrole negatywne. Wszystkie przygotowane mieszanki i ich składy lipidowe przedstawia Tabela 7. Jako model błony lipidowej wykorzystano błonę SLB. Kontrola pozytywna składała się z błony SLB, która zawierała donor NBD-PE oraz akceptor Rh-PE (KP). Przeprowadzono dwie kontrole negatywne. Pierwsza kontrola negatywna składała się z błony SLB z NBD-PE (nazwa próbki: Donor). Druga kontrola negatywna (KN) składała się z błony SLB z NBD-PE, z dodatkiem 100 μ l liposomów LUV zawierających barwnik Rh-PE. Liposomy LUV zostały przygotowane w końcowym stężeniu lipidów 1 mg/ml. Ze względu na to, że same liposomy LUV nie ulegają fuzji z błoną SLB, mogły zostać wykorzystane jako kontrola negatywna. Liposomy inkubowano przez pół godziny z błoną SLB w temperaturze pokojowej, a następnie obrazowano.

Po przeprowadzeniu odpowiednich kontroli do błony SLB dodawano cząstki wirusopodobne VLP. Cząstki VLP były przygotowane przed eksperymentem przez cięcie proteolityczne przez noc w temperaturze 4°C z proteazą Xa o stężeniu 0,1 mg/ml. Następnie cząstki VLP barwiono przez dodanie roztworu Rh-PE o końcowym stężeniu 0,5 μ M. Cząstki

VLP inkubowano z barwnikiem przez 2 h w temperaturze pokojowej. Do błony SLB dodawano 100 μ l barwionych cząstek. Tak jak wcześniej liposomy LUV w kontroli negatywnej (KN), cząstki VLP inkubowano przez pół godziny z błoną SLB w temperaturze pokojowej, a następnie obrazowano. We wszystkich eksperymentach obrazowano fragmenty błony o wymiarach 45x45 μ m, aż do osiągnięcia liczby zliczeń około 2000. Analizę otrzymanych krzywych zaniku fluorescencji przeprowadzano z użyciem programu Symphotime64. Dopasowanie krzywych wykonywano zgodnie z opisem zawartym w rozdziale 3.4.1.

Tabela 7 Skład lipidowy próbek przygotowanych do eksperymentów FLIM-FRET z błoną SLB.

Nazwa	Skład lipidowy
Donor	SLB: POPC/chol/PEG-PE/NBD-PE (55/40/5/0.05 mol %)
KP	SLB: POPC/chol/PEG-PE/Rh-PE/NBD-PE (55/40/5/0.25/0.05 mol %)
KN	SLB: POPC/chol/PEG-PE/NBD-PE (55/40/5/0.05 mol %) + LUV: POPC/Rh-PE (100/0.25 mol %)
H1-TMD-H1	SLB: POPC/chol/PEG-PE/NBD-PE(55/40/5/0.05 mol %) + H1-TMD-H1 (barwione 5 μ M Rh-PE)
H1-TMD-H3	SLB: POPC/chol/PEG-PE/NBD-PE (55/40/5/0.05 mol %) + H1-TMD-H1 (barwione 5 μ M Rh-PE)

3.5.4. Analiza statystyczna

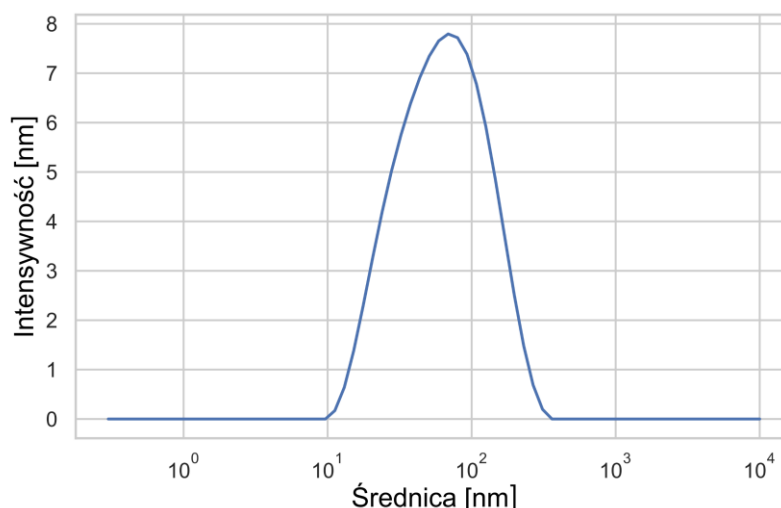
Analiza statystyczna oraz wizualizacja danych zostały wykonane przy użyciu języka programowania Python. Dane przedstawiano w formie jako średnia arytmetyczna z odchyleniem standardowym SD (ang. *standard deviation*). Do danych eksperymentalnych dotyczących wygaszania fluorescencji za pomocą akrylamidu wykonano regresję liniową. Dane dla testów wyciekania zawartości z liposomów, aktywności fuzyjnej oraz dla pomiarów FLIM i FRET-FLIM przedstawiono w formie wykresów pudełkowych (ang. *boxplot*) z medianą. Dla pomiarów FLIM i FRET-FLIM dekonwolucję, dopasowanie krzywych do danych oraz test χ^2 przeprowadzano w programie SymPhoTime64. W przypadku pomiarów FCS do dopasowania krzywych autokorelacji oraz wyznaczania czasów dyfuzji barwników wykorzystano program Zeiss ZEN. Do wszystkich analiz statystycznych wykorzystano nieparametryczny test Manna-Whitneya z poprawką Bonferroniego na wielokrotne porównania.

4. Wyniki

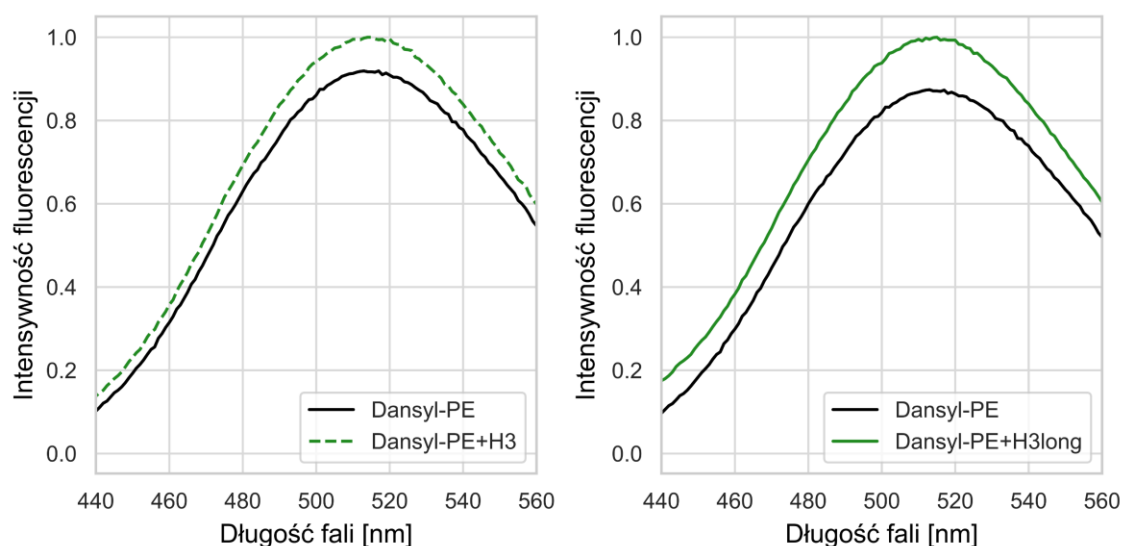
4.1. Test wbudowania peptydów TMD w błonę lipidową

W celu sprawdzenia, czy syntetyczne peptydy, odpowiadające fragmentom TMD hemaglutyniny, wbudowują się w błonę lipidową, przeprowadzono eksperyment FRET. W tym celu wykorzystano naturalne fluorofory, czyli aromatyczne reszty aminokwasów obecne w peptydach, jako donory. Jako akceptor został użyty barwnik fluorescencyjny dansyl przyłączony do fosfatydyloseryny (dansyl-PE). Donorem były reszty Trp w przypadku peptydów H3 i H3long oraz reszty Tyr w przypadku H1 i H1long. Eksperyment nie został wykonany dla FP ze względu na liczne dane literaturowe, które potwierdzają wbudowanie FP w błonę lipidową. Jako model błony lipidowej przygotowano liposomy typu SUV o składzie POPC z wbudowanym dansyl-PE. Fosfolipid POPC został wybrany ze względu na dużą zawartość fosfatydylocholiny (PC) w błonach biologicznych. POPC jest też często wykorzystywany jako modelowy lipid w badaniach eksperymentalnych oraz w symulacjach molekularnych. Dzięki użyciu małych liposomów SUV (o średnicy poniżej 100 nm) nie dochodziło do rozpraszania światła w mierzonym zakresie długości fali i możliwe było zmierzenie widm fluorescencyjnych bez dodatkowej korekty. Wielkość liposomów została potwierdzona za pomocą metody DLS (Rycina 14).

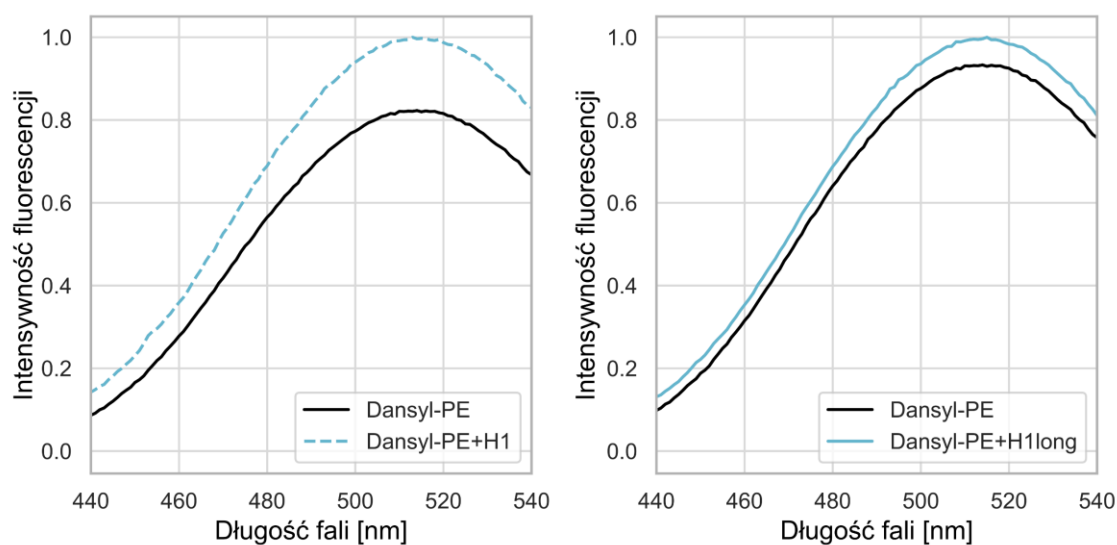
W przypadku wszystkich pomiarów zaobserwowano wzrost intensywności fluorescencji akceptora po dodaniu peptydów. Widoczny był FRET między resztami Trp lub Tyr a barwnikiem dansyl-PE (Rycina 15 i Rycina 16). Wyniki eksperymentu tym samym pokazały, że wszystkie peptydy odpowiadające TMD wbudowały się w błonę liposomów SUV.



Rycina 14 Przykładowy rozkład wielkości liposomów SUV, liposomy przygotowane do pomiaru wbudowania peptydów TMD do błony. Średnica zmierzona za pomocą metody DLS, $z_{avr} = 52$ nm.



Rycina 15 Znormalizowana intensywność fluorescencji barwnika dansyl-PE w liposomach SUV oraz liposomów z dansyl-PE po dodaniu peptydów H3 lub H3long zawierających reszty Trp. n=2

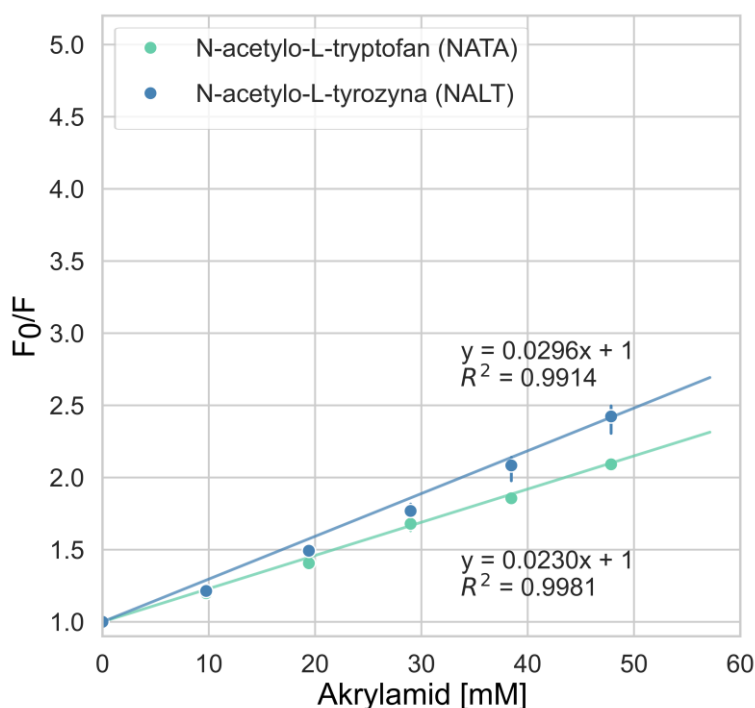


Rycina 16 Znormalizowana intensywność fluorescencji barwnika dansyl-PE w liposomach SUV oraz liposomów z dansyl-PE po dodaniu peptydów H1 lub H1long zawierających reszty Tyr. n=2

4.2. Ocena głębokość wbudowania peptydów TMD w błonę lipidową

Po zbadaniu wbudowania peptydów TMD w błonę, przeprowadzono eksperyment, którego celem było określenie, czy peptydy TMD są peptydami powierzchniowymi czy też wnikają głęboko w błonę. W tym celu wykorzystano test z użyciem wygaszacza fluorescencji akrylamidu, który wygasza fluorescencję reszt aromatycznych Trp oraz Tyr [Follenius & Gerard, 1983; Strambini & Gonnelli, 2010]. Wygaszanie fluorescencji reszt Trp przez akrylamid jest powszechnie wykorzystywane do badania wbudowania peptydów w błonę lipidową [Moro i wsp., 1993; Thorén i wsp., 2004]. Akrylamid nie przenika przez błonę lipidową, w związku z tym nie wygasza efektywnie fluorescencji reszt Trp, które są wbudowane głęboko w błonę. W ten sposób możliwe jest zbadanie, czy peptyd jest peptydem powierzchniowym, czy też transbłonowym. Natomiast brak doniesień pokazujących wykorzystanie wygaszania fluorescencji reszt Tyr do zbadania głębokości wbudowania peptydów w błonę. Mimo braku takich badań zaobserwowano mniejsze wygaszanie fluorescencji reszt Tyr, które są schowane wewnątrz białka [Sureshbabu i wsp., 2009]. Podobnie jak w przypadku reszt Trp, fluorescencja Tyr w środowisku, gdzie wygaszcz nie ma dostępu do reszt aromatycznych (wewnątrz białka, w błonie lipidowej), nie ulega efektywnemu wygaszaniu. Wykorzystując tę własność, przeprowadzano eksperyment wygaszania fluorescencji reszt Tyr za pomocą akrylamidu w peptydach H1 i H1long, które nie zawierają reszt Trp.

Początkowo wykonano eksperyment kontrolny wykorzystując roztwory analogu tyrozyny N-acetylo-L-tyrozyny (NALT) oraz analogu tryptofanu amid N-acetylo-L-tryptofanu (NATA). Przeprowadzono pomiary wygaszania fluorescencji przez akrylamid w buforze pH 5. W obu przypadkach zaobserwowano wygaszanie analogów reszt aminokwasowych (Rycina 17). Zgodnie z wartościami literaturowymi K_{SV} dla Tyr wynosi ok. 38 M^{-1} , natomiast dla Trp wynosi odpowiednio ok. 20 M^{-1} [Khrapunov i wsp., 2002; Strambini & Gonnelli, 2010]. W przedstawionych w pracy doktorskiej eksperymentach uzyskano wartości K_{SV} , które były zbliżone do wartości literaturowych (Tabela 8). Stała K_{SV} dla NALT była wyższa niż dla NATA, co sugeruje, że reszty Tyr są bardziej wrażliwe na wygaszanie fluorescencji przez akrylamid.



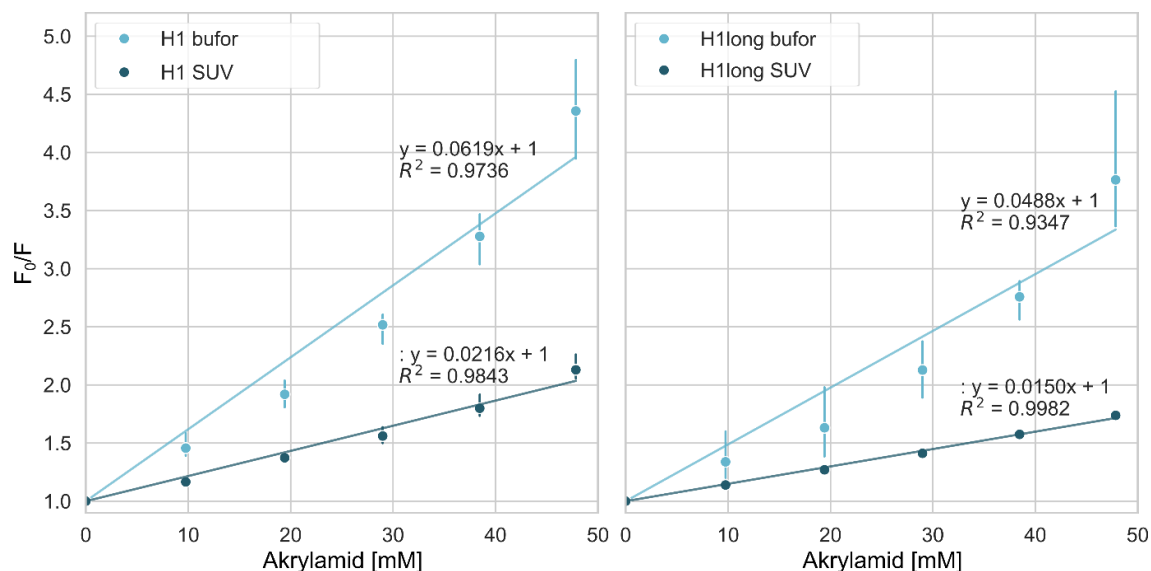
Rycina 17 Wykres F_0/F w funkcji stężenia wygaszacza fluorescencji akrylamidu dla analogów reszt aminokwasowych NATA i NALT w buforze pH 5. Wyniki przedstawiono jak średnie $\pm$ odchylenie standardowe SD ($n=3$). Skala osi y dobrana do bezpośredniego porównywania z Ryciną 18 oraz 19.

Tabela 8 Wartości K_{SV} otrzymane z eksperymentów wygaszania fluorescencji dla analogów reszt aminokwasowych Trp NATA oraz dla analogu reszt Tyr NALT.

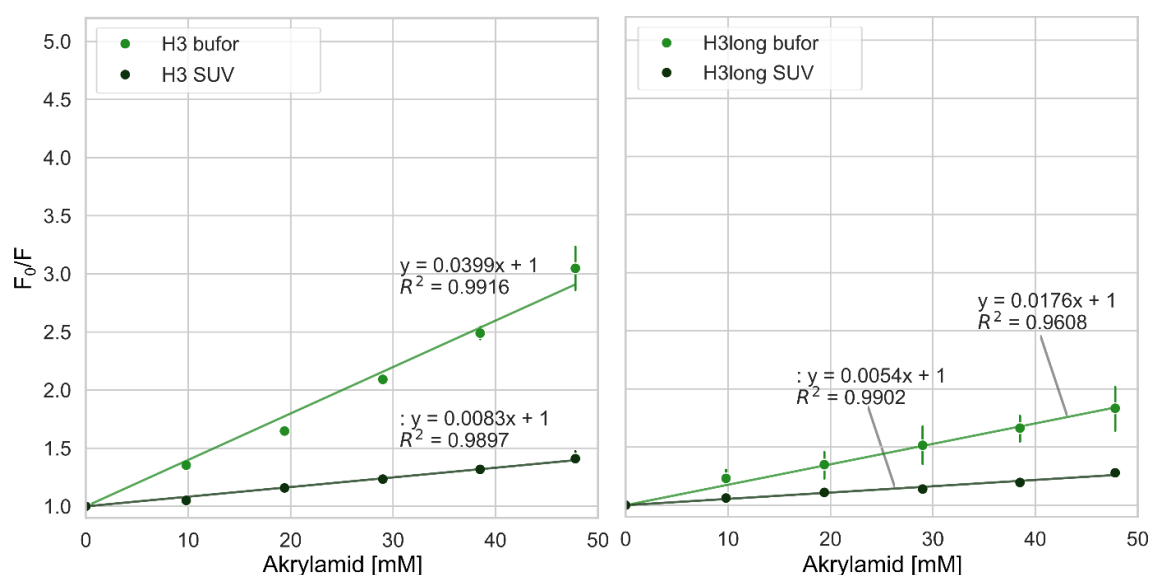
Aminokwas	K_{SV} [M^{-1}]
N-acetylo-L-tryptofan (NATA)	$23,0 \pm 0,4$
N-acetylo-L-tyrozyna (NALT)	$29,6 \pm 1,1$

W kolejnych eksperymentach zmierzono intensywność fluorescencji peptydów w funkcji stężenia wygaszacza akrylamidu. Eksperyment z wygaszaniem fluorescencji wykonano w buforze pH 5 oraz w obecności liposomów SUV. Wykorzystanie liposomów SUV, o średnicy poniżej 100 nm, pozwoliło na całkowitą redukcję rozpraszania światła od liposomów podczas pomiarów fluorescencji. W każdym przypadku widoczne jest słabsze wygaszanie fluorescencji reszt aromatycznych peptydów przez akrylamid w obecności liposomów SUV w porównaniu do wyników z buforem pH 5. Wyniki potwierdzają, że peptydy wbudowują się w błonę. Test jest najbardziej wiarygodny, gdy peptyd zawiera jedną resztę aromatyczną tak, jak w przypadku peptydów H1 oraz H3. H1 i H3 prawdopodobnie są peptydami transbłonowymi i ich reszty Tyr oraz Trp są głęboko wbudowane w błonę, co utrudnia wydajne wygaszanie fluorescencji przez akrylamid.

Natomiast peptydy H1long oraz H3long zawierają odpowiednio dwie reszty Tyr i Trp. Prawdopodobnie jedna lub dwie reszty Tyr/Trp dla peptydów H1long i H3long są głęboko wbudowane w błonę. Na podstawie uzyskanych wyników nie można stwierdzić, czy obie badane reszty aminokwasowe są głęboko wbudowane w błonę lipidową. Wykresy F_0/F w funkcji stężenia wygaszacza oraz dopasowane krzywe Sterna-Volmera dla wszystkich peptydów przedstawiają Rycina 18 oraz Rycina 19. Z dopasowanych krzywych uzyskano dla wszystkich peptydów stałe Sterna-Volmera (Tabela 9).



Rycina 18 Wykresy F_0/F w funkcji stężenia wygaszacza akrylamidu z dopasowanymi krzywymi Sterna-Volmera. Eksperymenty wykonane dla peptydów H1 oraz H1long w buforze oraz w obecności liposomów SUV o składzie POPC, wykorzystano bufor pH 5. Wyniki przedstawione jak średnie $\pm$ odchylenie standardowe SD ($n=3$).



Rycina 19 Wykresy F_0/F w funkcji stężenia wygaszacza akrylamidu z dopasowanymi krzywymi Sterna-Volmera. Eksperymenty wykonane dla peptydów H3 oraz H3long w buforze oraz w obecności liposomów SUV o składzie POPC, wykorzystano bufor pH 5. Wyniki przedstawione jak średnie $\pm$ odchylenie standardowe SD ($n=3$).

Tabela 9 Wartości K_{SV} otrzymane z eksperymentów wygaszania fluorescencji dla peptydów w buforze pH 5 oraz w błonie liposomów SUV

Peptyd	K_{SV} w buforze [M^{-1}]	K_{SV} w błonie [M^{-1}]
H1	$61,9 \pm 4,3$	$21,6 \pm 1,6$
H1long	$48,9 \pm 5,5$	$15,0 \pm 0,3$
H3	$40,0 \pm 1,6$	$8,3 \pm 0,4$
H3long	$17,6 \pm 1,6$	$5,4 \pm 0,3$

4.3. Aktywność błonowa peptydów

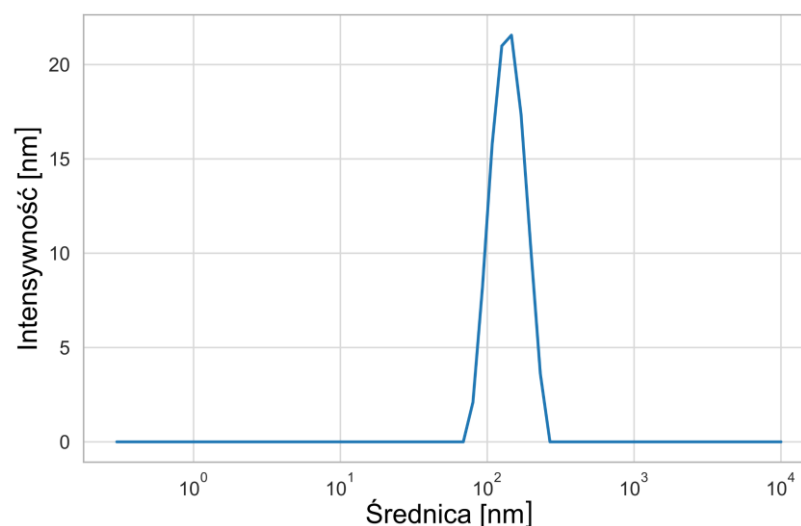
W kolejnym etapie eksperymentów przeprowadzono test wyciekania barwnika fluorescencyjnego z liposomów (ang. *leakage assay*). W teście badana była aktywność peptydów, które wbudowują się w błonę i zaburzają strukturę jej dwuwarstwy lipidowej. W wyniku zaburzenia struktury dwuwarstwy dochodzi do wyciekania zawartości z liposomów. Taka aktywność peptydów jest często obserwowana u peptydów fuzyjnych, w tym FP hemaglutyniny [Sainz i wsp., 2005; Rice i wsp., 2022]. Prawdopodobnie wyciekanie zawartości z liposomów może być jednym z etapów fuzji [Müller i wsp., 2003]. W związku z tym wykorzystano ten test do zbadania aktywności błonowej peptydów.

W eksperymentach przedstawionych w pracy doktorskiej porównywano aktywność błonową peptydów w liposomach o różnym składzie lipidowym POPC oraz POPC/chol (60/40 mol%). Obecność 40% cholesterolu pozwoliła na zbadanie jego wpływu na aktywność peptydów. W eksperymentach używano zarówno krótsze, jak i dłuższe wersje peptydów, których sekwencja odpowiadała domenie transbłonowej (TMD) hemaglutyniny. Dłuższe wersje peptydów H1long i H3long posiadają reszty aminokwasowe, potencjalnie mogące oddziaływać z cholesterolem. Motywy cholesterolowe wymienionych peptydów przedstawia Tabela 10. Natomiast krótsze odpowiedniki (H1 i H3) nie posiadają motywów cholesterolowych. W eksperymentach wykorzystano zarówno indywidualne peptydy oraz mieszanki FP+TMD. Mieszanki były używane w celu sprawdzenia, czy występuje synergiczne działanie FP i TMD, a tym samym zbadanie obecności oddziaływań pomiędzy peptydami. Testy pozwoliły na zbadanie aktywności błonowej peptydów w różnym składzie lipidowym, jak i przeanalizowanie różnic pomiędzy TMD pochodzącymi z różnych podtypów. Co najważniejsze, zastosowanie mieszanek pozwoliło na ocenę aktywności FP i TMD w tej samej błonie.

Tabela 10 Sekwencje aminokwasowe peptydów H1long i H3long z motywami cholesterolowymi, na żółto zaznaczono motywy aminokwasowe, które potencjalnie mogą oddziaływać z cholesterolą, na niebiesko zaznaczona metka zwiększająca rozpuszczalność peptydów.

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa
H1long	YQILAIYSTVASSLVLVSLGAI SGKKKKD
H3long	GYKDWILWISFAISCFLLCVALLGFIM SGKKKKD

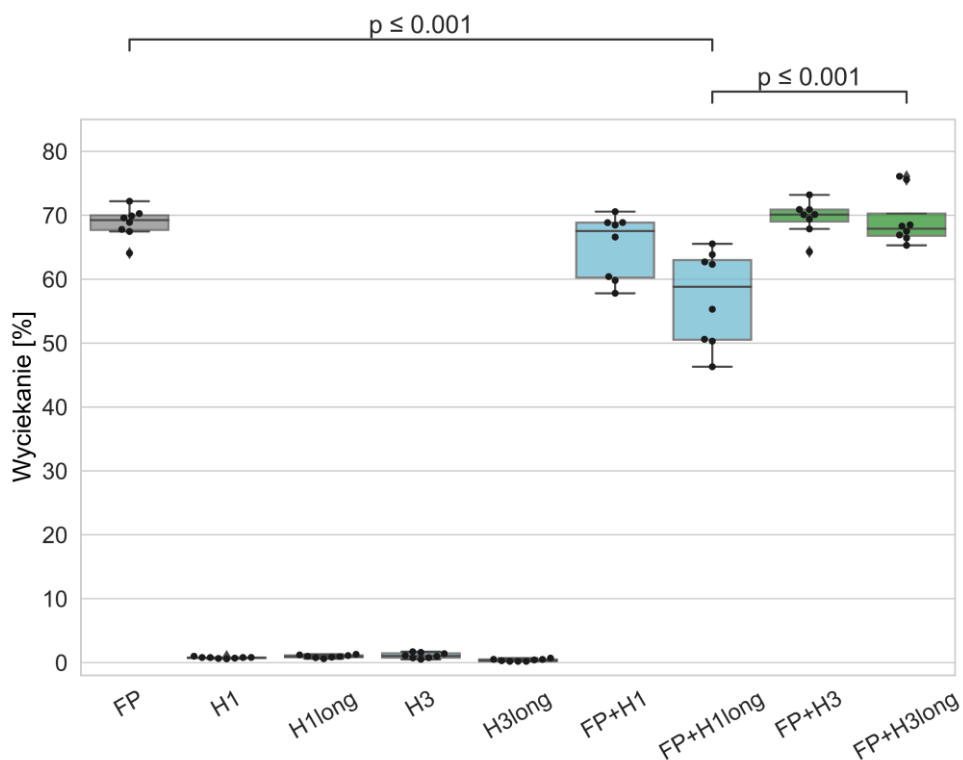
W eksperymentach jako model dwuwarstwy lipidowej wykorzystano liposomy typu LUV. Po każdym przygotowaniu liposomów ich wielkość była sprawdzana za pomocą metody DLS. W ten sposób analizowano jakość i powtarzalność przygotowanych liposomów. Wielkość liposomów wynosiła około 140 nm (Rycina 20). Przygotowanie mieszanek oraz mieszanie na 96 dołkowej płytce zostało tak zoptymalizowane, aby uzyskać powtarzalne wyniki i niewielkie tło w przypadku braku aktywności.



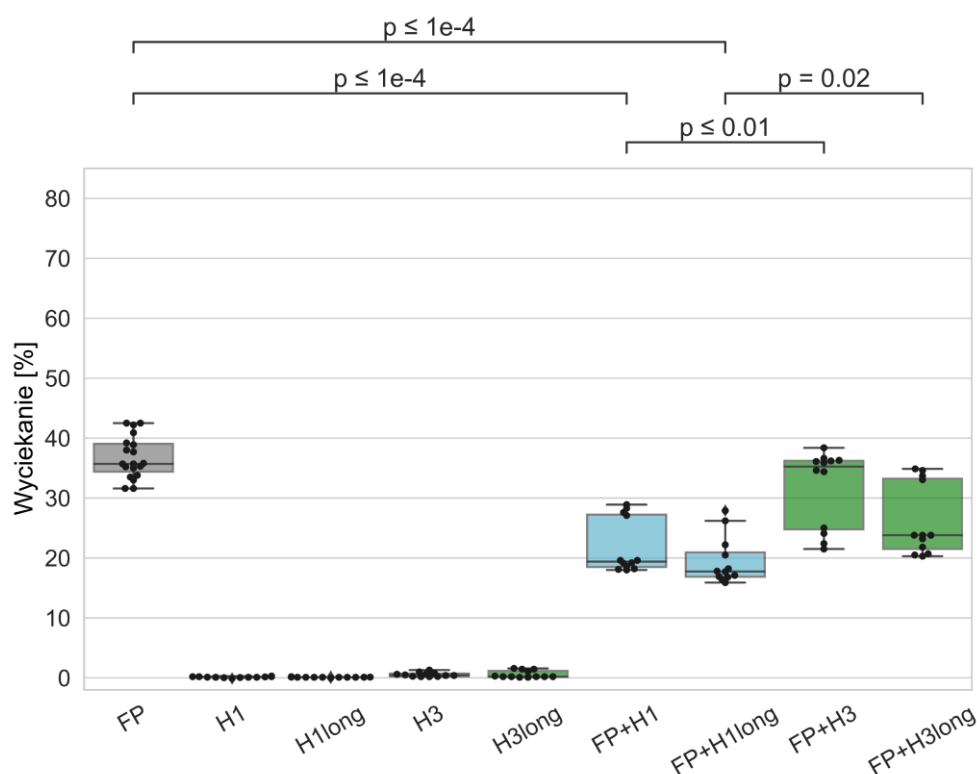
Rycina 20 Przykładowy rozkład wielkości liposomów LUV o składzie POPC przygotowanych do testów wyciekania barwnika z liposomów. Rozkład wielkości zmierzonych za pomocą metody DLS, $z_{avr} = 135$ nm.

Wyniki testu wyciekania barwnika pokazały, że peptydy odpowiadające TMD nie wykazywały aktywności błonowej zarówno w liposomach o składzie POPC, jak i POPC/chol (60/40%) (Rycina 21 oraz Rycina 22). Natomiast aktywność FP w przeprowadzonych eksperymentach w błonie POPC osiągnęła 70% podczas gdy w błonie z cholesterolą wyniosła ok. 40%. Obecność cholesterolu znacznie obniżyła aktywność błonową FP. W przypadku mieszanek FP z peptydami TMD nie zaobserwowano wzrostu wyciekania barwnika z liposomów w porównaniu do aktywności samego FP. Zaobserwowano natomiast, że aktywność błonowa mieszanki FP+H1long była niższa niż samego peptydu FP w obu składach lipidowych. Wynosiła odpowiednio ok. 60% w błonie

POPC oraz ok. 20% w błonie z cholesterolem. Występowała także istotna statystycznie różnica pomiędzy aktywnością mieszanek FP+H1long a FP+H3long w obu błonach. W każdym przypadku mieszanka FP+H3long wykazywała się wyższą aktywnością niż mieszanka FP+H1long.



Rycina 21 Procent wyciekania barwnika z liposomów indukowany przez pojedyncze peptydy oraz mieszanki peptydów FP:TMD w liposomach o składzie POPC w pH 5. Stosunek peptyd:lipid wynosił 1:50 (n=12). Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu Manna Whitneya.

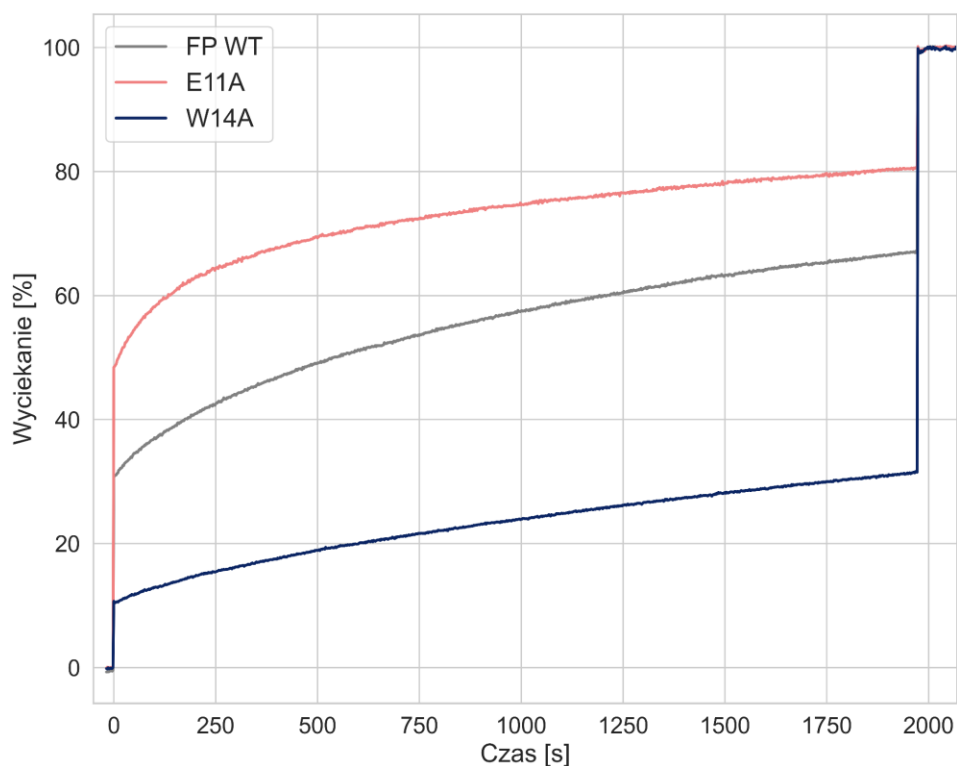


Rycina 22 Procent wyciekania barwnika z liposomów indukowany przez pojedyncze peptydy lub mieszanki peptydów FP:TMD w liposomach o składzie POPC/choł (60/40 mol%) w pH 5. Stosunek peptyd:lipid wynosił 1:50, n=12. Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu Manna Whitney.

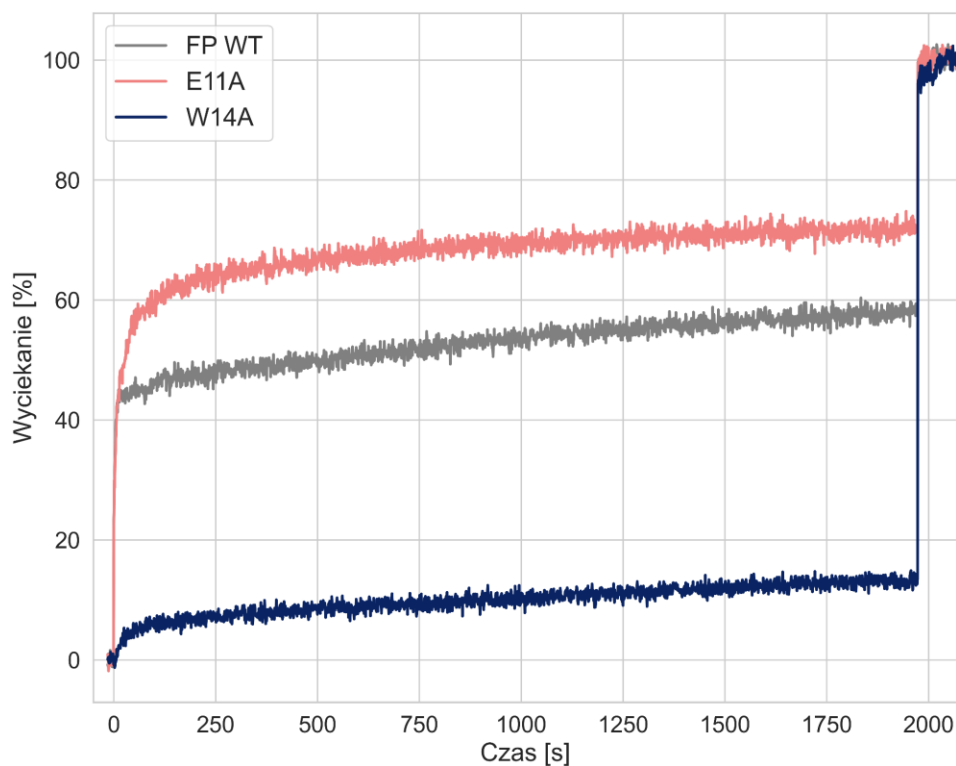
4.4. Kinetyka aktywności błonowej peptydów

Przeprowadzono także eksperymenty w celu dokładniejszego scharakteryzowania działania peptydu fuzyjnego. Do tego wykorzystano test wyciekania barwnika liposomów w czasie, indukowanego przez natywny peptyd fuzyjny FP (FP WT) oraz mutanty W14A, E11A. Zgodnie z danymi literaturowymi użyte mutanty wykazują się obniżoną aktywnością fuzyjną w porównaniu do natywnego FP WT [Lai i wsp., 2006]. Użycie mutantów pozwala na scharakteryzowanie wpływu poszczególnych reszt aminokwasowych na aktywność peptydu fuzyjnego. W przeprowadzonych eksperymentach porównano kinetykę wyciekania zawartości liposomów dla wszystkich trzech peptydów. Do bardziej szczegółowego zbadania aktywności błonowej eksperymenty przeprowadzono w różnych warunkach pH oraz składach lipidowych. Wykorzystano liposomy LUV o składzie POPC oraz POPC/choł (60/40 mol%). Test był przeprowadzany w pH 5, odpowiadającym warunkom późnych endosomów i optymalnym dla działania peptydu fuzyjnego w obu składach lipidowych. Dodatkowo przeprowadzono w pH neutralnym (równym 7,4) w błonie z cholesterolem.

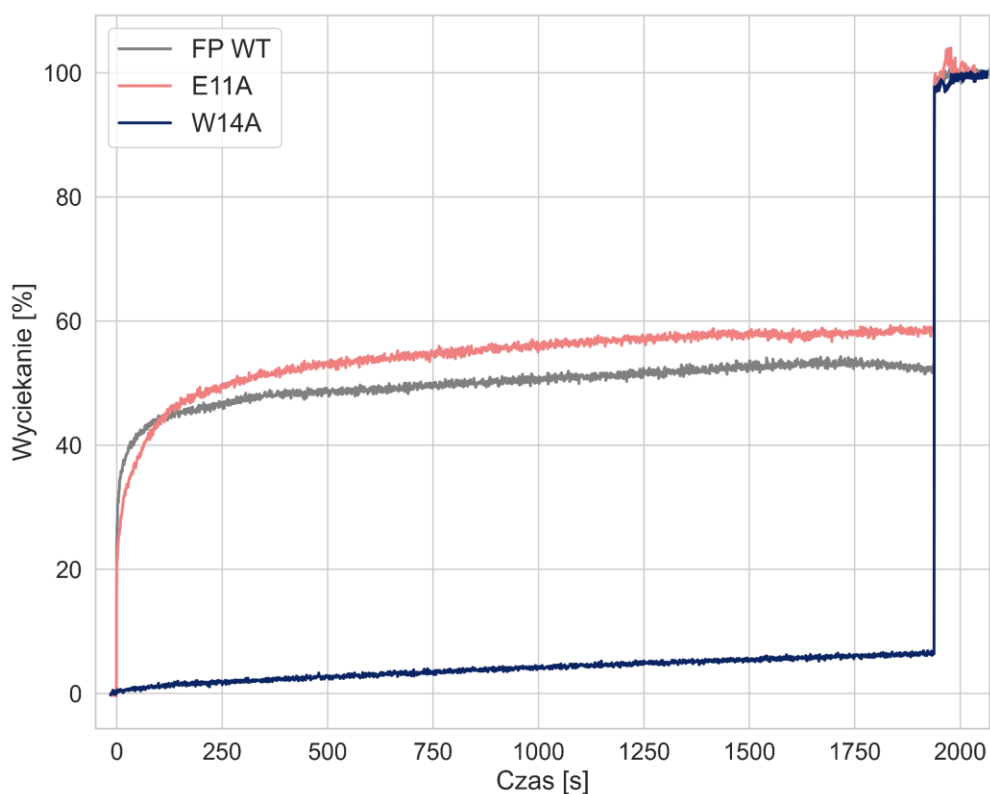
Wszystkie peptydy wykazywały się większą aktywnością w błonie o składzie POPC niż w błonie z cholesterolem. Co więcej, ich aktywność błonowa była wyższa w pH 5 niż w neutralnym pH 7.4. Największą aktywnością wśród peptydów wyróżniał się E11A, natomiast najniższą peptyd W14A. Analiza kinetyki wykazała, że w błonie POPC w pH 5 E11A indukowała wyciekanie na poziomie 80%. FP WT na poziomie 65%, natomiast W14A 30% (Rycina 23). W błonie zawierającej cholesterol w pH 5 procent wyciekania wynosił odpowiednio około 70%, 60% i 15% dla E11A, FP WT i W14A (Rycina 24). Natomiast w pH 7,4 w POPC/chol wyciekanie spadło do wartości 60%, 50% i poniżej 10% dla E11A, FP WT i W14A (Rycina 25). W związku z tym, że test pokazuje aktywność błonową, która nie odpowiada w pełni fuzji, nie można stwierdzić, czy E11A wykazuje większą aktywność fuzyjną niż FP WT na podstawie tego testu. Rozbieżności w wynikach pomiędzy eksperymentami aktywności przeprowadzonymi na 96 dołkowej płytce przedstawionymi w rozdziale 4.3 a wynikami z kinetyki wynikają z różnic w warunkach eksperymentów. Eksperymenty kinetyczne opisane w tym rozdziale zostały wykonane w kuwecie, w większej objętości, a próbki były mieszane na mieszadle magnetycznym.



Rycina 23 Procentowe wyciekanie barwnika z liposomów w czasie, indukowane przez peptydy FP WT, E11A, W14A w liposomach LUV o składzie POPC w pH 5. Stosunek peptyd:lipid wynosił 1:50 (n=3).



Rycina 24 Procentowe wyciekanie barwnika z liposomów w czasie, indukowane przez peptydy FP WT, E11A, W14A w liposomach LUV o składzie POPC/chol (60/40%) w pH 5. Stosunek peptyd:lipid wynosił 1:50 (n=3).



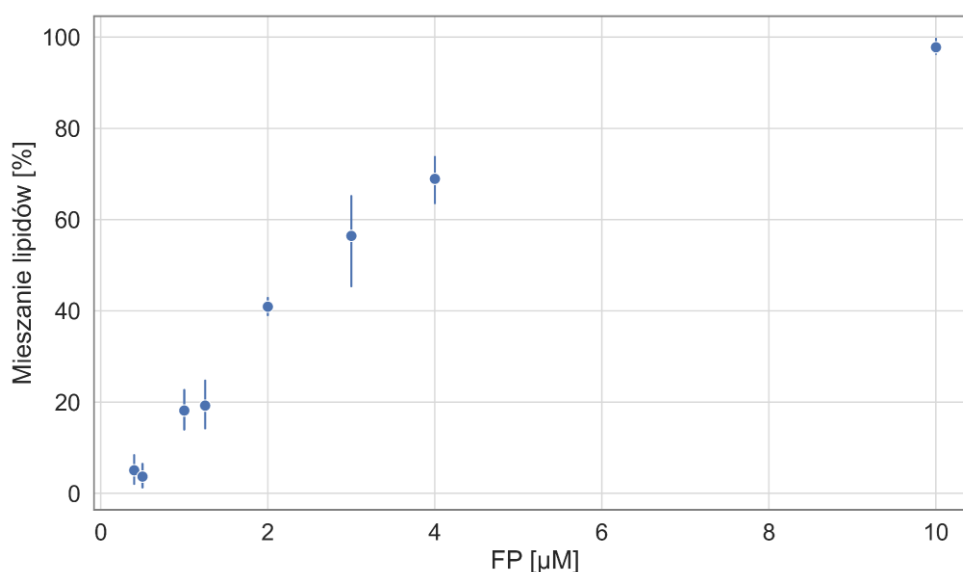
Rycina 25 Procentowe wyciekanie barwnika z liposomów w czasie, indukowane przez peptydy FP WT, E11A, W14A w liposomach LUV o składzie POPC/chol (60/40%) w pH 7,4. Stosunek peptyd:lipid wynosił 1:50 (n=3).

4.5. Aktywność peptydów powodująca hemifuzję liposomów

Do zbadania aktywności fuzyjnej peptydów zastosowano test mieszania lipidów (ang. *lipid mixing*), który umożliwia wykrycie hemifuzji liposomów. Metoda ta nie pozwala jednak na rozróżnienie hemifuzji od pełnej fuzji. W przypadku mieszania lipidów dwóch błon ulegających fuzji obserwuje się spadek intensywności fluorescencji donora. Aktywność fuzyjna peptydów jest wyrażana jako procent mieszania lipidów.

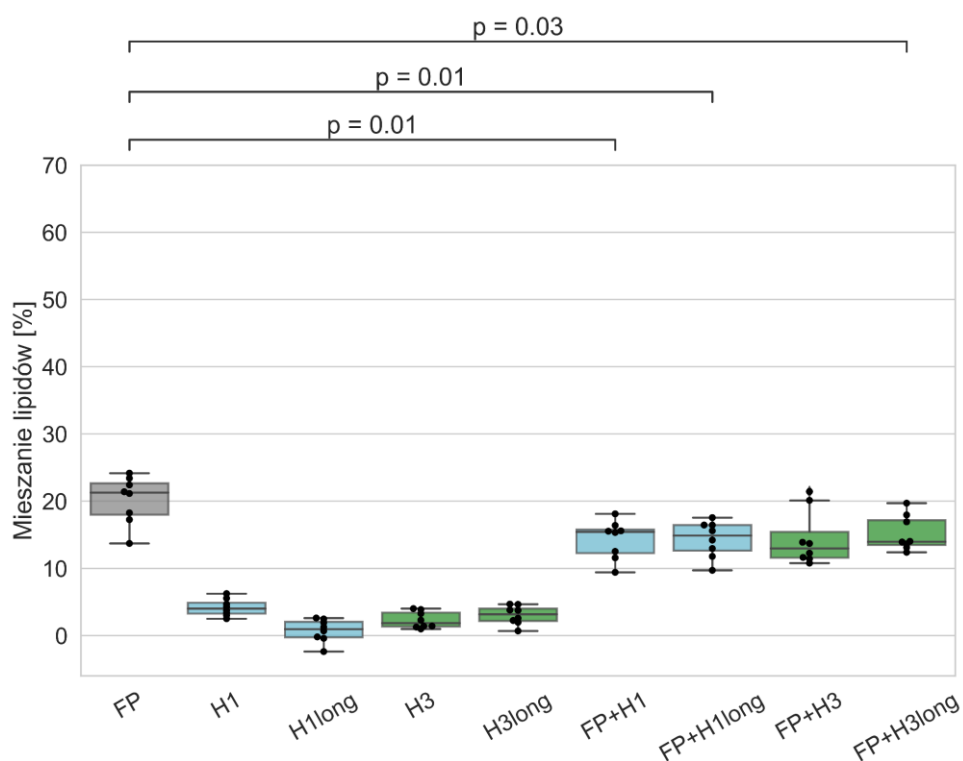
Eksperymenty przeprowadzono zgodnie z metodologią zastosowaną w teście wyciekania fluoroforu z liposomów (opisanym w rozdziale 4.3), dzięki czemu uzyskano powtarzalne wyniki oraz niskie tło. Jako model błony wykorzystano liposomy LUV, których wielkość była badana za pomocą DLS. Średnica liposomów wynosiła około 140 nm i była zgodna z wynikami uzyskanymi w teście wyciekania barwnika z liposomów (Rycina 20).

Początkowo przeprowadzono eksperyment mieszania lipidów w rosnącym stężeniu peptydu FP (Rycina 26). Obserwowano stopniowy wzrost mieszania lipidów wraz ze wzrostem stężenia peptydu. W stężeniu 10 μM (stosunek 1:10 lipid:peptyd) FP procent mieszania lipidów był porównywalny do rozpuszczania liposomów za pomocą detergentu i wynosił ok. 100%. Do dalszych eksperymentów wybrano stężenie peptydu 2 μM (stosunek lipidów do peptydów 1:50), przy którym procent mieszania lipidów wynosił 40%. Wybrano to stężenie, ponieważ obserwowano wyraźny efekt mieszania lipidów, a jednocześnie unikano niespecyficznych oddziaływań z lipidami, które mogą występować przy wyższym stężeniu peptydu.

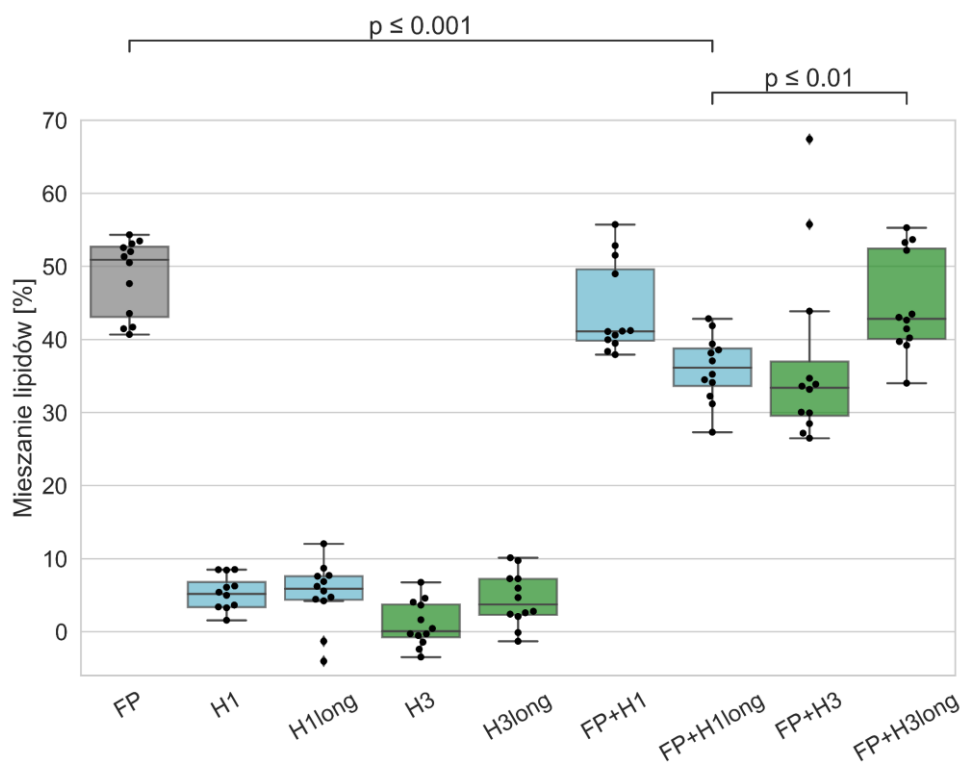


Rycina 26 Procent mieszania lipidów indukowany przez FP w zależności od stężeniu peptydu. Liposomy LUV o składzie POPC/choł (60/40 mol %) w buforze pH 5, stężenie lipidów 100 μM . Wyniki przedstawiono jak średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD), $n=3$.

W dalszym etapie przeprowadzono eksperymenty z indywidualnymi peptydami oraz mieszankami w stałym stężeniu peptydów. Wyniki z przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że FP charakteryzował się największą aktywnością fuzyjną wśród wszystkich badanych peptydów. Co istotne, aktywność FP była wyższa w błonie zawierającej cholesterol niż w błonie o składzie POPC. Procent mieszania lipidów wynosił odpowiednio 20% w błonie POPC oraz 50% w błonie POPC/chol (Rycina 27 i Rycina 28). Peptydy odpowiadające domenie transbłonowej (TMD) nie wykazywały aktywności fuzyjnej, a uzyskane wartości poniżej 10% wynikały z rozcieńczania próbki. Mieszanki peptydów FP+TMD wykazywały taką samą lub niższą aktywność fuzyjną w porównaniu do samego FP. Zaobserwowano spadek procentowego mieszania lipidów w przypadku mieszanek FP+H1, FP+H3 i FP+H1long w błonie POPC w porównaniu do FP, gdzie wartości wynosiły około 15% (Rycina 27). Natomiast w błonie POPC/chol istotny statystycznie spadek w porównaniu do FP zaobserwowano tylko w przypadku mieszanki FP+H1long, w której procent mieszania lipidów wynosił około 35% (Rycina 28). Co istotne, zarówno w błonie POPC, jak i POPC/chol aktywność mieszanki FP+H1long była niższa niż samego FP. Analogiczny spadek aktywności błonowej FP w obecności H1long zaobserwowano również w teście wyciekania barwnika liposomów. W teście mieszania lipidów wykazano także istotne statystycznie różnice pomiędzy aktywnością mieszanek FP+H1long a FP+H3long w błonie z cholesterolem.



Rycina 27 Procent mieszania lipidów indukowany przez pojedyncze peptydy lub mieszanki peptydów FP:TMD w liposomach o składzie POPC w pH 5 (n=12). Stosunek peptyd:lipid wynosił 1:50. Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu Manna Whitneya.



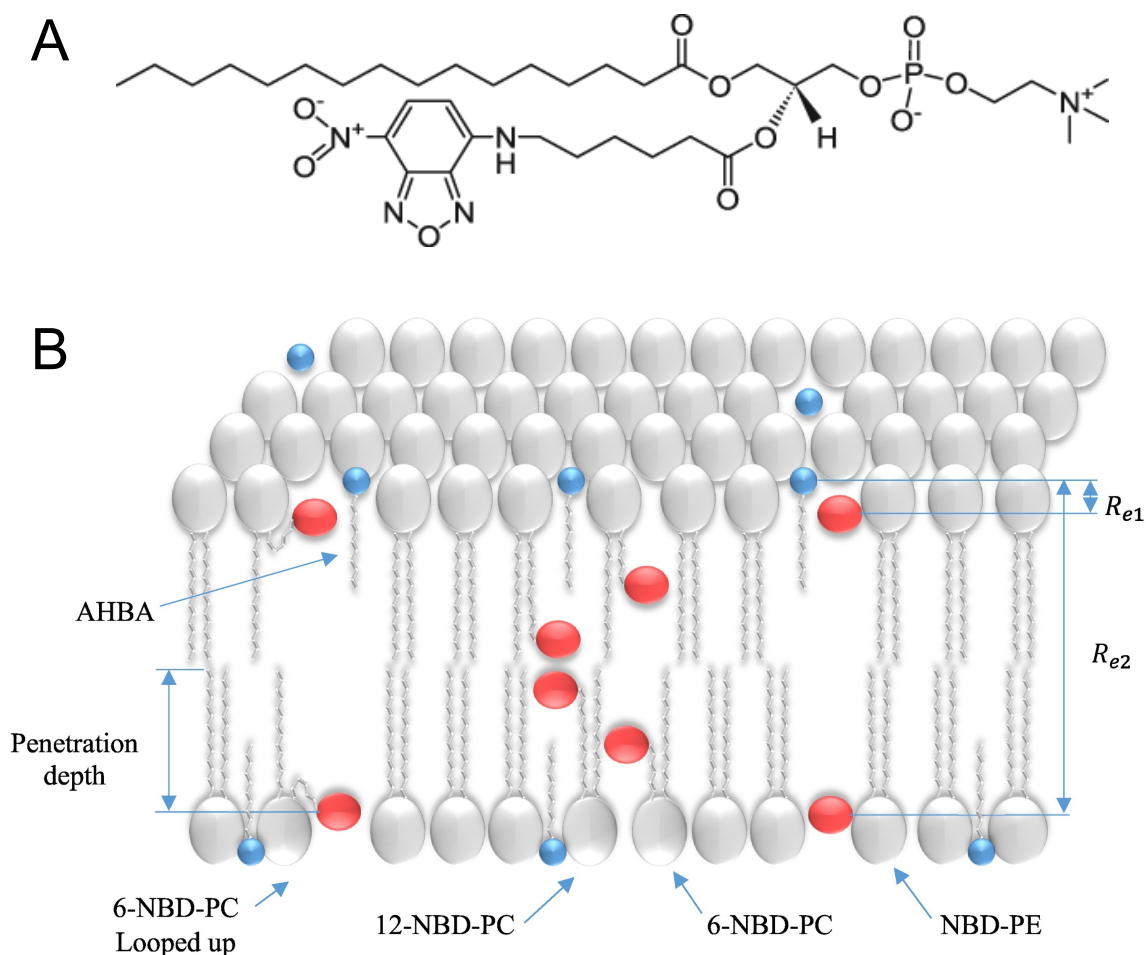
Rycina 28 Procent mieszania lipidów indukowany przez pojedyncze peptydy lub mieszanki peptydów FP:TMD w liposomach o składzie POPC/chol (60%/40%) w pH 5 (n=12). Stosunek peptyd:lipid wynosił 1:50. Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu Manna Whitneya.

4.6. Wpływ peptydów na uporządkowanie lipidów

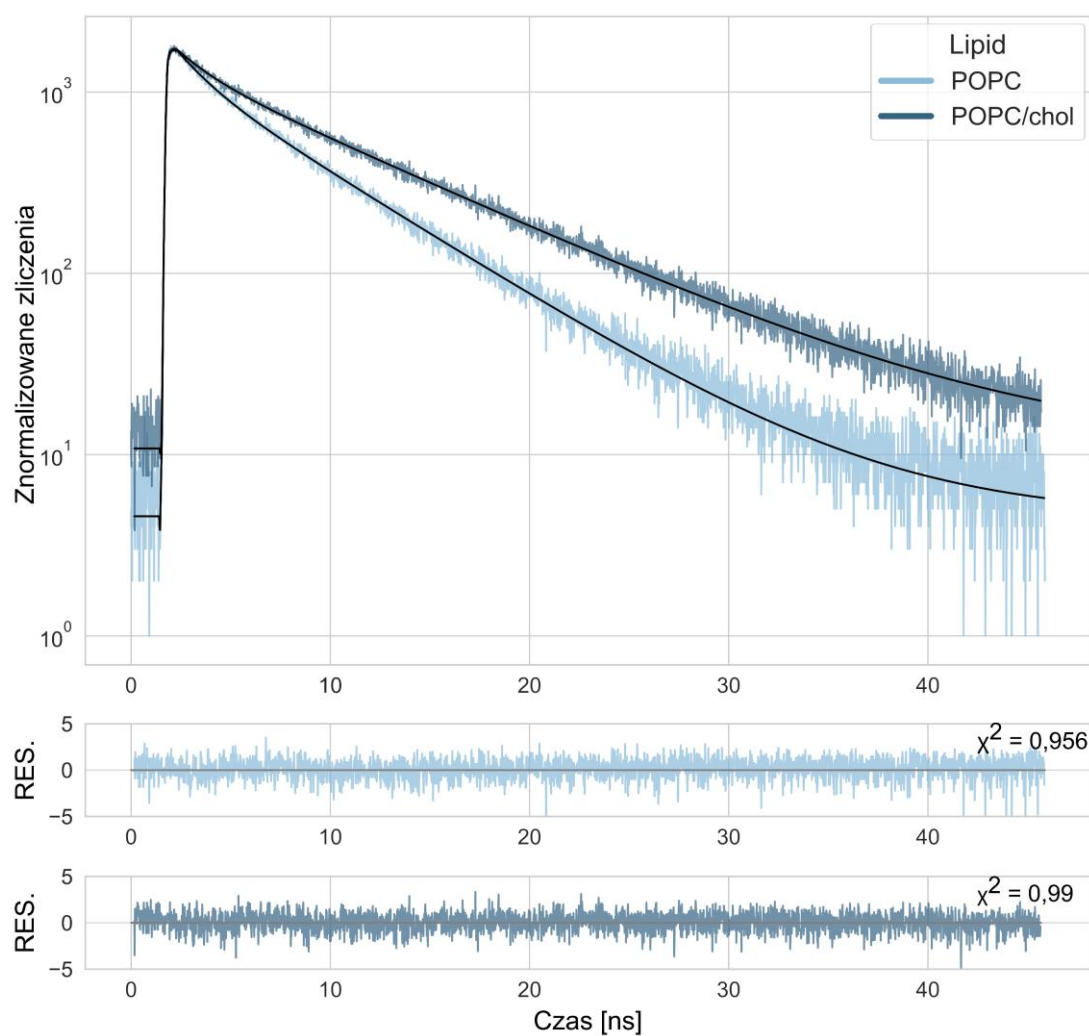
W celu dokładniejszego zbadania wpływu peptydów na strukturę dwuwarstwy lipidowej, przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem fluoroforu C6-NBD-PE, którego czas życia fluorescencji jest wrażliwy na uporządkowanie błony lipidowej (ang. *membrane lipid order*) [Mukherjee i wsp., 2004; Stöckl i wsp., 2008]. Wzór barwnika fluorescencyjnego C6-NBD-PE przedstawia Rycina 29A. Wraz ze wzrostem uporządkowania błony lipidowej wzrasta czas życia fluorescencji barwnika. Jako model błony zostały użyte liposomy GUV z wbudowanym fluoroforem. Ze względu na ich rozmiar przekraczający 1 μm możliwe było obrazowanie mikroskopowe. Zaletą wykorzystania liposomów GUV jest możliwość obrazowania pojedynczych liposomów, co pozwala na zbadanie niewielkich zmian w czasie życia fluorescencji barwnika lipidowego po dodaniu peptydów. Dodatkowo użycie tego modelu błony lipidowej pozwala na zobrazowanie faz lipidowych.

W ramach eksperymentów analizowano zmiany średniego czasu życia fluorescencji (τ_{avr}) barwnika C6-NBD-PE po dodaniu odpowiednich peptydów w porównaniu do błony lipidowej liposomów bez dodatku peptydu (błona bez peptydu oznaczona jako (-)). Przy każdym składzie lipidowym POPC oraz POPC/choł wykonano kontrolną serię pomiarową FLIM liposomami GUV bez dodatku peptydów, w celu wyznaczenia czasu życia fluorescencji barwnika w danym składzie lipidowym. Przykładowe krzywe zaniku przedstawia Rycina 30. W pierwszej kolejności przeprowadzono eksperymenty z użyciem GUV zbudowanych z POPC. W błonie o takim składzie τ_{avr} dla C6-NBD-PE w warunkach kontrolnych bez peptydu (-) wynosił $4,78 \pm 0,13$ ns. Następnie przeprowadzono eksperymenty z peptydami FP, krótszymi i dłuższymi wersjami peptydów TMD oraz mieszankami (FP+TMD). Największy spadek czasu życia fluorescencji zaobserwowano po dodaniu peptydu FP ($\tau_{avr} = 4,65 \pm 0,10$ ns). Istotnie statystycznie obniżenie wartości τ_{avr} stwierdzono także w obecności peptydów H3 ($\tau_{avr} = 4,67 \pm 0,16$) oraz H3long ($\tau_{avr} = 4,69 \pm 0,16$ ns). Natomiast w obecności peptydów H1 i H1long zaobserwowano zwiększenie średniego czasu życia fluorescencji do wartości odpowiednio $\tau_{avr} = 4,87 \pm 0,08$ ns oraz $5,03 \pm 0,11$ ns. H1long wywoływał największą zmianę wartości τ_{avr} wśród wszystkich badanych peptydów w porównaniu do warunków kontrolnych (-) (Rycina 31). W przypadku mieszanek peptydów FP+TMD wartości τ_{avr} były pośrednie w stosunku do pojedynczych peptydów. Zaobserwowano także, że różnica pomiędzy wynikami uzyskanymi dla H1long oraz H3long była istotna statystycznie. Obniżenie wartości τ_{avr} dla FP, H3, H3long sugeruje, że indukowały one zmiany uporządkowania lipidów. Natomiast wzrost τ_{avr} w obecności peptydów H1, H1long wskazuje na ich przeciwny efekt na błonę lipidową. Wyniki dla średnich czasów życia fluorescencji przedstawia Rycina 31. Ze względu na

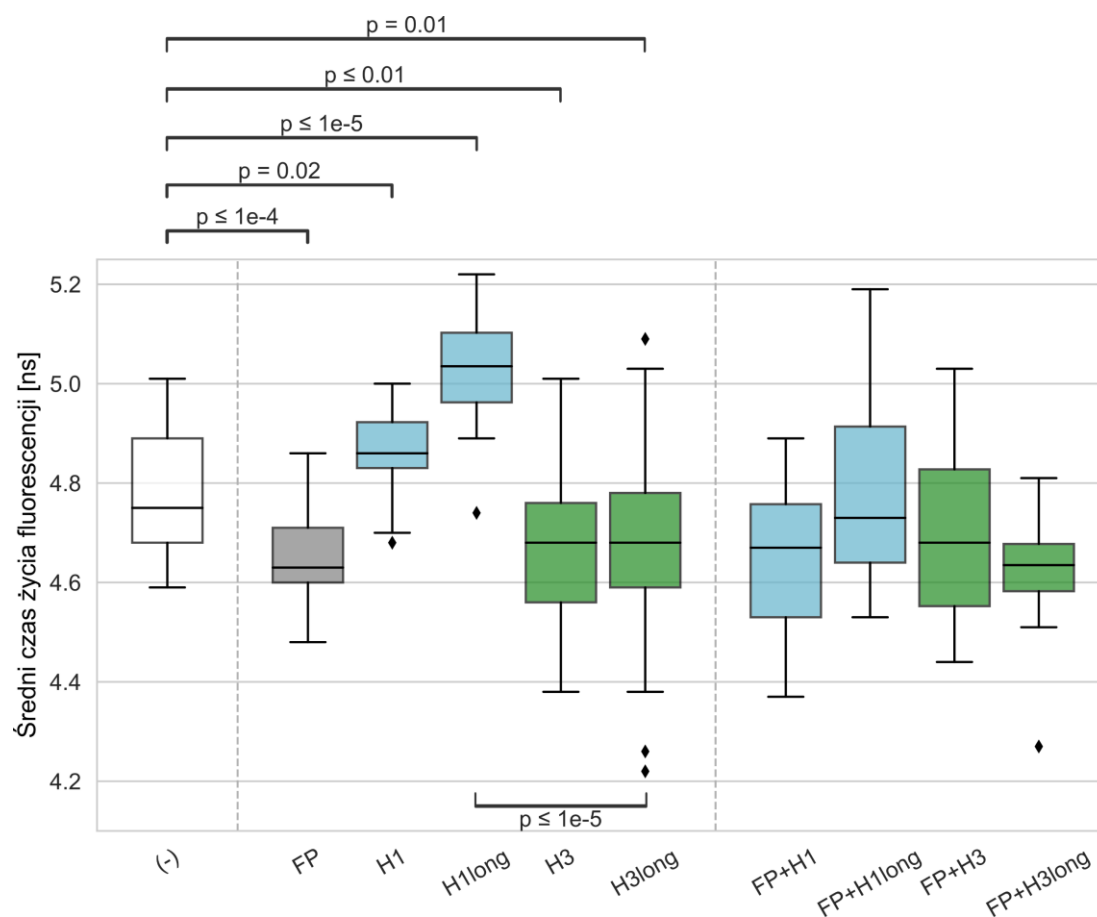
najbardziej widoczne różnice w obrazach liposomów GUUV, reprezentatywne wyniki zaprezentowano w formie obrazów mikroskopowych liposomów pokolorowanych zgodnie z wartościami ΔF (Rycina 32A). Dodatkowo przykładowe krzywe zaniku dla C6-NBD-PE w obecności peptydów H1long i H3long wraz z dopasowanymi krzywymi eksponentialnymi i rozkładami reszt przedstawia Rycina 32B.



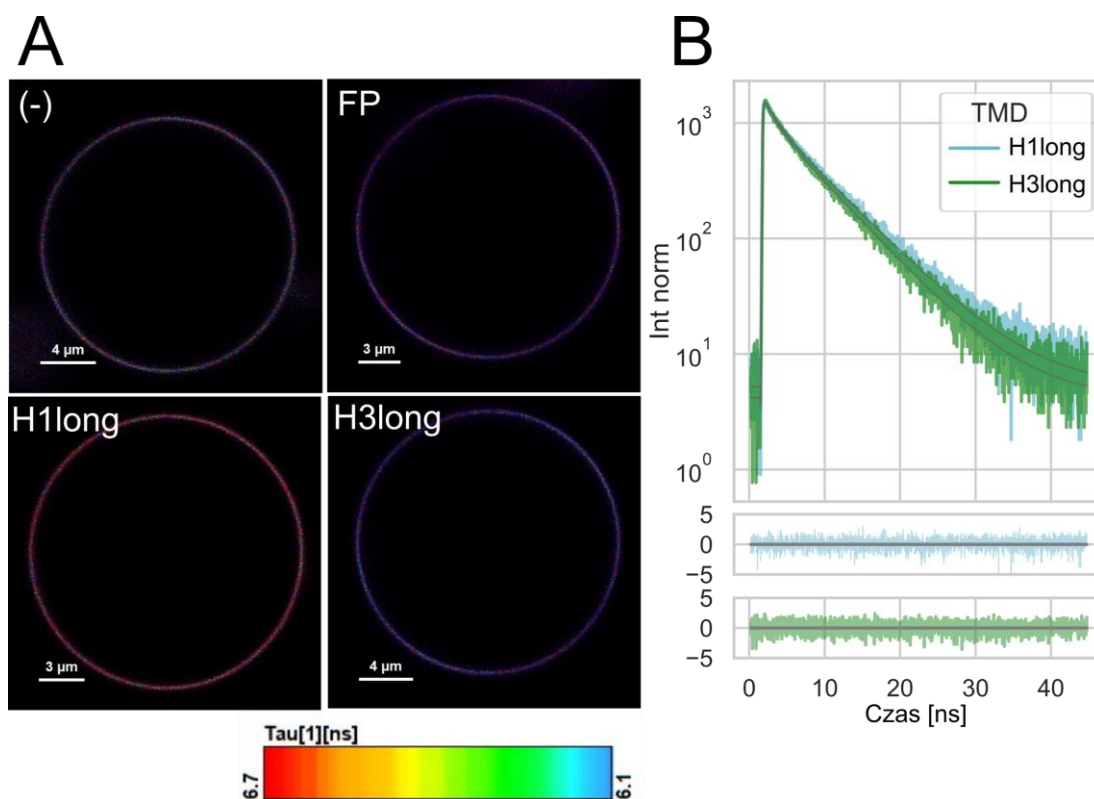
Rycina 29 A) Wzór chemiczny barwnika fluorescencyjnego C6-NBD-PE, B) Ilustracja przedstawiająca głębokość wnikania analogu 6-NBD-PC. Barwnik C6-NBD-PE różni się od 6-NBD-PC częścią hydrofilową fosfolipidu (tzw. głową fosfolipidową). Panel B przedstawia oryginalną ilustrację z publikacji [Marquezin i wsp., 2019], za zgodą wydawnictwa. Zgoda udzielona przez Copyright Clearance Center.



Rycina 30 Przykładowe krzywe zaniku fluorescencji barwnika C6-NBD-PE w liposomach GU o składzie POPC i POPC/chol (60/40 mol%), pH 5. Przedstawiono znormalizowane względem maksimum zliczeń krzywe zaniku fluorescencji razem z dopasowanym modelem funkcji eksponentialnej oraz resztami z dopasowania.



Rycina 31 Średni czas życia fluorescencji (τ_{avr}) barwnika C6-NBD-PE w liposomach GUW o składzie POPC w pH 5. Przedstawiono wyniki dla kontroli bez peptydu (-) oraz w obecności pojedynczych peptydów lub mieszanek FP:TMD. Stosunek lipid:peptyd wynosił 1:50 ($n=30$). Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya.

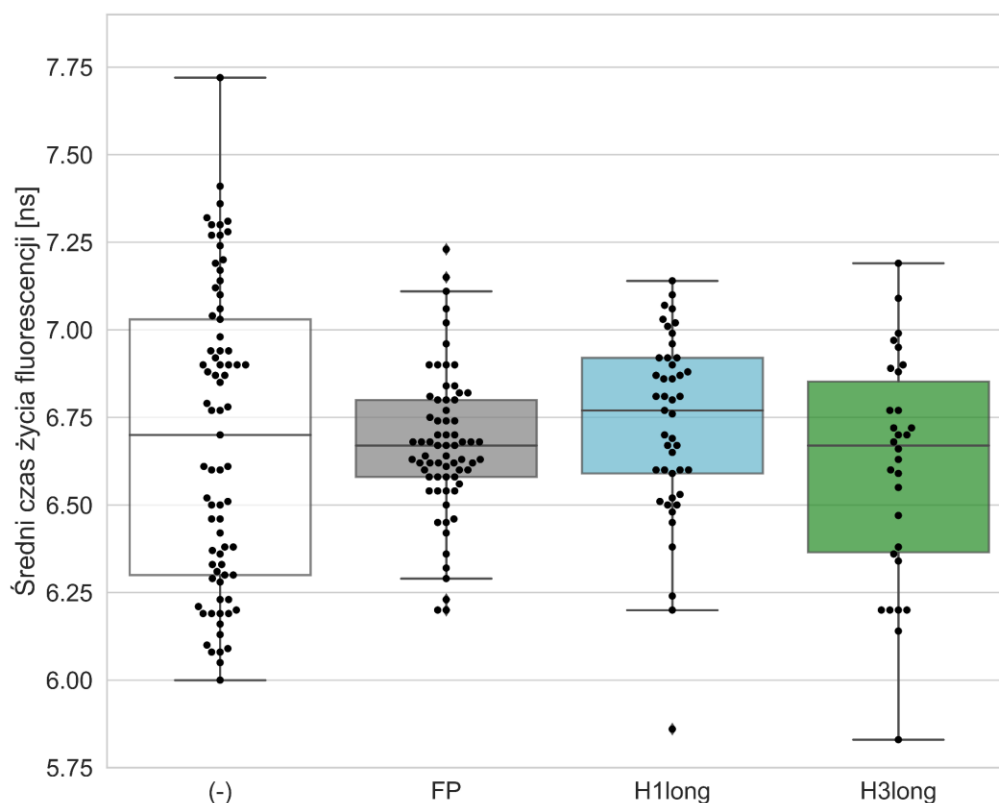


Rycina 32 A) Reprezentatywne zdjęcia liposomów GUV o składzie POPC bez peptydu (-) i po dodaniu peptydów FP, H1long, H3long w buforze pH 5. Piksele zostały pokolorowane zgodnie z wartościami τ_1 dla barwnika C6-NBD-PE, B) Przykładowe znormalizowane krzywe zaniku fluorescencji barwnika C6-NBD-PE z dopasowanymi krzywymi eksponentialnymi oraz rozkładami reszt, zmierzone dla liposomów GUV z dodanymi peptydami H1long oraz H3long. Stosunek lipid:peptyd wynosił 1:50.

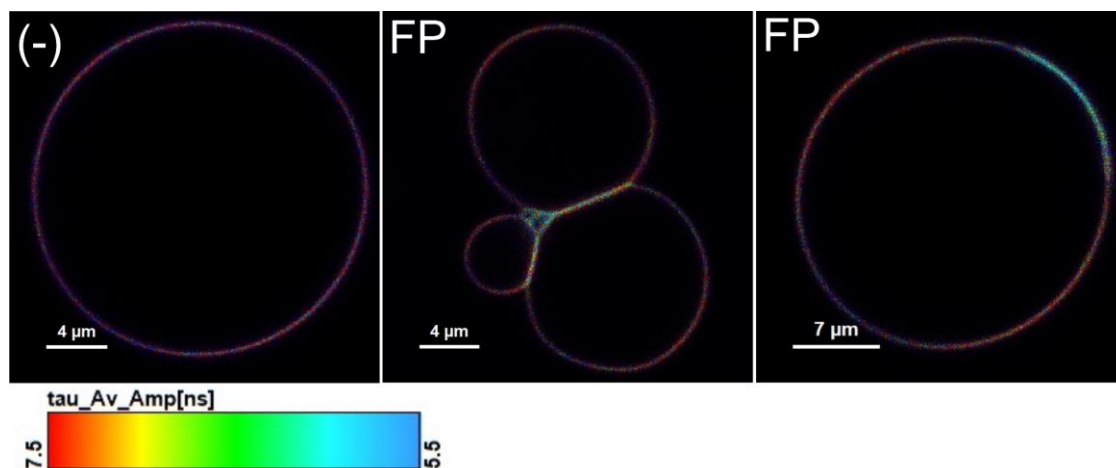
W kolejnym etapie badań badano czas życia fluorescencji C6-NBD-PE wbudowanego w liposomy GUV o składzie POPC/chol (60/40 mol %). W pierwszej serii eksperymentów zmierzono τ_{avr} barwnika C6-NBD-PE w błonie bez dodatku peptydów (oznaczone jako (-)), który wynosił $6,69 \pm 0,43$ ns. W zgodzie z danymi literaturowymi, średni czas życia fluorescencji barwnika C6-NBD-PE wzrastał wraz ze wzrastającym stężeniem cholesterolu [Stöckl i wsp., 2008]. Przykładowe krzywe zaniku dla stosowanego barwnika w błonie POPC oraz POPC/chol przedstawia Rycina 30. Następnie do dalszych eksperymentów wybrano peptydy, które indukowały największą zmianę w średnim czasie życia fluorescencji w błonie POPC. Zastosowano FP oraz dłuższe wersje peptydów odpowiadającym TMD, czyli H1long oraz H3long. Wyniki nie pokazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi czasami życia fluorescencji barwnika w liposomach bez peptydów (-) a liposomach po dodaniu peptydów (Rycina 33). W związku z tym nie przeprowadzono dalszych eksperymentów z krótszymi wersjami peptydów H1 oraz H3 oraz mieszkankami FP:TMD.

Mimo braku zmian wartości τ_{avr} w przypadku peptydu FP, w pojedynczych przypadkach zaobserwowano rozdział błony liposomów na dwie fazy lipidowe o różnych

średnich czasach życia fluorescencji. Podczas gdy jedna z faz ma wyraźnie niższy τ_{avr} , druga faza ma wartość zbliżoną do τ_{avr} do błony bez peptydu (Rycina 34). W eksperymentach nie zaobserwowano podobnych efektów w przypadku peptydów H1long i H3long.



Rycina 33 Średni czas życia fluorescencji (τ_{avr}) barwnika C6-NBD-PE w liposomach GUV o składzie POPC/chol (60/40 mol %) w pH 5. Przedstawiono wyniki dla kontroli bez peptydu (-) oraz w obecności peptydów FP, H1long, H3long. Stosunek lipid:peptyd wynosił 1:50 (n=77-30).



Rycina 34 Przykładowe zdjęcia liposomów GUV bez peptydu (-) oraz z widocznym rozdzieleniem na fazy lipidowe po dodaniu peptydu FP. Piksele zostały pokolorowane zgodnie z wartościami τ_{avr} dla barwnika C6-NBD-PE. Liposomy GUV o składzie POPC/cholesterol (60/40 mol%), bufor pH 5.

4.7. Optymalizacja przygotowania błony SLB

Po zbadaniu wpływu pojedynczych peptydów na błonę lipidową, w kolejnym etapie badań wykorzystano cząstki wirusopodobne VLP (ang. *virus-like particles*) zawierające pełnej długości hemaglutyninę. Ich aktywność fuzyjna była analizowana z zastosowaniem modelowej dwuwarstwy lipidowej na podłożu SLB (ang. *supported lipid bilayer*). Błona SLB może być bezpośrednio obrazowana za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Dzięki dużej powierzchni SLB możliwa jest detekcja fuzji cząstek VLP nawet przy użyciu ich niewielkiego stężenia.

Proces przygotowania błony SLB wymagał odpowiedniej optymalizacji. Do otrzymania błony SLB konieczne jest przygotowanie powierzchni, na której osadzona jest dwuwarstwa lipidowa. Szczególnie istotne jest odpowiednie oczyszczenie szkła na świeżo przed przygotowaniem. Czyszczenie przed użyciem ma na celu pozbycie się organicznych zanieczyszczeń i uzyskanie jak najbardziej hydrofilowej powierzchni. W literaturze najczęściej opisywane są metody z użyciem roztworu pirania (mieszanina stężonego kwasu siarkowego i nadtlenu wodoru) lub plazmy [Burns i wsp., 2005; Nguyen i wsp., 2015]. Ze względu na brak możliwości zastosowania tych metod, jako alternatywę wykorzystano czyszczenie szkła za pomocą kwasu chromowego.

Na przygotowaną powierzchnię dodawano liposomy w celu utworzenia dwuwarstwy lipidowej. W trakcie optymalizacji testowano zarówno małe liposomy SUV (średnica poniżej 100 nm), jak i duże liposomy LUV (średnica powyżej 100 nm). Oprócz tego analizowano wpływ modyfikowanych lipidów PEG-PE na strukturę błony. Pokazano, że obecność lipidów z PEG sprzyja formowaniu się dwuwarstwy, tworząc tzw. poduszkę pomiędzy błoną a szkłem [Pace i wsp., 2015]. W eksperymentach porównywano liposomy

LUV zawierające 5 mol% PEG-PE oraz pozbawione tego lipidu. Liposomy nanoszono na powierzchnię w buforze zawierającym jony Ca^{2+} , które indukują rozpadanie się liposomów i powstanie dwuwarstwy lipidowej na szkle [Reviakine & Brisson, 2000]. Dodatek jonów Ca^{2+} jest standardowym warunkiem eksperymentu i nie był optymalizowany. Różne warunki eksperymentalne przedstawia Tabela 11.

Po przygotowaniu zbadano funkcjonalność otrzymanej błony SLB w każdych warunkach. Brano także pod uwagę powtarzalność wyników. Sprawdzano, czy dwuwarstwa lipidowa zachowuje mobilność lipidów, podobnie jak w błonie komórkowej. W tym celu wyznaczono współczynnik dyfuzji znakowanego fluorescencyjnego lipidu w błonie SLB. W tym wypadku najczęściej wykorzystuje się technikę odzysku intensywności fluorescencji po fotowysbieleniu FRAP (ang. *fluorescence recovery after photobleaching*) lub FCS (ang. *fluorescence correlation spectroscopy*). FRAP opiera się na analizie powrotu sygnału fluorescencji po poddaniu obszaru błony fotowysbieleniu. Natomiast w metodzie FCS analizuje się fluktuacje fluorescencji pojedynczych cząstek w czasie. Dokładny opis techniki FCS został przedstawiony w rozdziale 1.6.2. W niniejszej pracy doktorskiej zastosowano metodę FCS, która pozwala na dokładne wyznaczenie współczynnika dyfuzji barwnika, dzięki wysokiej rozdzielczości czasowej i przestrzennej. Metoda ta zapewnia bardzo powtarzalne wyniki współczynnika dyfuzji [Macháň i wsp., 2016].

Wstępne dane uzyskane z pomiarów FCS posłużyły do porównania różnych warunków przygotowania błony. Na podstawie otrzymanych krzywych autokorelacji oraz wyznaczonych czasów dyfuzji oceniano, czy w danej błonie SLB zachodziła dyfuzja lipidów. W przypadku jej braku obserwowano brak korelacji sygnału w czasie (podobną krzywą autokorelacji przedstawia Rycina 35B) oraz otrzymywano wysokie czasy dyfuzji. Natomiast w próbkach z obecnością dyfuzji lipidów czasy dyfuzji barwnika wynosiły kilka tysięcy μs (przykładową krzywą autokorelacji przedstawia Rycina 35C).

Wyniki wskazywały na obecność dyfuzji lipidów zarówno w błonach SLB przygotowanych z liposomów SUV, jak i liposomów LUV. Ze względu na to, że przygotowanie liposomów LUV było mniej czasochłonne, wykorzystywano je w dalszej analizie. Natomiast w błonie bez dodatku PEG-PE nie zaobserwowano dyfuzji lipidów, dlatego w kolejnych eksperymentach wykorzystywano błonę zawierającą PEG-PE (Tabela 11). W dalszym etapie badań przygotowano błonę SLB z liposomów LUV zawierających PEG-PE (Warunek 2 w Tabela 11).

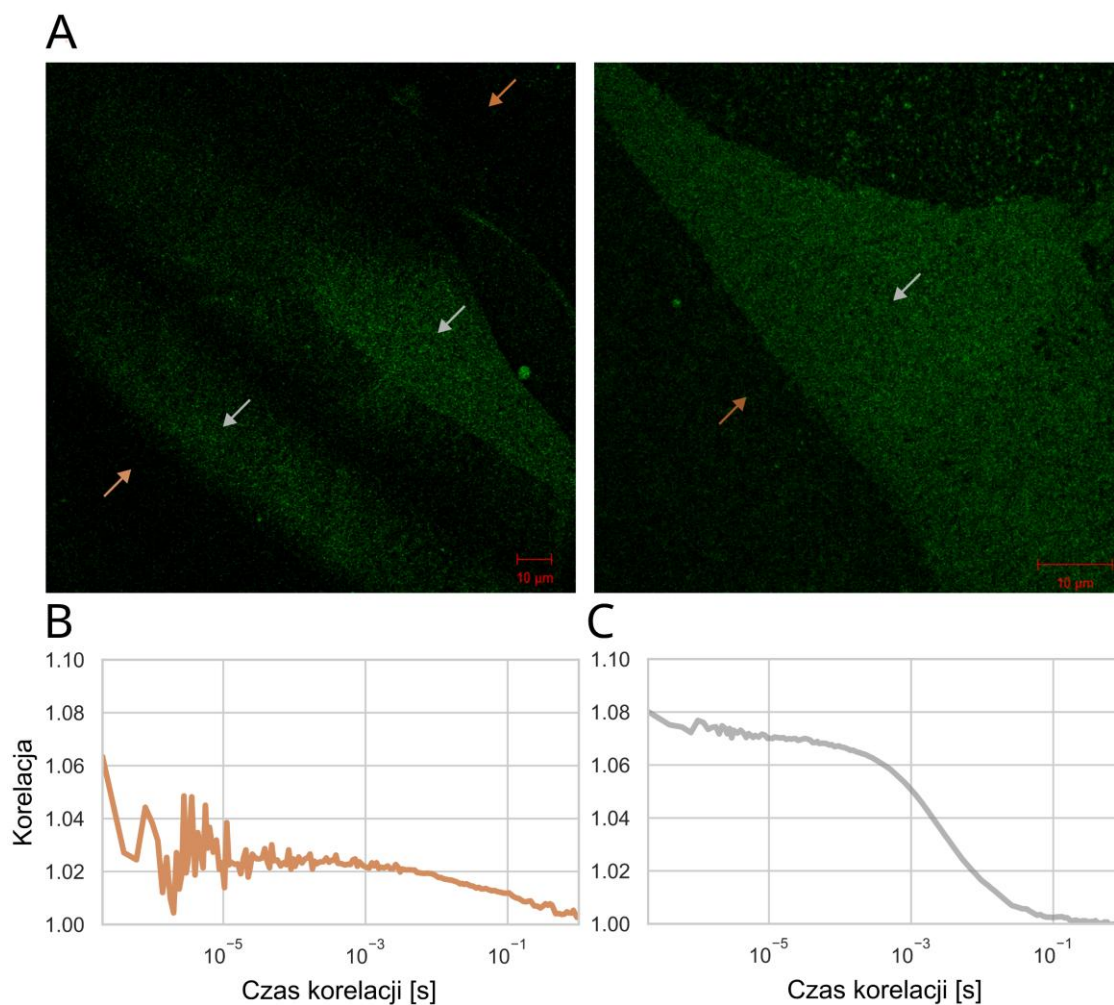
Tabela 11 Podsumowanie warunków eksperymentalnych podczas optymalizacji przygotowania błony SLB na szkle.

Warunki eksperymentalne	Warunek 1	Warunek 2	Warunek 3
Rodzaj liposomów	SUV (< 100 nm)	LUV (> 100 nm)	LUV (> 100 nm)
Obecność lipidów PEG	+	+	-
Obecność mobilności lipidów	+	+	-

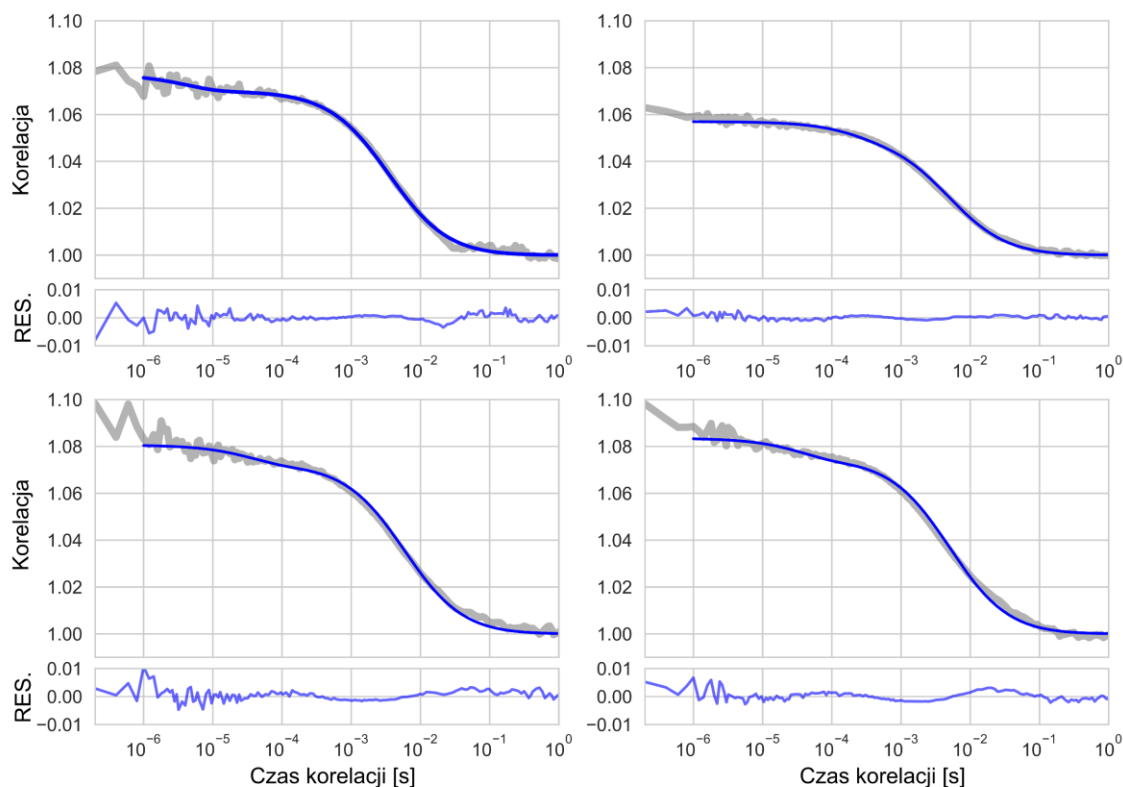
Gdzie: (+) oznacza obserwowaną dyfuzję lipidów, (-) nieobserwowana dyfuzja lipidów

W wybranych warunkach eksperymentalnych, z wykorzystaniem liposomów LUV o składzie lipidowym POPC/chol/PEG-PE/Atto 488 (55/40/5/0,02 mol%), obrazowanie mikroskopowe wykazało obecność dwóch obszarów o różnej intensywności fluorescencji (Rycina 35A). Może to wynikać z nieuniknionego niszczenia części błony podczas etapu płukania lub nierówności szkła na poziomie atomowym [Goodchild i wsp., 2019]. W ciemniejszych obszarach nie obserwowano dyfuzji lipidów, natomiast w obszarach jaśniejszych, zawierających większą ilość barwnika, występowała mobilność (Rycina 35B i C). Na podstawie 19 pomiarów wykonanych w jaśniejszych obszarach, obliczono współczynniki dyfuzji barwnika w błonie SLB. Przykładowe krzywe autokorelacji z dopasowanymi funkcjami autokorelacji oraz resztami z dopasowania zostały przedstawia Rycina 36. Wyniki otrzymane na podstawie dopasowanej funkcji autokorelacji przedstawia Tabela 12. Otrzymane czasy dyfuzji wykorzystywano do obliczenia współczynnika dyfuzji, zgodnie z równaniem 1.7, a jego wartość wynosiła $1,82 \pm 0,61 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Otrzymana w badaniach wartość współczynnika dyfuzji jest zbliżona do wartości literaturowych. W zależności od składu lipidowego modelowej błony, współczynnik dyfuzji może się zmieniać. Zgodnie z danymi literaturowymi, wartości wyznaczone za pomocą FCS wahają się od 1,1 do $4,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [Benda i wsp., 2003; Zhang i wsp., 2005; Machán & Hof, 2010]. Współczynnik dyfuzji zależy od wielu czynników, w tym metody pomiaru, jak i składu lipidowego oraz rodzaju podłoża, na którym przygotowano SLB. W przypadku, gdy obecny jest w składzie lipidowym cholesterol, tak jak w błonie opisanej w tej pracy, obserwuje się mniejsze wartości współczynnika dyfuzji w błonie SLB [Zhang i wsp., 2020].



Rycina 35 A) Przykładowe zdjęcia mikroskopowe pokazujące błonę SLB. Obszary z mobilną dwuwarstwą lipidową zaznaczono szarymi strzałkami, miejsca, w których brak mobilności zaznaczone brązowymi strzałkami. Pasek skali 10 μm . Skład błony SLB: POPC/chol/PEG-PE/Atto 488 (55/40/5/0,02 mol %), pH 5. B) Przykładowa krzywa autokorelacji dla obszarów, w których nie występowała mobilność lipidów, C) Przykładowa krzywa autokorelacji dla obszarów, w których występowała mobilność lipidów.



Rycina 36 Przykładowe krzywe autokorelacji mierzone metodą FCS dla błony SLB w obszarach, w których lipidy wykazywały mobilność. Na wykresach przedstawiono krzywe autokorelacji (szare) oraz dopasowane funkcje autokorelacji wraz z resztami (niebieskie). Skład błony: POPC/choI/PEG-PE/Atto 488 (55/40/5/0,02 mol %), bufor pH 5.

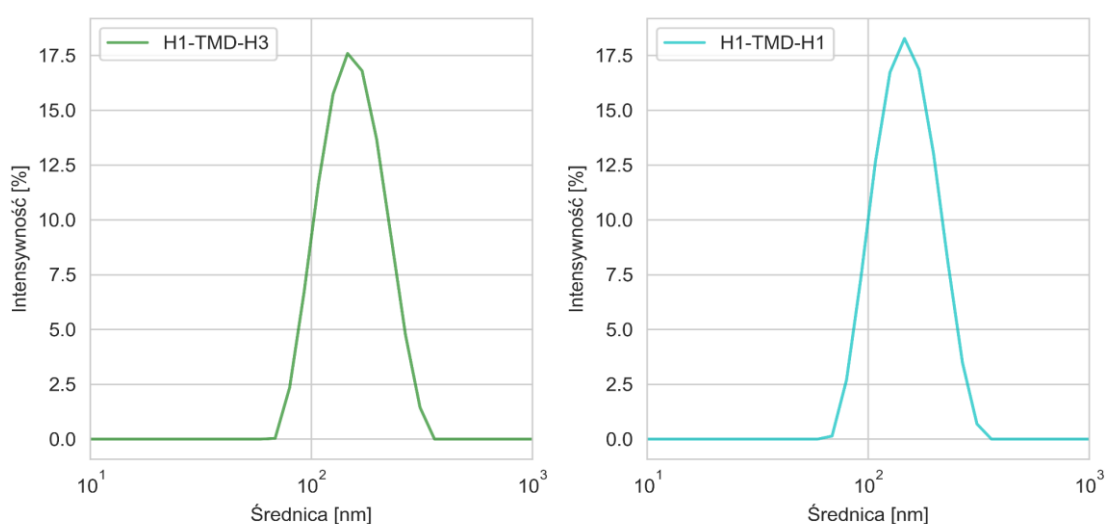
Tabela 12 Podsumowanie wyników dla przykładowych eksperymentów FCS dla błony SLB. Wyniki dla każdego eksperymentu zostały uzyskane na podstawie 4-6 uśrednionych pomiarów.

Zliczenia na cząstkę CPM [kHz]	Liczba cząstek	Stan trypletowy [%]	Czas relaksacji stanu trypletowego [μ s]	Czas dyfuzji [μ s]
11,5	15,3	5	24,7	4047,2
10,6	18,6	7,7	46	3904,3
7,3	13,7	9,8	28	5460,1
8,8	13,2	10,3	24,8	4676,4

4.8. Badanie aktywność fuzyjnej cząstek VLP

Do zbadania funkcji domeny transbłonowej w białku pełnej długości wykorzystano cząstki wirusopodobne (VLP) w dwóch wersjach: H1-TMD-H1 oraz H1-TMD-H3. Cząstki H1-TMD-H1 zawierały HA pełnej długości podtypu H1, natomiast w wersji H1-TMD-H3 fragment TMD został zastąpiony domeną należącą do podtypu H3. Dzięki temu możliwe było zbadanie TMD pochodzących z różnych grup filogenetycznych w białku pełnej długości. Pozwoliło to na ocenę wpływu TMD na proces fuzji. Zaletami zastosowania VLP jest to, że przypominają one wielkością i strukturą wirusy, ale nie zawierają materiału genetycznego [Schmeisser i wsp., 2012; McCraw i wsp., 2018].

Po otrzymaniu i oczyszczeniu cząstek VLP, zgodnie z opisem znajdującym się w artykule Borkowska i wsp. [2024], scharakteryzowano ich wielkość oraz ilość za pomocą pomiarów DLS oraz MADLS (ang. *multi-angle dynamic light scattering*). Uzyskano monodispersyjny rozkład cząstek o wielkości około 140 nm w obu badanych próbkach (Rycina 37), a średnia liczba cząstek była podobna dla H1-TMD-H1 oraz H1-TMD-H3 (Tabela 13). Otrzymane wielkości cząstek były podobne do wielkości wirionu grypy [Bouvier & Palese, 2008].



Rycina 37 Przykładowe wyniki pomiarów DLS dla cząstek wirusopodobnych VLP, A) Wyniki dla H1-TMD-H1 średnia wielkość cząstek $z_{avr}=142$ nm, B) Wyniki dla H1-TMD-H3 średnia wielkość cząstek $z_{avr}=145$ nm.

Tabela 13 Podsumowanie liczby cząstek VLP na ml na podstawie pomiarów MADLS

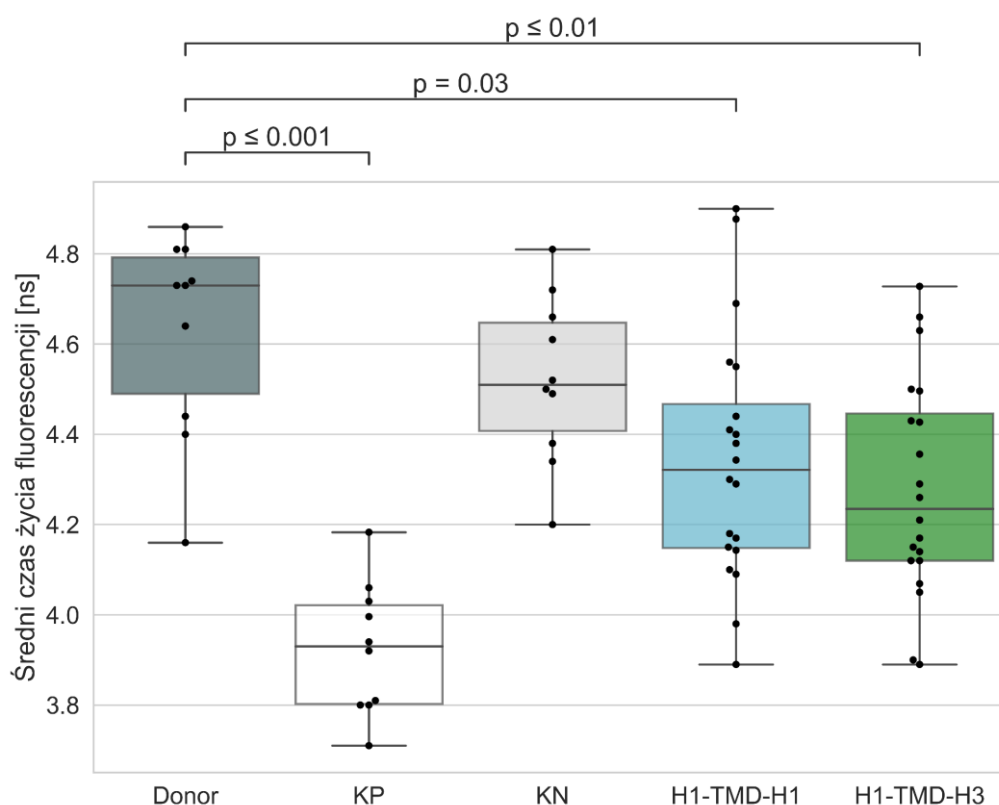
Nazwa VLP	Średnia liczba cząstek [10^{10} cząstek/ml]
H1-TMD-H1	$1,52 \pm 0,05$
H1-TMD-H3	$1,34 \pm 0,09$

Stężenie białka zostało wyznaczone metodą BCA (kwas bicynchoninowy) i wykonane przez dr. Szymona Kubiszewskiego-Jakubiaka. Oba warianty cząstek, H1-TMD-H1 oraz H1-TMD-H3, zawierały porównywalne stężenie HA wynoszące około 0,7 μ M. W związku z tym, do dalszych testów stosowano jednakowe objętości VLP.

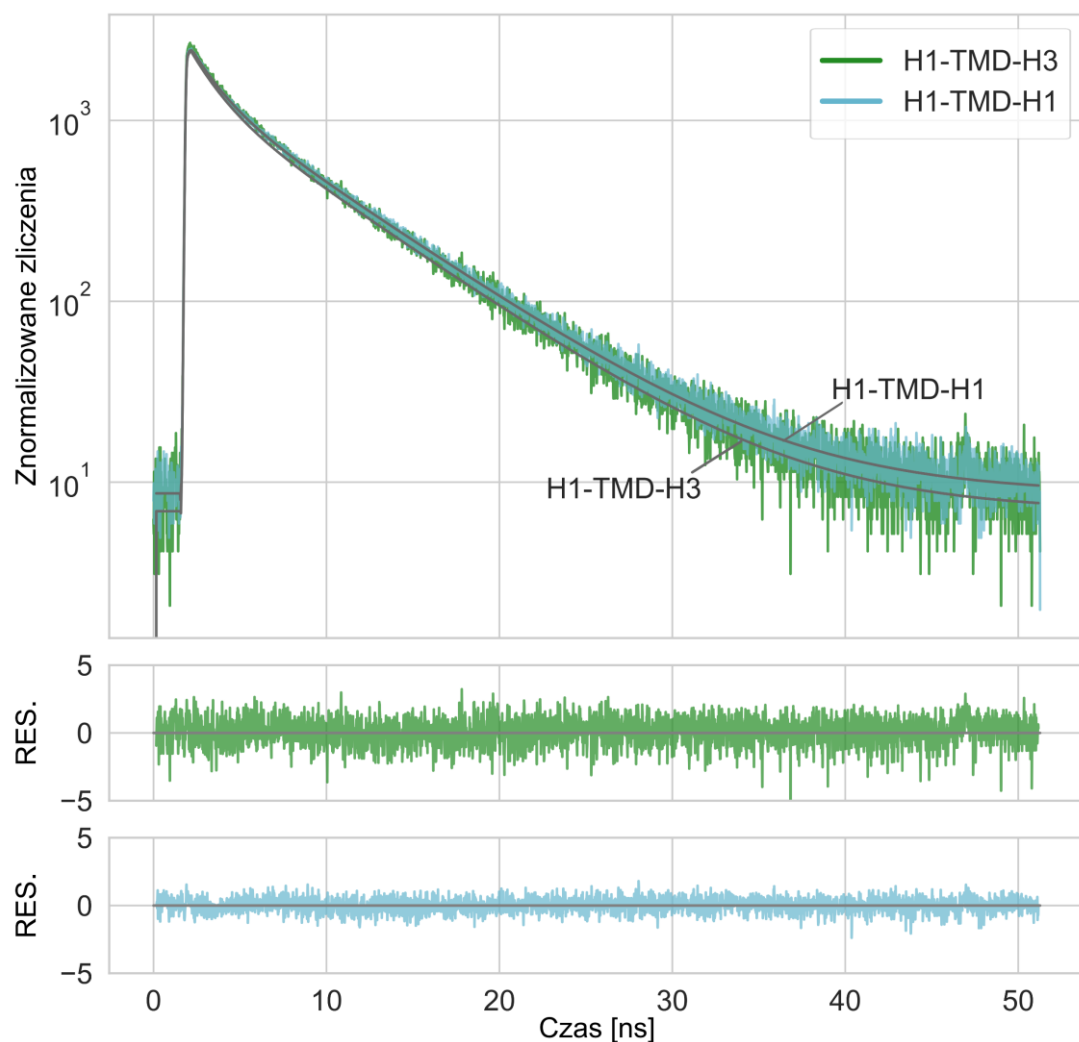
Do oceny aktywności fuzyjnej cząstek VLP wykorzystano test oparty na FRET-FLIM. Jako modelu błony użyto błony SLB przygotowanej zgodnie z zoptymalizowanym protokołem. Wykorzystano błonę o składzie lipidowym: POPC/cho/PEG-PE/Atto 488 (55/40/5/0,02 mol %), która zawierała wysoką zawartość cholesterolu, co miało odpowiadać domenom bogatym w cholesterol.

Test wymagał przygotowania odpowiednich kontroli eksperymentalnych, które pozwoliły na interpretację wyników FRET-FLIM i ocenę fuzji VLP. Przygotowano trzy kontrole eksperymentalne. Donor - błona zawierała tylko donor. Kontrola pozytywna (KP) - błona zawierała donor i akceptor, w tym wariancie zachodzi FRET, dlatego oczekiwano obniżenia wartości czasu życia fluorescencji donora. Kontrola negatywna (KN) - błona zawierała donor oraz liposomy LUV (zawierające akceptor), które nie ulegały fuzji z błoną SLB. W związku z tym w KN nie powinien być obserwowany FRET ani zmiana czasu życia fluorescencji donora. W przypadku fuzji cząstek VLP z błoną dochodziło do transferu energii (FRET) pomiędzy donorem i akceptorem, co prowadziło do spadku czasu życia fluorescencji donora.

W eksperymencie analizowano zmiany w średnim czasie życia fluorescencji donora (τ_{avr}). Dla samego donora τ_{avr} wynosił $4,73 \pm 0,23$ ns (Rycina 38). Zgodnie z oczekiwaniami, dla KP zaobserwowano istotny statystycznie spadek średniego czasu życia fluorescencji do $3,92 \pm 0,15$ ns w porównaniu do samego donora. Natomiast w KN nie występowały zmiany, τ_{avr} wynosił $4,52 \pm 0,19$ ns. W przypadku obu wariantów VLP zaobserwowano spadek średniego czasu życia fluorescencji do $4,34 \pm 0,28$ ns dla H1-TMD-H1 oraz $4,28 \pm 0,25$ ns dla H1-TMD-H3. Chociaż test nie wykazał istotnych statystycznie różnic pomiędzy H1-TMD-H3 a H1-TMD-H1, widoczne były różnice w krzywych zaniku oraz średnia wartość τ_{avr} była niższa dla H1-TMD-H3 (Rycina 39).



Rycina 38 Średni czas życia fluorescencji (τ_{avr}) fluoroforu NBD-PE w błonie SLB o składzie POPC/chol/PEG-PE/Atto 488 (55/40/5/0,02 mol%) w pH 5 (n=10-20). Przedstawione warunki eksperymentalne: Donor - błona SLB z wbudowanym donorem NBD-PE, KP (kontrola pozytywna) - błona SLB z wbudowanym donorem NBD-PE oraz akceptorem Rh-PE, KN (kontrola negatywna) - błona SLB z wbudowanym donorem NBD-PE po dodaniu liposomów LUV barwionych akceptorem Rh-PE, H1-TMD-H1 - błona SLB z wbudowanym donorem NBD-PE po dodaniu barwionych Rh-PE cząstek H1-TMD-H1, H1-TMD-H3 - błona SLB z wbudowanym donorem NBD-PE po dodaniu barwionych Rh-PE cząstek H1-TMD-H3. Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu Manna Whitney.



Rycina 39 Przykładowe krzywe zaniku fluorescencji barwnika NBD-PE (donor) w błonie SLB w obecności cząstek wirusopodobnych H1-TMD-H3 oraz H1-TMD-H1 barwionych Rh-PE (akceptor). Przedstawiono krzywe zaniku fluorescencji NBD-PE, znormalizowane względem maksimum zliczeń, razem z dopasowanym modelem funkcji eksponentialnej oraz resztami z dopasowania. Skład lipidowy błony SLB: POPC/chol/PEG-PE/Atto 488 (55/40/5/0,02 mol%), bufor pH 5.

5. Dyskusja

Hemaglutynina, białko fuzyjne wirusa grypy typu A, jest jednym z najlepiej przebadanych białek wirusowych. Pomimo licznych badań nad HA, proces fuzji pozostaje wciąż nie do końca zrozumiany. Większość przeprowadzonych dotychczas badań skupiało się na peptydzie fuzyjnym hemaglutyniny, uznanym za główny fragment HA odpowiedzialny za inicjację fuzji. Wykazano, że sam FP powoduje hemifuzję błon, jednak do zajścia pełnej fuzji wymagana jest obecność całego białka [Armstrong i wsp., 2000; Lousa & Soares, 2021]. Rola domeny transbłonowej w tym procesie pozostaje słabo zbadana, mimo że zarówno FP, jak i TMD są wymagane do pełnej fuzji błony otoczki wirusowej z błoną późnych endosomów. Jak dotąd nie wyjaśniono, jaka jest rola TMD w fuzji ani jaki mechanizm odpowiada za jej działanie. Co istotne, podtypy HA dzielą się na dwie grupy filogenetyczne, w których sekwencja TMD znacznie różni się między podtypami. Ze względu na bliskie przestrzenne położenie FP i TMD podczas procesu fuzji, zaproponowano, że ich oddziaływanie może prowadzić do pełnej fuzji błon otoczki wirusa oraz błony endosomalnej [Chen i wsp., 1999; Tamm, 2003; Chang i wsp., 2008]. W literaturze pojawiają się jednak sprzeczne doniesienia na temat występowania oddziaływania FP:TMD [Chang i wsp., 2008; Lai & Freed, 2015; Ranaweera i wsp., 2019].

W związku z tymi rozbieżnościami niniejsza praca doktorska skupiała się na zweryfikowaniu potencjalnego oddziaływania pomiędzy FP i TMD. Badania miały na celu sprawdzenie hipotezy, że domena transbłonowa oddziałuje z peptydem fuzyjnym hemaglutyniny w sposób synergiczny, co prowadzi do pełnej fuzji wirusa grypy. Dodatkowym celem niniejszej pracy było zbadanie różnic pomiędzy TMD pochodzącymi z dwóch różnych grup filogenetycznych. W dalszej części dyskusji zostaną omówione uzyskane dane podzielone na sekcje tematyczne.

5.1. Lokalizacja oraz aktywność FP i TMD w błonie lipidowej

Analiza mechanizmów molekularnych leżących u podstaw aktywności fuzyjnej FP oraz TMD jest trudna do przeprowadzenia w białku pełnej długości. W związku z tym zastosowano uproszczony model w postaci syntetycznych peptydów. Syntetyczne FP są powszechnie wykorzystywane jako modele do badania peptydów fuzyjnych białek wirusowych [Nieva & Agirre, 2003; Harrison, 2015]. W przedstawionych badaniach jako modele fragmentów FP i TMD stosowano właśnie syntetyczne peptydy. W przypadku TMD użyto czterech wariantów TMD pochodzących z dwóch różnych grup filogenetycznych oraz wersji dłuższych i krótszych. Dłuższe wersje peptydów TMD (H1long oraz H3long) zawierały motywy, które potencjalnie oddziałują z cholesterolem [de Vries i wsp., 2015; Hu i wsp., 2019]. Należy jednak pamiętać, że peptydy nie w pełni odzwierciedlają aktywność pełnego białka, dlatego w niniejszej pracy wykorzystano także HA pełnej długości w cząstkach VLP.

Aby lepiej zrozumieć aktywność FP i TMD, istotne jest, aby przeanalizować każdy z tych elementów osobno. Warto przypomnieć znane z literatury informacje o FP hemaglutyniny, który jest jednym z najlepiej przebadanych wirusowych peptydów fuzyjnych. FP o długości 23 reszt aminokwasowych przyjmuje w błonie lipidowej strukturę spinki do włosów (ang. *hairpin*) [Lorieau i wsp., 2010; Brice & Lazaridis, 2014]. Prawdopodobnie FP fluktuuje pomiędzy transbłonową oraz powierzchniową konformacją. Zagłębiona w błonie transbłonowa konformacja jest związana z wysoką aktywnością fuzyjną FP [Victor i wsp., 2015; Lousa i wsp., 2016].

W porównaniu do FP, którego lokalizacja i konformacje w błonie lipidowej zostały dobrze scharakteryzowane [Lousa & Soares, 2021], umiejscowienie TMD w dwuwarstwie pozostaje znacznie słabiej poznane. Do zbadania peptydów TMD wykorzystano w tej pracy metodę opartą o zjawisko FRET oraz analizę wygaszania fluorescencji reszt Trp lub Tyr za pomocą akrylamidu. Metody te pozwoliły na zbadanie oddziaływania peptydów TMD z błoną lipidową oraz głębokości ich wbudowania. Pokazano, że wszystkie badane peptydy oddziaływały z błoną lipidową, a krótsze wersje H1 oraz H3 były głęboko wbudowane, prawdopodobnie przyjmując konformacje transbłonowe. Natomiast na podstawie przeprowadzonych testów nie można było jednoznacznie stwierdzić, czy dłuższe wersje H1long i H3long były peptydami transbłonowymi, czy też powierzchniowymi. Nie było można było również ich rozróżnić, ponieważ oba peptydy zawierały dwie reszty aromatyczne. Wyniki dotyczące oddziaływania peptydów TMD z błoną lipidową, były zgodne z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że peptydy TMD z różnych podtypów oddziaływały z błoną i przyjmowały konformację transbłonową [Tatulian & Tamm, 2000; Chang i wsp., 2008; Victor i wsp., 2012]. Jednak w niniejszej pracy zastosowano peptydy różnej długości, których nie wykorzystywano we

wcześniejszych badaniach. Z tego powodu potrzebna była osobna weryfikacja wbudowania peptydów TMD w błonę lipidową.

Do oceny funkcjonalności peptydów kluczowe jest zastosowanie metod pozwalających na analizę aktywności fuzyjnej. Ogólna ocena aktywności fuzyjnej peptydów w błonie lipidowej opiera się na kilku komplementarnych metodach badawczych [Lozada i wsp., 2021]. Do dwóch najważniejszych należą test wyciekania zawartości z liposomów oraz test mieszania lipidów. Proces fuzji składa się z kilku etapów, a każda z wymienionych metod pozwala ocenić aktywności peptydów na różnych etapach fuzji. Wyciekanie zawartości z liposomów jest skutkiem ubocznym destabilizacji błony podczas fuzji [Shangguan i wsp., 1996; Müller i wsp., 2003]. Z kolei test mieszania lipidów pozwala na wykrycie hemifuzji, podczas której dochodzi do połączenia się dwóch błon, jednak nie pozwala rozróżnić hemifuzji od pełnej fuzji [François-Martin & Pincet, 2017].

W pracy doktorskiej zastosowano zarówno test wyciekania zawartości z liposomów, jak i mieszania lipidów w celu oceny aktywności błonowej i fuzyjnej badanych peptydów. FP wykazywał aktywność błonową, której poziom zależał od składu lipidowego błony oraz pH środowiska. W testach z FP oraz jego mutantami E11A i W14A zaobserwowano, że E11A charakteryzował się najwyższą aktywnością błonową, natomiast W14A najniższą. Dla wszystkich trzech peptydów aktywność była niższa w błonie zawierającej cholesterol niż w błonie o składzie POPC (Rycina 23 i Rycina 24). Najniższa aktywność była obserwowana w pH 7,4 w obecności cholesterolu (Rycina 25). W przeciwieństwie do aktywności błonowej, aktywność fuzyjna FP była wyższa w błonie zawierającej cholesterol (POPC/chol, 60/40 mol%) niż w błonie bez tego lipidu (Rycina 27 i Rycina 28).

Należy pamiętać o tym, że proces fuzji jest indukowany w późnych endosomach w pH około 5. Chociaż błony endosomów są zubożone w cholesterol w porównaniu do błony komórkowej, występują w nich domeny bogate w ten lipid [Kobayashi i wsp. 1998; Sobo i wsp., 2007; Nada i wsp., 2009]. Proces fuzji indukowany przez FP wydaje się przebiegać odmiennie w błonie bez cholesterolu niż w błonie z tym lipidem. Różnice te mogą wynikać zarówno z odmiennego mechanizmu fuzji, jak i ze zmiany konformacji FP w obecności cholesterolu. Podczas gdy w błonie pozbawionej cholesterolu fuzji towarzyszy wyciekanie zawartości [Esbjörner i wsp., 2007; Chang i wsp., 2008], w błonie z cholesterolem następuje fuzja bez takiego efektu [Rice i wsp., 2022]. Podobny spadek wyciekania zawartości z liposomów indukowany przez FP zaobserwowano w niniejszych badaniach. W błonie lipidowej o składzie POPC/chol był on niższy niż w błonie złożonej z samego POPC (Rycina 23, Rycina 24). Potencjalnym wytłumaczeniem tego zjawiska jest to, że FP może preferencyjnie przyjmować konformację powierzchniową w obecności cholesterolu, podczas gdy w błonie POPC prawdopodobnie w większości jest peptydem transbłonowym [Setny i wsp., 2025]. Oprócz

tego cholesterol powoduje wzrost sztywności (ang. *rigidity*) błony, co może utrudniać wyciekanie zawartości z liposomów [Chakraborty i wsp., 2020].

Mutacje W14A oraz E11A znacząco wpływają na strukturę drugorzędową FP, ograniczając jego zdolność do przyjmowania głębokiej, transbłonowej konformacji w błonie lipidowej [Li i wsp., 2010; Légaré & Lagüe, 2012]. Pokazano, że mutanty W14A oraz E11A charakteryzują się mniejszą aktywnością fuzyjną w porównaniu do FP [Lai i wsp., 2006; Worch i wsp., 2021]. Podczas gdy W14A prawdopodobnie jest peptydem powierzchniowym, E11A częściowo wbudowuje się w dwuwarstwę lipidową [Légaré & Lagüe, 2014; Worch i wsp., 2021]. W przedstawionych badaniach po raz pierwszy porównano aktywność błonową FP i jego mutantów w różnych warunkach środowiska. Zgodnie z warunkami panującymi w późnych endosomach oraz z danymi literaturowymi FP wykazywał wyższą aktywność w pH 5 [Murata i wsp., 1987; Esbjörner i wsp., 2007; Lousa i wsp., 2020]. Otrzymane wyniki sugerują, że E11A najsilniej destabilizował błonę, co prowadziło do największego procentu wyciekania zawartości z liposomów. Należy jednak pamiętać, że proces wyciekania zawartości, który jest indukowany przez peptyd nie jest równoznaczny z aktywnością fuzyjną, choć często jej towarzyszy [Erand, 2003; Haque i wsp., 2011].

Aktywność fuzyjna FP została oceniona za pomocą testu mieszania lipidów. FP jest w stanie indukować hemifuzję w błonach o różnym składzie lipidowym. W literaturze pokazano, że mieszanie lipidów indukowane przez FP było widoczne w dwuwarstwie lipidowej o różnym składzie [Lau i wsp., 2004; Chakraborty i wsp., 2013; Lousa i wsp., 2016]. Wysoka aktywność fuzyjna FP w błonie o różnym składzie lipidowym może wynikać z jego dynamicznej natury. Przejście pomiędzy transbłonową a powierzchniową konformacją prawdopodobnie umożliwia dostosowanie do błon lipidowych o różnym składzie.

Warto dodać, że wydajność fuzji wirusa grypy zależy od obecności cholesterolu w błonie docelowej [Biswas i wsp., 2008; Domańska i wsp. 2013]. Zarówno wcześniejsze badania [Wharton i wsp., 1988; Worch i wsp., 2017], jak i eksperymenty przedstawione w pracy pokazują, że aktywność fuzyjna FP była wyższa w błonach zawierających cholesterol niż w błonach go pozbawionych. Proces fuzji indukowany przez FP wydaje się bardziej wydajny w błonie z cholesterolem. Jednym z możliwych wyjaśnień jest fakt, że cholesterol wpływa na strukturę dwuwarstwy lipidowej indukując tworzenie krzywizny ujemnej błony. Prawdopodobnie ułatwia on zarówno hemifuzję dwóch błon jak i rozszerzanie poru fuzyjnego podczas końcowego etapu fuzji [Biswas i wsp., 2008; Yang i wsp., 2016].

Natomiast wszystkie badane peptydy TMD (H1, H1long, H3, H3long) nie powodowały wyciekania zawartości z liposomów oraz mieszania lipidów (Rycina 21, Rycina 22, Rycina 27, Rycina 28). Potwierdzono tym samym, że same peptydy TMD nie posiadają aktywności fuzyjnej i nie indukują hemifuzji błon lipidowych. Nie zaobserwowano destabilizacji błony

prowadzącej do wyciekania zawartości z liposomów, co sugeruje, że peptydy są pasywne w błonie.

Podobny brak aktywności błonowej został również opisany wcześniej dla peptydu odpowiadającego TMD (podtypu H3) [Chang i wsp., 2008]. Nie badano jednak wcześniej aktywności błonowej dla peptydu odpowiadającego TMD z podtypu H1, ani nie wykonywano testów aktywności fuzyjnej z wykorzystaniem peptydów TMD. Na podstawie wyników eksperymentów nie zaobserwowano różnicy w oddziaływaniu z błoną z cholesterolem pomiędzy krótkimi oraz długimi wersjami peptydów TMD.

Fuzja błon jest wieloetapowym procesem (szczegółowo omówiony w rozdziale 1.4), którego istotnym etapem jest hemifuzja typu "stalk". Etap ten prawdopodobnie wymaga protruzji ogonów węglowodorowych fosfolipidów [Kasson i wsp., 2010; Smirnova i wsp., 2010]. Zjawisko to zostało zaobserwowane w symulacjach molekularnych i może być indukowane przez FP [Kasson i wsp., 2010; Larsson & Kasson, 2013]. Protruzji towarzyszy lokalny spadek uporządkowania łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów, dlatego parametr uporządkowania lipidów (ang. *membrane lipid order*) jest użytecznym wskaźnikiem do badania wpływu peptydów fuzyjnych na strukturę błony lipidowej.

Choć niewielkie zmiany w uporządkowaniu błony lipidowej indukowane przez peptydy są trudne do uchwycenia, możliwe jest ich zaobserwowanie w badaniach eksperymentalnych. Pośredni pomiar uporządkowania błony lipidowej może być przeprowadzony z wykorzystaniem fluoroforów, których czas życia fluorescencji jest wrażliwy na lokalną strukturę błony. Umożliwia to wykrycie nawet niewielkich zmian w strukturze błony. Jednym z takich barwników jest C6-NBD-PE złożony z fosfolipidu PE, do którego przyłączony jest barwnik NBD do szóstego atomu węgla jednego z łańcuchów węglowodorowych (Wzór C6-NBD-PE oraz głębokość wnikania barwnika w błonę lipidową przedstawia Rycina 29). Za pomocą tego barwnika można mierzyć lokalne uporządkowanie lipidów w bliskiej odległości od powierzchni błony w części hydrofobowej POPC [Huster i wsp., 2001; Marquezin i wsp., 2019]. Niższy czas życia fluorescencji podanego barwnika odzwierciedla spadek uporządkowania lipidów, natomiast jego wzrost odpowiada większemu uporządkowaniu lipidów [Stöckl i wsp., 2008].

Wyniki przedstawione w pracy pokazały, że wszystkie badane peptydy zarówno FP, jak i TMD wpływały na uporządkowanie lipidów w błonie POPC (Rycina 31). FP oraz H3 i H3long powodowały spadek uporządkowania, przy czym efekt był największy dla FP. Natomiast dodatek H1 i H1long skutkował zwiększeniem uporządkowania, przy czym efekt był najsilniejszy dla H1long. W błonie zawierającej cholesterol żaden z badanych peptydów FP, H1long i H3long nie powodował zmian w uporządkowaniu lipidów (Rycina 33). Zaobserwowano natomiast w pojedynczych liposomach z FP obecność faz lipidowych o niższym uporządkowaniu lipidów (Rycina 34).

W interpretacji uzyskanych wyników dotyczących uporządkowania lipidów należy uwzględnić metodę pomiaru. W zależności od metody możliwe jest badanie zmian uporządkowania na różnych głębokościach dwuwarstwy lipidowej [Gupta i wsp., 2023]. W przypadku wykorzystania fluoroforów do badania tego parametru możliwe jest analizowanie zmian lokalnych. Lokalne miejsce zależy m.in. od głębokości znacznika w błonie lipidowej. Oprócz metody pomiarowej kluczowym czynnikiem jest skład lipidowy. Peptydy mogą zachowywać się inaczej i przyjmować różne konformacje w zależności od środowiska lipidowego. Pokazano, że w zależności od zastosowanych metod pomiarowych oraz składu lipidowego FP może zwiększać lub zmniejszać uporządkowanie błony [Ge & Freed, 2009; Chakraborty i wsp., 2013; Chakraborty i wsp., 2017; Ghosh & Weliky, 2020]. Natomiast symulacje molekularne sugerują, że FP powoduje lokalny spadek uporządkowania, wywołany protruzją ogonów węglowodorowych fosfolipidów [Victor i wsp., 2015].

Wcześniejsze badania eksperymentalne z użyciem barwnika C6-NBD-PC w błonie POPC wykazały, że FP indukował zmniejszenie uporządkowania lipidów [Worch i wsp., 2017]. Pokazano również, że FP indukuje powstawanie faz lipidowych w błonie o składzie POPC/chol [Worch i wsp., 2017]. Podobnie w niniejszej pracy doktorskiej zaobserwowano zmniejszenie uporządkowania lipidów w obecności FP oraz powstawanie faz lipidowych. Brak zmian w uporządkowaniu błony zawierającej cholesterol może wynikać z jej niższej płynności. To mogło uniemożliwić FP indukowanie zaburzeń w strukturze błony, które byłyby wykrywalne za pomocą zastosowanej metody. W pojedynczych przypadkach mogło dochodzić do gromadzenia się FP w błonie i tworzenia faz lipidowych.

Znacznie mniej wiadomo na temat wpływu TMD na uporządkowanie lipidów niż w przypadku FP. Dotychczasowe badania skupiały się wyłącznie na TMD z podtypu H3. Pokazano, że peptydy odpowiadające TMD indukują zwiększenie uporządkowania lipidów [Tatulian & Tamm, 2000; Ge & Freed, 2011; Lai & Freed, 2015]. Tymczasem w przeciwieństwie do danych literaturowych, uzyskane wyniki wykazały spadek uporządkowania lipidów w błonie o składzie POPC po dodaniu peptydów H3 i H3long. Rozbieżności między wynikami mogą wynikać z zastosowania innych metod pomiarowych oraz różnych składów lipidowych. Podczas gdy w niniejszej pracy używano fosfolipidu POPC, we wcześniejszych badaniach wykorzystano błony lipidowe o składzie: DMPC/DMPG (50/50) lub DMPC/DMPG/chol (40/40/30) [Tatulian & Tamm, 2000; Ge & Freed, 2011; Lai & Freed, 2015]. Z kolei H1 oraz H1long powodowały odwrotny efekt. Różnice między TMD z podtypów H1 i H3 zostaną szerzej omówione w rozdziale 5.2. Dotychczas brakowało badań dotyczących wpływu TMD podtypu H1 na uporządkowanie lipidów. Przedstawione w pracy wyniki po raz pierwszy dostarczają informacji na temat wpływu TMD na ten parametr błony, biorąc pod uwagę zarówno TMD z podtypów H1 i H3, a także umożliwiając ich bezpośrednie porównanie

z FP. Uzupełnieniem tych badań mogłyby być w przyszłości symulacje molekularne, które pozwoliłyby na głębsze zrozumienie wpływu TMD na lokalne uporządkowanie błony.

W końcowym etapie fuzji indukowanej przez HA dochodzi do połączenia dwóch błon w procesie hemifuzji i zbliżenia dwóch fragmentów białka FP i TMD [Barrett & Dutch, 2020]. FP i TMD mogą oddziaływać ze sobą, co potencjalnie umożliwia przejście z hemifuzji do pełnej fuzji błon [Chang i wsp., 2008]. Jak pokazano we wcześniejszych paragrafach, sam TMD nie wykazuje aktywności fuzyjnej. W związku z tym zgodnie z hipotezą synergiczne oddziaływanie pomiędzy FP i TMD powinno prowadzić do zwiększenia aktywności fuzyjnej FP. Po zbadaniu działania indywidualnych peptydów FP i TMD, zarówno pod kątem aktywności fuzyjnej, błonowej, jak i wpływu na uporządkowanie lipidów, możliwa była ocena efektów ich jednoczesnej obecności w jednej błonie. W tym celu przeprowadzono eksperymenty z mieszaninami FP:TMD, które porównywano do indywidualnych peptydów.

Mieszanki peptydów FP:TMD wykazywały podobną lub niższą aktywność błonową i fuzyjną niż sam peptyd FP. Spadek aktywności FP obserwowano w mieszaninie FP+H1long, zarówno w błonie o składzie POPC, jak i zawierającej cholesterol (Rycina 21, Rycina 22, Rycina 27, Rycina 28). W eksperymentach FLIM, w których badano wpływ peptydów na uporządkowanie lipidów, czas życia fluorescencji barwnika po dodaniu mieszanek FP:TMD odpowiadał średniej wartości uzyskanej dla poszczególnych peptydów oddzielnie.

Wszystkie przeprowadzone eksperymenty pokazały brak synergicznego oddziaływania pomiędzy FP i TMD hemaglutyniny. Mieszanki FP:TMD nie zwiększały aktywności błonowej i fuzyjnej FP. Zaobserwowano natomiast spadek aktywności FP w mieszaninie FP+H1long, co może sugerować, że H1long utrudnia proces hemifuzji indukowany przez FP. Potwierdziły to również eksperymenty FLIM, które pokazały, że H1long indukuje uporządkowanie lipidów w błonie w przeciwieństwie do FP, co może tłumaczyć obniżoną aktywność FP w mieszaninie FP+H1long. Natomiast H3 i H3long nie wpływały na aktywność FP. Odmienne wyniki dla TMD z podtypów H1 i H3 sugerują, że TMD z różnych podtypów oddziałują w odmienny sposób z błoną. Wszystkie przeprowadzone eksperymenty zarówno test wyciekania barwnika z liposomów jak i mieszania lipidów oraz uporządkowania lipidów pokazują, że TMD prawdopodobnie wpływa na proces fuzji w inny sposób, niż poprzez oddziaływanie z FP.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy są zgodne z badaniami Ranaweera i wsp., w których wykazano brak oddziaływania pomiędzy FP i TMD [2019]. Natomiast zaobserwowano rozbieżności z wynikami opublikowanymi przez Changa i wsp. [2008] oraz Laia i Freeda [2015], w których pokazano obecność oddziaływań FP:TMD. Lai i Freed [2019] skupili się na badaniu wpływu FP i TMD (podtyp H3) na uporządkowanie lipidów w błonie o składzie DMPC/DMPG/Chol. Pokazali, że mieszanki peptydów FP i TMD wywoływały większe uporządkowanie w błonie niż każdy z peptydów stosowanych osobno. Zarówno skład lipidowy, jak i sposób pomiaru uporządkowania lipidów różniły się od zastosowanych w przedstawionej

pracy, z czego mogą wynikać rozbieżności w wynikach. Z kolei Chang i wsp. [2008] wykazali obecność kompleksów FP:TMD (podtyp H3) oraz nieznacznie większą aktywność błonową mieszanek FP i TMD w teście wyciekania zawartości z liposomów, w porównaniu do samego FP.

Warto podkreślić, że jedynie badania przedstawione w niniejszej pracy zawierały zarówno analizę aktywności błonowej, fuzyjnej, jak i uporządkowania lipidów, co pozwoliło na szczegółowe porównanie działania FP i TMD w błonie. Po raz pierwszy zaobserwowano przeciwstawne działanie FP i TMD (z podtypu H1) w jednej błonie lipidowej.

5.2. Różnice pomiędzy TMD pochodzącymi z podtypu H1 a H3 hemaglutyniny

Obecnie do najczęściej występujących wśród ludzi wirusów grypy należą H1N1 oraz H3N2, które zawierają podtypy H1 i H3 hemaglutyniny [Zheng i wsp., 2023]. Co więcej, wirusy grypy należące do tych podtypów zakażają także ptaki, świnie, psy i konie. Zakażenia wśród zwierząt stanowią potencjalne zagrożenie epidemiczne dla człowieka, w związku z możliwością dochodzenia do transmisji międzygatunkowej [Trovão i wsp., 2024].

Podtypy H1 i H3 reprezentują dwie różne grupy filogenetyczne, podczas gdy H1 należy do grupy 1, H3 do grupy 2. Sekwencje aminokwasowe ich domen transbłonowych znacznie różnią się między tymi podtypami [Russell i wsp., 2008]. Pokazano również różnice w ich właściwościach fizykochemicznych, m.in. TMD z podtypu H1 charakteryzuje się mniejszą hydrofobowością niż TMD z H3 [Kubiszewski & Worch, 2020]. Biorąc pod uwagę te różnice, można przypuszczać, że TMD z tych dwóch podtypów oddziałują z lipidami w inny sposób, co może wpływać na proces fuzji. Mimo tych różnic, w niewielu badaniach przeprowadzono analizę porównawczą TMD z podtypów H1 i H3, skupiając się na jednym z nich.

Niniejsza praca zawiera porównanie wpływu TMD z podtypów H1 i H3 na właściwości błony lipidowej. Peptydy H1, H1long indukowały wzrost uporządkowania lipidów w błonie POPC, natomiast dodatek H3 i H3long miał odwrotny skutek na błonę lipidową, powodując spadek uporządkowania lipidów (Rycina 31). Nie pokazano natomiast różnic w działaniu H1long a H3long w błonie z cholesterolem, oba peptydy nie powodowały zmian w uporządkowaniu lipidów, co zostało scharakteryzowane poniżej (Rycina 33).

Zaobserwowane przeciwstawne efekty TMD z podtypów H1 i H3 mogą wynikać z odmiennej konfiguracji helis w homotrimerze. Pokazano, że peptydy odpowiadające TMD HA tworzą homotrimery w błonie [Victor i wsp., 2012; Mineev i wsp., 2013], a ich konformacja prawdopodobnie różni się w zależności od podtypów z dwóch różnych grup filogenetycznych [Kordyukova i wsp., 2011]. Prawdopodobnie konfiguracja helis TMD jest wrażliwa na środowisko lipidowe, w tym na obecność cholesterolu [Michalski & Setny, 2023a]. Brak różnic

dla H1long i H3long w błonie o składzie POPC/chol może wynikać z podobnej konfiguracji peptydów, które nie indukują zmian w uporządkowaniu lipidów. Może to także wynikać z ograniczeń stosowanej metody, w błonie z cholesterolem wyniki czasów życia fluorescencji charakteryzowały się dużym rozrzutem. W związku z tym trudno zaobserwować niewielkie zmiany (Rycina 33).

Aktywność fuzyjna pełnej długości białka HA zależy między innymi od obecności TMD, które zakotwicza białko w otocze lipidowej oraz bierze udział w procesie fuzji [Barret & Dutch, 2020]. W celu zbadania roli TMD w aktywności fuzyjnej, wykorzystano cząstki wirusopodobne VLP zawierające HA. Zastosowano dwa warianty: H1-TMD-H1 (zawierające HA podtypu H1) i H1-TMD-H3 (zawierające HA podtypu H1 z zamienionym fragmentem TMD na sekwencję z podtypu H3). Obie wersje indukowały fuzję z błoną SLB zawierającą cholesterol. W testach nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy H1-TMD-H1 i H1-TMD-H3. Jednak w przypadku H1-TMD-H3 widoczna była niższa średnia wartość czasu życia fluorescencji barwnika, co może sugerować tendencję do wyższej aktywności fuzyjnej.

Dalsze badania przeprowadzone przez zespół badawczy pokazały, że aktywność fuzyjna VLP zależy od składu lipidowego błony cząstek. W testach mieszania lipidów porównywano aktywność fuzyjną cząstek VLP w zależności od ich składu lipidowego. Przygotowano cząstki VLP w trzech składach lipidowych: lipidy roślinne, POPC/chol (6/4 mol%) oraz POPC/sfingomielina/chol (2/2/1 mol%). Cząstki H1-TMD-H3 charakteryzowały się większą aktywnością fuzyjną niż H1-TMD-H1 w błonie zawierającej lipidy roślinne oraz POPC/chol. Jednak różnice w aktywności były mniejsze w błonie z cholesterolem. Rozbieżności w aktywności fuzyjnej znikają w błonie o składzie odpowiadającym tratwom lipidowym: POPC/sfingomielina/chol. Oba warianty cząstek VLP osiągnęły najwyższą aktywność w błonie o tym składzie lipidowym [Borkowska i wsp., 2024].

W niniejszej pracy potwierdzono, że efektywność fuzji HA zależy od sekwencji TMD. Widoczne różnice w aktywności fuzyjnej pomiędzy cząstkami H1-TMD-H1 i H1-TMD-H3 mogą wynikać z odmiennego sposobu oddziaływania TMD z lipidami. W pełnej długości HA obecność TMD z H3 zapewniała wysoką efektywność fuzji w różnych składach lipidowych, w tym w roślinnych błonach lipidowych, które nie zawierają cholesterolu, ale zawierają inne sterole [Cacas i wsp., 2016; Suza & Chappell, 2016]. Natomiast efektywność fuzji H1-TMD-H1 bardziej zależy od składu lipidowego. Wyniki sugerują, że TMD z H3 może lepiej dopasowywać się do składu lipidowego.

Co ciekawe, oba warianty cząstek, zarówno H1-TMD-H1 jak i H1-TMD-H3 osiągały największą aktywność fuzyjną w błonie bogatej w cholesterol i sfingomielinę. Może to wynikać z oddziaływania TMD z obu podtypów z cholesterolem. TMD z H3 posiada motyw wiążący cholesterol CCM (ang. *cholesterol consensus motif*) a jego zdolność do oddziaływania z analogiem cholesterolu została potwierdzona eksperymentalnie [de Vries.,

2015; Hu i wsp., 2019]. Natomiast w przypadku TMD z H1 obecny jest inny motyw aminokwasowy, który również może potencjalnie oddziaływać z cholesterolem, jednak brakuje bezpośrednich danych eksperymentalnych [Hu i wsp., 2019] (Motywy przedstawia Tabela 10). Co więcej, oba podtypy lokalizują się w domenach bogatych w cholesterol [Takeda i wsp., 2003; Tall i wsp., 2003; Leser & Lamb, 2005; Ohkura i wsp., 2014]. Same badania nad aktywnością fuzyjną nie pozwalają na pełne zrozumienie mechanizmów działania TMD w procesie fuzji.

Lepsze zrozumienie mechanizmu działania TMD w procesie fuzji jest możliwe dzięki analizom strukturalnym. Podczas gdy struktury ektodomen różnych podtypów HA były znane już wiele lat temu [Wilson i wsp., 1981; Sauter i wsp., 1992; Russell i wsp., 2008; Tzarum i wsp., 2017], dopiero Benton i wsp. [2018] opublikowali strukturę HA podtypu H1 zawierającą fragment TMD. Badania te pokazały, że TMD wraz z elastycznym łącznikiem może wpływać na nachylenie ektodomeny względem płaszczyzny błony. Ektodomena HA w stanie aktywnym przyjmowała konformację nachyloną pod kątem maksymalnym 52° . Natomiast w stanie dezaktywowanym HA, po związaniu z przeciwciałem, kąt ten zmniejszał się do wartości poniżej 20° . Wcześniejsze badania potwierdziły, że aktywna HA podtypu H1 przyjmuje nachyloną konformację względem dwuwarstwy lipidowej [Tatullian i wsp., 1995]. Wyniki Bentona i wsp. [2018] sugerują, że ustawienie helis w heterotrimerze może być odpowiedzialne za nachylenie ektodomeny. Symulacje molekularne dodatkowo potwierdziły, że TMD wraz z elastycznym łącznikiem ma wpływ na nachylenie całej ektodomeny białka HA podtypu H1 [Michalski & Setny, 2023a]. Co interesujące, dalsze symulacje molekularne w błonie o składzie odpowiadającej otoczce lipidowej wirusa grypy sugerują, że ektodomena HA z podtypu H1 jest nachylona względem dwuwarstwy lipidowej. Natomiast ektodomena z podtypu H3 prawdopodobnie przyjmuje konformację prostą [Borkowska i wsp., 2024]. Aby lepiej zrozumieć to zjawisko, potrzebne są dalsze badania, w tym analizy strukturalne HA podtypu H3 zawierającego TMD.

W przedstawionej pracy doktorskiej wykazano różnice pomiędzy TMD pochodzącymi z dwóch różnych grup filogenetycznych, odpowiadającymi podtypom H1 i H3. Różnice te były zarówno widoczne na poziomie peptydów, jak i w kontekście całego białka. Dalsze badania oraz symulacje molekularne wykazały, że TMD są wrażliwe na skład lipidowy dwuwarstwy, z którą oddziałują. Możliwe, że aktywność fuzyjna całego białka zależy również od oddziaływania TMD z lipidami [Borkowska i wsp., 2024]. Na podstawie uzyskanych danych oraz doniesień literaturowych można zaproponować alternatywną hipotezę do hipotezy tworzenia kompleksów FP:TMD, zakładającą, że TMD razem z łącznikiem wpływa na nachylenie ektodomeny i pośrednio na aktywność fuzyjną białka.

6. Podsumowanie i wnioski

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej nie potwierdzają postawionej hipotezy. Nie zaobserwowano synergicznego oddziaływania pomiędzy FP i TMD hemaglutyniny, które prowadziłyby do wzrostu aktywności fuzyjnej FP.

Na podstawie wyników przedstawionych w niniejszej pracy można sformułować następujące wnioski:

- Wszystkie badane peptydy TMD z dwóch podtypów H1 oraz H3 (H1, H1long, H3, H3long) wbudowują się w błonę lipidową.
- Peptydy TMD z podtypów H1 i H3 nie indukują wyciekania zawartości z liposomów i nie wykazują aktywności fuzyjnej.
- Mieszanki peptydów FP:TMD charakteryzują się taką samą lub niższą aktywnością błonową oraz fuzyjną w porównaniu do samego peptydu FP.

Zaobserwowano również różnice w działaniu TMD z podtypów H1 oraz H3 i wyciągnięto następujące wnioski:

- Peptyd H1long indukuje wzrost uporządkowania lipidów w błonie o składzie POPC, natomiast H3long powoduje spadek uporządkowania lipidów.
- TMD może wpływać na aktywność fuzyjną całego białka HA, a wydajność fuzji może zależeć od podtypu, do którego należy TMD.

Na podstawie uzyskanych wyników oraz dostępnych danych literaturowych można zaproponować, że TMD wpływa na aktywność fuzyjną HA poprzez oddziaływanie z lipidami i prawdopodobnie wpływając na nachylenie ektodomeny HA.

7. Literatura

1. Air G. M. (1981). Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7639–7643. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7639>
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). Garland Science. <https://doi.org/10.1201/9781315735368>
3. Andersson, J., & Köper, I. (2016). Tethered and Polymer Supported Bilayer Lipid Membranes: Structure and Function. *Membranes*, 6(2), 30. <https://doi.org/10.3390/membranes6020030>
4. Angelova M.I., Dimitrov D.S. (1986) Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81 303–311, <https://doi.org/10.1039/DC9868100303>.
5. Aran Terol, P., Kumita, J. R., Hook, S. C., Dobson, C. M., & Esbjörner, E. K. (2015). Solvent exposure of Tyr10 as a probe of structural differences between monomeric and aggregated forms of the amyloid- β peptide. *Biochemical and biophysical research communications*, 468(4), 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.018>
6. Armstrong, R. T., Kushnir, A. S., & White, J. M. (2000). The transmembrane domain of influenza hemagglutinin exhibits a stringent length requirement to support the hemifusion to fusion transition. *Journal of Cell Biology*, 151(2), 425–437. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.425>
7. Austin, J., Minelli, C., Hamilton, D., Wywijas, M., & Jankevics Jones, H. (2020). Nanoparticle number concentration measurements by multi-angle dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(5), 108. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04840-8>
8. Barrett, C. T., & Dutch, R. E. (2020). Viral Membrane Fusion and the Transmembrane Domain. *Viruses*, 12(7), 693. <https://doi.org/10.3390/v12070693>
9. Belongia, E. A., Simpson, M. D., King, J. P., Sundaram, M. E., Kelley, N. S., Osterholm, M. T., & McLean, H. Q. (2016). Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(8), 942–951. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00129-8)
10. Benda, A., Beneš, M., Mareček, V., Lhotský, A., Hermens, W. T., & Hof, M. (2003). How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Langmuir*, 19(10), 4120–4126. <https://doi.org/10.1021/la0270136>
11. Benton, D. J., Nans, A., Calder, L. J., Turner, J., Neu, U., Lin, Y. P., Ketelaars, E., Kallewaard, N. L., Corti, D., Lanzavecchia, A., Gamblin, S. J., Rosenthal, P. B., & Skehel, J. J. (2018). Influenza hemagglutinin membrane anchor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(40), 10112–10117. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810927115>
12. Benton, D. J., Gamblin, S. J., Rosenthal, P. B., & Skehel, J. J. (2020). Structural transitions in influenza haemagglutinin at membrane fusion pH. *Nature*, 583(7814), 150–153. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2333-6>

13. Berezin, M. Y., & Achilefu, S. (2010). Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chemical reviews*, 110(5), 2641–2684. <https://doi.org/10.1021/cr900343z>
14. Biswas, S., Yin, S. R., Blank, P. S., & Zimmerberg, J. (2008). Cholesterol promotes hemifusion and pore widening in membrane fusion induced by influenza hemagglutinin. *Journal of General Physiology*, 131(5), 503–513. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709932>
15. Boonstra, S., Blijleven, J. S., Roos, W. H., Onck, P. R., van der Giessen, E., & van Oijen, A. M. (2018). Hemagglutinin-Mediated Membrane Fusion: A Biophysical Perspective. *Annual review of biophysics*, 47, 153–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033018>
16. Borkowska, P., Kubiszewski-Jakubiak, S., Bykowski, M., Kowalewska, L., Michalski, M., Setny, P., & Worch, R. (2024). Transmembrane domains of H1 and H3 hemagglutinin contribute to membrane fusion in a different manner. *BioRxiv*, 2024.10.31.621245. <https://doi.org/10.1101/2024.10.31.621245>
17. Bouvier, N. M., & Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26 Suppl 4(Suppl 4), D49–D53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
18. Böttcher-Friebertshäuser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M., Uhlendorff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H.-D., & Garten, W. (2010). Cleavage of Influenza Virus Hemagglutinin by Airway Proteases TMPRSS2 and HAT Differs in Subcellular Localization and Susceptibility to Protease Inhibitors. *Journal of Virology*, 84(11), 5605–5614. <https://doi.org/10.1128/jvi.00140-10>
19. Brett, K., Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Mintaev, R. R., Alexeevski, A. V., & Veit, M. (2014). Site-specific S-acylation of influenza virus hemagglutinin: The location of the acylation site relative to the membrane border is the decisive factor for attachment of stearate. *Journal of Biological Chemistry*, 289(50), 34978–34989. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.586180>
20. Brice, A. R., & Lazaridis, T. (2014). Structure and dynamics of a fusion peptide helical hairpin on the membrane surface: Comparison of molecular simulations and NMR. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(17), 4461–4470. <https://doi.org/10.1021/jp409412q>
21. Brown, D. A., & Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3), 533–544. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90189-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90189-j)
22. Bryant, G., & Thomas, J. C. (1995). Improved Particle Size Distribution Measurements Using Multiangle Dynamic Light Scattering. *Langmuir*, 11(18), 2480–2485.
23. Burns, A. R., Frankel, D. J., & Buranda, T. (2005). Local mobility in lipid domains of supported bilayers characterized by atomic force microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical journal*, 89(2), 1081–1093. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.060327>
24. Cacas, J. L., Buré, C., Grosjean, K., Gerbeau-Pissot, P., Lherminier, J., Rombouts, Y., Maes, E., Bossard, C., Gronnier, J., Furt, F., Fouillen, L., Germain, V., Bayer, E., Cluzet, S., Robert, F., Schmitter, J. M., Deleu, M., Lins, L., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2016). Revisiting Plant Plasma Membrane Lipids in Tobacco: A Focus on Sphingolipids. *Plant physiology*, 170(1), 367–384. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00564>

25. Carlon-Andres, I., & Padilla-Parra, S. (2020). Quantitative FRET-FLIM-BlaM to Assess the Extent of HIV-1 Fusion in Live Cells. *Viruses*, 12(2), 206. <https://doi.org/10.3390/v12020206>
26. Chakraborty, H., Lentz, B. R., Kombrabail, M., Krishnamoorthy, G., & Chattopadhyay, A. (2017). Depth-Dependent Membrane Ordering by Hemagglutinin Fusion Peptide Promotes Fusion. *Journal of Physical Chemistry B*, 121(7), 1640–1648. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b00684>
27. Chakraborty, H., Tarafdar, P. K., Klapper, D. G., & Lentz, B. R. (2013). Wild-type and mutant hemagglutinin fusion peptides alter bilayer structure as well as kinetics and activation thermodynamics of stalk and pore formation differently: mechanistic implications. *Biophysical journal*, 105(11), 2495–2506. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.10.010>
28. Chakraborty, S., Doktorova, M., Molugu, T. R., Heberle, F. A., Scott, H. L., Dzikovski, B., Nagao, M., Stingaciu, L. R., Standaert, R. F., Barrera, F. N., Katsaras, J., Khelashvili, G., Brown, M. F., & Ashkar, R. (2020). How cholesterol stiffens unsaturated lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(36), 21896–21905. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004807117>
29. Chang, D. K., Cheng, S. F., Kantchev, E. A., Lin, C. H., & Liu, Y. T. (2008). Membrane interaction and structure of the transmembrane domain of influenza hemagglutinin and its fusion peptide complex. *BMC biology*, 6, 2. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-2>
30. Chen, J., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1999). N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 8967–8972. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8967>
31. Chen, Y., Lagerholm, B. C., Yang, B., & Jacobson, K. (2006). Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods (San Diego, Calif.)*, 39(2), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.008>
32. Chernomordik, L., Chanturiya, A., Green, J., & Zimmerberg, J. (1995). The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition. *Biophysical journal*, 69(3), 922–929. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)79966-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)79966-0)
33. Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nature structural & molecular biology*, 15(7), 675–683. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1455>
34. Chlanda, P., Mekhedov, E., Waters, H., Sodt, A., Schwartz, C., Nair, V., Blank, P. S., & Zimmerberg, J. (2017). Palmitoylation Contributes to Membrane Curvature in Influenza A Virus Assembly and Hemagglutinin-Mediated Membrane Fusion. *Journal of virology*, 91(21), e00947-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00947-17>
35. Cross, K. J., Langley, W. A., Russell, R. J., Skehel, J. J., & Steinhauer, D. A. (2009). Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein and peptide letters*, 16(7), 766–778. <https://doi.org/10.2174/092986609788681715>
36. Cross, K. J., Wharton, S. A., Skehel, J. J., Wiley, D. C., & Steinhauer, D. A. (2001). Studies on influenza haemagglutinin fusion peptide mutants generated by reverse genetics. *EMBO Journal*, 20(16), 4432–4442. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4432>

37. de Vries, M., Herrmann, A., & Veit, M. (2015). A cholesterol consensus motif is required for efficient intracellular transport and raft association of a group 2 HA from influenza virus. *The Biochemical journal*, 465(2), 305–314. <https://doi.org/10.1042/BJ20141114>
38. Demchenko, A. P., Duportail, G., Oncul, S., Klymchenko, A. S., & Mély, Y. (2015). Introduction to fluorescence probing of biological membranes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1232, 19–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5_3
39. Dennison, S. M., Stewart, S. M., Stempel, K. C., Liao, H. X., Haynes, B. F., & Alam, S. M. (2009). Stable docking of neutralizing human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 is dependent on the membrane immersion depth of their epitope regions. *Journal of virology*, 83(19), 10211–10223. <https://doi.org/10.1128/JVI.00571-09>
40. Domanska, M. K., Wrona, D., & Kasson, P. M. (2013). Multiphasic effects of cholesterol on influenza fusion kinetics reflect multiple mechanistic roles. *Biophysical Journal*, 105(6), 1383–1387. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.08.003>
41. Du, T., Jiang, L., & Liu, M. (2014). NMR structures of fusion peptide from influenza hemagglutinin H3 subtype and its mutants. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 20(4), 292–297. <https://doi.org/10.1002/psc.2616>
42. Dutta, S., Watson, B. G., Mattoo, S., & Rochet, J. C. (2020). Calcein Release Assay to Measure Membrane Permeabilization by Recombinant Alpha-Synuclein. *Bio-protocol*, 10(14), e3690. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3690>
43. Edwards, K. A., & Baeumner, A. J. (2006). Analysis of liposomes. *Talanta*, 68(5), 1432–1441. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.031>
44. Eller, M. W., Siaw, H. M. H., & Dyer, R. B. (2021). Stability of HA2 Prefusion Structure and pH-Induced Conformational Changes in the HA2 Domain of H3N2 Hemagglutinin. *Biochemistry*, 60(35), 2623–2636. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00551>
45. Engel, S., Scolari, S., Thaa, B., Krebs, N., Korte, T., Herrmann, A., Veit, M., & Scolari, S. (2010). FLIM-FRET and FRAP reveal association of influenza virus haemagglutinin with membrane rafts. *Biochemical Journal*, 425(3), 567–573. <https://doi.org/10.1042/BJ20091388>
46. Epand R. M. (2003). Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochimica et biophysica acta*, 1614(1), 116–121. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00169-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00169-x)
47. Esbjörner, E. K., Oglecka, K., Lincoln, P., Gräslund, A., & Nordén, B. (2007). Membrane binding of pH-sensitive influenza fusion peptides. positioning, configuration, and induced leakage in a lipid vesicle model. *Biochemistry*, 46(47), 13490–13504. <https://doi.org/10.1021/bi701075y>
48. Falke, S., & Betzel, C. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS). In *Bioanalysis* (pp. 173–193). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6
49. Follenius, A., & Gerard, D. (1983). Acrylamide fluorescence quenching applied to tyrosyl residues in proteins. *Photochemistry and photobiology*, 38(3), 373–376. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb02686.x>
50. François-Martin, C., & Pincet, F. (2017). Actual fusion efficiency in the lipid mixing assay - Comparison between nanodiscs and liposomes. *Scientific reports*, 7, 43860. <https://doi.org/10.1038/srep43860>

51. François-Martin, C., Rothman, J. E., & Pincet, F. (2017). Low energy cost for optimal speed and control of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(6), 1238–1241. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621309114>
52. Galloway, S. E., Reed, M. L., Russell, C. J., & Steinhauer, D. A. (2013). Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation. *PLoS pathogens*, 9(2), e1003151. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003151>
53. Gambaryan, A. S., Tuzikov, A. B., Piskarev, V. E., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., Robertson, J. S., Bovin, N. V., & Matrosovich, M. N. (1997). Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyl)lactosamine). *Virology*, 232(2), 345–350. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8572>
54. Ge, M., & Freed, J. H. (2009). Fusion peptide from influenza hemagglutinin increases membrane surface order: An electron-spin resonance study. *Biophysical Journal*, 96(12), 4925–4934. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.015>
55. Ge, M., & Freed, J. H. (2011). Two conserved residues are important for inducing highly ordered membrane domains by the transmembrane domain of influenza hemagglutinin. *Biophysical journal*, 100(1), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.014>
56. Gerl, M. J., Sampaio, J. L., Urban, S., Kalvodova, L., Verbavatz, J. M., Binnington, B., Lindemann, D., Lingwood, C. A., Shevchenko, A., Schroeder, C., & Simons, K. (2012). Quantitative analysis of the lipidomes of the influenza virus envelope and MDCK cell apical membrane. *Journal of Cell Biology*, 196(2), 213–221. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108175>
57. Ghosh, U., & Weliky, D. P. (2020). ²H nuclear magnetic resonance spectroscopy supports larger amplitude fast motion and interference with lipid chain ordering for membrane that contains β sheet human immunodeficiency virus gp41 fusion peptide or helical hairpin influenza virus hemagglutinin fusion peptide at fusogenic pH. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862(10), 183404. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183404>
58. Ghosh, U., Xie, L., Jia, L., Liang, S., & Weliky, D. P. (2015). Closed and Semiclosed Interhelical Structures in Membrane vs Closed and Open Structures in Detergent for the Influenza Virus Hemagglutinin Fusion Peptide and Correlation of Hydrophobic Surface Area with Fusion Catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 137(24), 7548–7551. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b04578>
59. Ghosh, U., Xie, L., & Weliky, D. P. (2013). Detection of closed influenza virus hemagglutinin fusion peptide structures in membranes by backbone ¹³CO-¹⁵N rotational-echo double-resonance solid-state NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, 55(2), 139–146. <https://doi.org/10.1007/s10858-013-9709-y>
60. Glaser, L., Stevens, J., Zamarin, D., Wilson, I. A., García-Sastre, A., Tumpey, T. M., Basler, C. F., Taubenberger, J. K., & Palese, P. (2005). A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity. *Journal of Virology*, 79(17), 11533–11536. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.17.11533-11536.2005>

61. Goodchild, J. A., Walsh, D. L., & Connell, S. D. (2019). Nanoscale Substrate Roughness Hinders Domain Formation in Supported Lipid Bilayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 35(47), 15352–15363. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01990>
62. Günther-Ausborn, S., Schoen, P., Bartoldus, I., Wilschut, J., & Stegmann, T. (2000). Role of hemagglutinin surface density in the initial stages of influenza virus fusion: lack of evidence for cooperativity. *Journal of virology*, 74(6), 2714–2720. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.6.2714-2720.2000>
63. Gupta, A., Kallianpur, M., Roy, D. S., Engberg, O., Chakrabarty, H., Huster, D., & Maiti, S. (2023). Different membrane order measurement techniques are not mutually consistent. *Biophysical journal*, 122(6), 964–972. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.08.029>
64. Han, X., Bushweller, J. H., Cafiso, D. S., & Tamm, L. K. (2001). Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nature structural biology*, 8(8), 715–720. <https://doi.org/10.1038/90434>
65. Han, X., & Tamm, L. K. (2000). A host-guest system to study structure-function relationships of membrane fusion peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), 13097–13102. <https://doi.org/10.1073/pnas.230212097>
66. Hanada, K., Nishijima, M., Akamatsu, Y., & Pagano, R. E. (1995). Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. *The Journal of biological chemistry*, 270(11), 6254–6260. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.6254>
67. Hanson, M. A., Cherezov, V., Griffith, M. T., Roth, C. B., Jaakola, V. P., Chien, E. Y., Velasquez, J., Kuhn, P., & Stevens, R. C. (2008). A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure (London, England : 1993)*, 16(6), 897–905. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.05.001>
68. Hao, W., Wang, L., & Li, S. (2020). Roles of the Non-Structural Proteins of Influenza A Virus. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(10), 812. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100812>
69. Haque, M. E., Chakraborty, H., Koklic, T., Komatsu, H., Axelsen, P. H., & Lentz, B. R. (2011). Hemagglutinin fusion peptide mutants in model membranes: structural properties, membrane physical properties, and PEG-mediated fusion. *Biophysical journal*, 101(5), 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.07.031>
70. Harrison S. C. (2008). Viral membrane fusion. *Nature structural & molecular biology*, 15(7), 690–698. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1456>
71. Harrison, S. C. (2015). Viral membrane fusion. *Virology*, 479–480, 498–507. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2015.03.043>
72. Herfst, S., Schrauwen, E. J., Linster, M., Chutinimitkul, S., de Wit, E., Munster, V. J., Sorrell, E. M., Bestebroer, T. M., Burke, D. F., Smith, D. J., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D., & Fouchier, R. A. (2012). Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6088), 1534–1541. <https://doi.org/10.1126/science.1213362>
73. Hess, S. T., Kumar, M., Verma, A., Farrington, J., Kenworthy, A., & Zimmerberg, J. (2005). Quantitative electron microscopy and fluorescence spectroscopy of the membrane distribution of influenza hemagglutinin. *Journal of Cell Biology*, 169(6), 965–976. <https://doi.org/10.1083/jcb.200412058>

74. Hess, S. T., Gould, T. J., Gudheti, M. V., Maas, S. A., Mills, K. D., & Zimmerberg, J. (2007). Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), 17370–17375. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708066104>
75. Horimoto, T., Nakayama, K., Smeekens, S. P., & Kawaoka, Y. (1994). Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *Journal of virology*, 68(9), 6074–6078. <https://doi.org/10.1128/JVI.68.9.6074-6078.1994>
76. Hu, B., Höfer, C. T., Thiele, C., & Veit, M. (2019). Cholesterol Binding to the Transmembrane Region of a Group 2 Hemagglutinin (HA) of Influenza Virus Is Essential for Virus Replication, Affecting both Virus Assembly and HA Fusion Activity. *Journal of virology*, 93(15), e00555-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00555-19>
77. Huster, D., Müller, P., Arnold, K., & Herrmann, A. (2001). Dynamics of membrane penetration of the fluorescent 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) group attached to an acyl chain of phosphatidylcholine. *Biophysical journal*, 80(2), 822–831. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76061-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76061-4)
78. Imai, M., Mizuno, T., & Kawasaki, K. (2006). Membrane fusion by single influenza hemagglutinin trimers: Kinetic evidence from image analysis of hemagglutinin-reconstituted vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12729–12735. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600902200>
79. Ipsen, J. H., Karlström, G., Mouritsen, O. G., Wennerström, H., & Zuckermann, M. J. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochimica et biophysica acta*, 905(1), 162–172. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(87\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(87)90020-4)
80. Joardar, A., Pattnaik, G. P., & Chakraborty, H. (2022). Mechanism of Membrane Fusion: Interplay of Lipid and Peptide. *Journal of Membrane Biology*, 255(2–3), 211–224. <https://doi.org/10.1007/s00232-022-00233-1>
81. Kaiser, H. J., Lingwood, D., Levental, I., Sampaio, J. L., Kalvodova, L., Rajendran, L., & Simons, K. (2009). Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(39), 16645–16650. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908987106>
82. Kasson, P. M., Lindahl, E., & Pande, V. S. (2010). Atomic-Resolution simulations predict a transition state for vesicle fusion defined by contact of a few lipid tails. *PLoS Computational Biology*, 6(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000829>
83. Kemble, G. W., Danieli, T., & White, J. M. (1994). Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell*, 76(2), 383–391. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90344-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90344-1)
84. Khrapunov, S., Pastor, N., & Brenowitz, M. (2002). Solution structural studies of the *Saccharomyces cerevisiae* TATA binding protein (TBP). *Biochemistry*, 41(30), 9559–9571. <https://doi.org/10.1021/bi0255773>
85. Khrustalev, V. V., Kordyukova, L. V., Arutyunyan, A. M., Poboinev, V. V., Khrustaleva, T. A., Stojarov, A. N., Baratova, L. A., Sapon, A. S., & Lugin, V. G. (2022). The cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin is β -structural. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 40(10), 4642–4661. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1860827>
86. Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (1998). A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature*, 392(6672), 193–197. <https://doi.org/10.1038/32440>

87. Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Polyansky, A. A., Kropotkina, E. A., Alexeevski, A. V., Veit, M., Efremov, R. G., Filippova, I. Y., & Baratova, L. A. (2011). Linker and/or transmembrane regions of influenza A/Group-1, A/Group-2, and type B virus hemagglutinins are packed differently within trimers. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(7), 1843–1854. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.03.005>
88. Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Baratova, L. A., & Veit, M. (2008). S acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine. *Journal of virology*, 82(18), 9288–9292. <https://doi.org/10.1128/JVI.00704-08>
89. Kubiszewski-Jakubiak, S., & Worch, R. (2020). Influenza A H1 and H3 Transmembrane Domains Interact Differently with Each Other and with Surrounding Membrane Lipids. *Viruses*, 12(12), 1461. <https://doi.org/10.3390/v12121461>
90. Lai, A. L., & Freed, J. H. (2015). The Interaction between Influenza HA Fusion Peptide and Transmembrane Domain Affects Membrane Structure. *Biophysical journal*, 109(12), 2523–2536. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.10.044>
91. Lai, A. L., Park, H., White, J. M., & Tamm, L. K. (2006). Fusion peptide of influenza hemagglutinin requires a fixed angle boomerang structure for activity. *The Journal of biological chemistry*, 281(9), 5760–5770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512280200>
92. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Third edit., Springer. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
93. Langley, W. A., Thoennes, S., Bradley, K. C., Galloway, S. E., Talekar, G. R., Cummings, S. F., Varecková, E., Russell, R. J., & Steinhauer, D. A. (2009). Single residue deletions along the length of the influenza HA fusion peptide lead to inhibition of membrane fusion function. *Virology*, 394(2), 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.08.031>
94. Larsson, P., & Kasson, P. M. (2013). Lipid Tail Protrusion in Simulations Predicts Fusogenic Activity of Influenza Fusion Peptide Mutants and Conformational Models. *PLoS Computational Biology*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002950>
95. Lau, W. L., Ege, D. S., Lear, J. D., Hammer, D. A., & DeGrado, W. F. (2004). Oligomerization of fusogenic peptides promotes membrane fusion by enhancing membrane destabilization. *Biophysical journal*, 86(1 Pt 1), 272–284. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74103-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74103-X)
96. Lear, J. D., & DeGrado, W. F. (1987). Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH2 terminus of influenza HA-2. *Journal of Biological Chemistry*, 262(14), 6500–6505. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48270-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48270-1)
97. Lee K. K. (2010). Architecture of a nascent viral fusion pore. *The EMBO journal*, 29(7), 1299–1311. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.13>
98. Légaré, S., & Lag  ue, P. (2012). The influenza fusion peptide adopts a flexible flat V conformation in membranes. *Biophysical journal*, 102(10), 2270–2278. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.003>
99. Lentz, M. R., Webster, R. G., & Air, G. M. (1987). Site-directed mutation of the active site of influenza neuraminidase and implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry*, 26(17), 5351–5358. <https://doi.org/10.1021/bi00391a020>
100. Leser, G. P., & Lamb, R. A. (2005). Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology*, 342(2), 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.049>

101. Li, J., Das, P., & Zhou, R. (2010). Single mutation effects on conformational change and membrane deformation of influenza hemagglutinin fusion peptides. *The journal of physical chemistry. B*, 114(26), 8799–8806. <https://doi.org/10.1021/jp1029163>
102. Li, X., Gu, M., Zheng, Q., Gao, R., & Liu, X. (2021). Packaging signal of influenza A virus. *Virology journal*, 18(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01504-4>
103. Li, Y., Han, X., Lai, A. L., Bushweller, J. H., Cafiso, D. S., & Tamm, L. K. (2005). Membrane structures of the hemifusion-inducing fusion peptide mutant G1S and the fusion-blocking mutant G1V of influenza virus hemagglutinin suggest a mechanism for pore opening in membrane fusion. *Journal of virology*, 79(18), 12065–12076. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.12065-12076.2005>
104. Liang Y. (2023). Pathogenicity and virulence of influenza. *Virulence*, 14(1), 2223057. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2223057>
105. Lin, S., Naim, H. Y., Rodriguez, A. C., & Roth, M. G. (1998). Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *The Journal of cell biology*, 142(1), 51–57. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.51>
106. Lorent, J. H., Diaz-Rohrer, B., Lin, X., Spring, K., Gorfe, A. A., Levental, K. R., & Levental, I. (2017). Structural determinants and functional consequences of protein affinity for membrane rafts. *Nature Communications*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01328-3>
107. Lorieau, J. L., Louis, J. M., & Bax, A. (2010). The complete influenza hemagglutinin fusion domain adopts a tight helical hairpin arrangement at the lipid: Water interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25), 11341–11346. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006142107>
108. Lorieau, J. L., Louis, J. M., & Bax, A. (2011). Whole-body rocking motion of a fusion peptide in lipid bilayers from size-dispersed ¹⁵N NMR relaxation. *Journal of the American Chemical Society*, 133(36), 14184–14187. <https://doi.org/10.1021/ja2045309>
109. Lorieau, J. L., Louis, J. M., & Bax, A. (2013). The impact of influenza hemagglutinin fusion peptide length and viral subtype on its structure and dynamics. *Biopolymers*, 99(3), 189–195. <https://doi.org/10.1002/bip.22102>
110. Loura, L. M., & Prieto, M. (2011). FRET in Membrane Biophysics: An Overview. *Frontiers in physiology*, 2, 82. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00082>
111. Lousa, D., Pinto, A. R., Victor, B. L., Laio, A., Veiga, A. S., Castanho, M. A., & Soares, C. M. (2016). Fusing simulation and experiment: The effect of mutations on the structure and activity of the influenza fusion peptide. *Scientific reports*, 6, 28099. <https://doi.org/10.1038/srep28099>
112. Lousa, D., Pinto, A. R. T., Campos, S. R. R., Baptista, A. M., Veiga, A. S., Castanho, M. A. R. B., & Soares, C. M. (2020). Effect of pH on the influenza fusion peptide properties unveiled by constant-pH molecular dynamics simulations combined with experiment. *Scientific Reports*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77040-y>
113. Lousa, D., & Soares, C. M. (2021). Molecular mechanisms of the influenza fusion peptide: insights from experimental and simulation studies. *FEBS Open Bio*, 11(12), 3253–3261. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13323>
114. Lozada, C., Barlow, T. M. A., Gonzalez, S., Lubin-Germain, N., & Ballet, S. (2021). Identification and Characteristics of Fusion Peptides Derived From Enveloped Viruses. *Frontiers in chemistry*, 9, 689006. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.689006>

115. Ma W. (2020). Swine influenza virus: Current status and challenge. *Virus research*, 288, 198118. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198118>
116. Machán, R., & Hof, M. (2010). Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta*, 1798(7), 1377–1391. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.014>
117. Macháň, R., Foo, Y. H., & Wohland, T. (2016). On the Equivalence of FCS and FRAP: Simultaneous Lipid Membrane Measurements. *Biophysical journal*, 111(1), 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.06.001>
118. Magde, D., Elson, E., & Webb, W. W. (1972). Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11), 705. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.29.705>
119. Marquezin, C. A., Ito, A. S., & de Souza, E. S. (2019). Organization and dynamics of NBD-labeled lipids in lipid bilayer analyzed by FRET using the small membrane fluorescent probe AHBA as donor. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1861(10), 182995. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.017>
120. Matrosovich, M. N., Gambaryan, A. S., Teneberg, S., Piskarev, V. E., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., Robertson, J. S., & Karlsson, K. A. (1997). Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*, 233(1), 224–234. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8580>
121. Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., & Klenk, H. D. (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4620–4624. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308001101>
122. McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E., & McKimm-Breschkin, J. L. (2019). Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Frontiers in microbiology*, 10, 39. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00039>
123. McCraw, D. M., Gallagher, J. R., Torian, U., Myers, M. L., Conlon, M. T., Gulati, N. M., & Harris, A. K. (2018). Structural analysis of influenza vaccine virus-like particles reveals a multicomponent organization. *Scientific reports*, 8(1), 10342. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28700-7>
124. Meher, G., & Chakraborty, H. (2019). Membrane Composition Modulates Fusion by Altering Membrane Properties and Fusion Peptide Structure. *The Journal of membrane biology*, 252(4-5), 261–272. <https://doi.org/10.1007/s00232-019-00064-7>
125. Melikyan, G. B., Brener, S. A., Ok, D. C., & Cohen, F. S. (1997a). Inner but not outer membrane leaflets control the transition from glycosylphosphatidylinositol-anchored influenza hemagglutinin-induced hemifusion to full fusion. *The Journal of cell biology*, 136(5), 995–1005. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.5.995>
126. Melikyan, G. B., Jin, H., Lamb, R. A., & Cohen, F. S. (1997b). The role of the cytoplasmic tail region of influenza virus hemagglutinin in formation and growth of fusion pores. *Virology*, 235(1), 118–128. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8686>
127. Melikyan, G. B., Lin, S., Roth, M. G., & Cohen, F. S. (1999). Amino acid sequence requirements of the transmembrane and cytoplasmic domains of influenza virus hemagglutinin for viable membrane fusion. *Molecular biology of the cell*, 10(6), 1821–1836. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.6.1821>

128. Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G., & Brown, D. A. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *The Journal of biological chemistry*, 274(6), 3910–3917. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3910>
129. Michalski, M., & Setny, P. (2023a). Molecular Mechanisms behind Conformational Transitions of the Influenza Virus Hemagglutinin Membrane Anchor. *The journal of physical chemistry. B*, 127(44), 9450–9460. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.3c05257>
130. Michalski, M., & Setny, P. (2023b). Two modes of fusogenic action for influenza virus fusion peptide. *PLoS computational biology*, 19(5), e1011174. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011174>
131. Mineev, K. S., Lyukmanova, E. N., Krabben, L., Serebryakova, M. V., Shulepko, M. A., Arseniev, A. S., Kordyukova, L. V., & Veit, M. (2013). Structural investigation of influenza virus hemagglutinin membrane-anchoring peptide. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 26(9), 547–552. <https://doi.org/10.1093/protein/gzt034>
132. Moro, F., Goñi, F. M., & Urbaneja, M. A. (1993). Fluorescence quenching at interfaces and the permeation of acrylamide and iodide across phospholipid bilayers. *FEBS letters*, 330(2), 129–132. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80257-u](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80257-u)
133. Müller, M., Katsov, K., & Schick, M. (2003). A new mechanism of model membrane fusion determined from Monte Carlo simulation. *Biophysical journal*, 85(3), 1611–1623. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74592-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74592-5)
134. Mukherjee, S., Raghuraman, H., Dasgupta, S., & Chattopadhyay, A. (2004). Organization and dynamics of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: a fluorescence approach. *Chemistry and physics of lipids*, 127(1), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2003.09.004>
135. Murata, M., Sugahara, Y., Takahashi, S., & Ohnishi, S. (1987). pH-dependent membrane fusion activity of a synthetic twenty amino acid peptide with the same sequence as that of the hydrophobic segment of influenza virus hemagglutinin. *Journal of biochemistry*, 102(4), 957–962. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122137>
136. Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2017). *Janeway's Immunobiology 9th Edition*. Garland.
137. Nada, S., Hondo, A., Kasai, A., Koike, M., Saito, K., Uchiyama, Y., & Okada, M. (2009). The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *The EMBO journal*, 28(5), 477–489. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.308>
138. Naeve, C. W., & Williams, D. (1990). Fatty acids on the A/Japan/305/57 influenza virus hemagglutinin have a role in membrane fusion. *The EMBO journal*, 9(12), 3857–3866. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07604.x>
139. Nguyen, P. A., Field, C. M., Groen, A. C., Mitchison, T. J., & Loose, M. (2015). Using supported bilayers to study the spatiotemporal organization of membrane-bound proteins. *Methods in cell biology*, 128, 223–241. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.01.007>
140. Nicolson, G. L., & de Mattos, G. F. (2021). A brief introduction to some aspects of the fluid–mosaic model of cell membrane structure and its importance in membrane lipid replacement. In *Membranes* (Vol. 11, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/membranes11120947>

141. Nieva, J. L., & Agirre, A. (2003). Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion?. *Biochimica et biophysica acta*, 1614(1), 104–115. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00168-8](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00168-8)
142. Nikolaus, J., Scolari, S., Bayraktarov, E., Jungnick, N., Engel, S., Pia Plazzo, A., Stöckl, M., Volkmer, R., Veit, M., & Herrmann, A. (2010). Hemagglutinin of influenza virus partitions into the nonraft domain of model membranes. *Biophysical journal*, 99(2), 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.027>
143. Nobusawa, E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki, Y., Tateno, Y., & Nakajima, K. (1991). Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*, 182(2), 475–485. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90588-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90588-3)
144. Nüssler, F., Clague, M. J., & Herrmann, A. (1997). Meta-stability of the hemifusion intermediate induced by glycosylphosphatidylinositol-anchored influenza hemagglutinin. *Biophysical journal*, 73(5), 2280–2291. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78260-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78260-2)
145. Nuwarda, R. F., Alharbi, A. A., & Kayser, V. (2021). An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. *Vaccines*, 9(9), 1032. <https://doi.org/10.3390/vaccines9091032>
146. Ohkura, T., Momose, F., Ichikawa, R., Takeuchi, K., & Morikawa, Y. (2014). Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts. *Journal of virology*, 88(17), 10039–10055. <https://doi.org/10.1128/JVI.00586-14>
147. Owen, D. M., Magenau, A., Majumdar, A., & Gaus, K. (2010). Imaging membrane lipid order in whole, living vertebrate organisms. *Biophysical journal*, 99(1), L7–L9. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.022>
148. Pace, H., Simonsson Nyström, L., Gunnarsson, A., Eck, E., Monson, C., Geschwindner, S., Snijder, A., & Höök, F. (2015). Preserved transmembrane protein mobility in polymer-supported lipid bilayers derived from cell membranes. *Analytical chemistry*, 87(18), 9194–9203. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01449>
149. Parton, D. L., Tek, A., Baaden, M., & Sansom, M. S. (2013). Formation of raft-like assemblies within clusters of influenza hemagglutinin observed by MD simulations. *PLoS computational biology*, 9(4), e1003034. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003034>
150. Pabis, A., Rawle, R. J., & Kasson, P. M. (2020). Influenza hemagglutinin drives viral entry via two sequential intramembrane mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(13), 7200–7207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914188117>
151. Periasamy, A., & Mazumder, N. (2015). FRET microscopy: Basics, issues and advantages of FLIM-FRET imaging. In A. Periasamy & R. N. Day (Eds.), *Molecular imaging: FRET microscopy and spectroscopy* (2nd ed., pp. 117–149). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14929-5_7
152. Petrov, E. P., Ohrt, T., Winkler, R. G., & Schwille, P. (2006). Diffusion and segmental dynamics of double-stranded DNA. *Physical review letters*, 97(25), 258101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.258101>
153. Petrov, E. P., & Schwille, P. (2008). State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy. In U. Resch-Genger (Ed.), *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II: Bioanalytical and Biomedical Applications* (Vol. 6, pp. 145–197). Springer. https://doi.org/10.1007/4243_2008_032

154. Pike, L. J. (2006). Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
155. Risselada, H. J., Marelli, G., Fuhrmans, M., Smirnova, Y. G., Grubmüller, H., Marrink, S. J., & Müller, M. (2012). Line-tension controlled mechanism for influenza fusion. *PloS one*, 7(6), e38302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038302>
156. Russell, R. J., Kerry, P. S., Stevens, D. J., Steinhauer, D. A., Martin, S. R., Gamblin, S. J., & Skehel, J. J. (2008). Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 17736–17741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807142105>
157. Ranaweera, A., Ratnayake, P. U., Ekanayaka, E. A. P., Declercq, R., & Weliky, D. P. (2019). Hydrogen-Deuterium Exchange Supports Independent Membrane-Interfacial Fusion Peptide and Transmembrane Domains in Subunit 2 of Influenza Virus Hemagglutinin Protein, a Structured and Aqueous-Protected Connection between the Fusion Peptide and Soluble Ecto. *Biochemistry*, 58(19), 2432–2446. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01272>
158. Reviakine, I., & Brisson, A. (2000). Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir*, 16(4), 1806–1815. <https://doi.org/10.1021/la9903043>
159. Rice, A., Haldar, S., Wang, E., Blank, P. S., Akimov, S. A., Galimzyanov, T. R., Pastor, R. W., & Zimmerberg, J. (2022). Planar aggregation of the influenza viral fusion peptide alters membrane structure and hydration, promoting poration. *Nature communications*, 13(1), 7336. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34576-z>
160. Ripa, I., Andreu, S., López-Guerrero, J. A., & Bello-Morales, R. (2021). Membrane Rafts: Portals for Viral Entry. *Frontiers in Microbiology*, 12(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631274>
161. Sainz, B., Jr, Rausch, J. M., Gallaher, W. R., Garry, R. F., & Wimley, W. C. (2005). Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein. *Journal of virology*, 79(11), 7195–7206. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7195-7206.2005>
162. Sakai, T., Ohuchi, R., & Ohuchi, M. (2002). Fatty acids on the A/USSR/77 influenza virus hemagglutinin facilitate the transition from hemifusion to fusion pore formation. *Journal of virology*, 76(9), 4603–4611. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4603-4611.2002>
163. Sankaran, J., & Wohland, T. (2023). Current capabilities and future perspectives of FCS: super-resolution microscopy, machine learning, and in vivo applications. *Communications biology*, 6(1), 699. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05069-6>
164. Sauter, N. K., Glick, G. D., Crowther, R. L., Park, S. J., Eisen, M. B., Skehel, J. J., Knowles, J. R., & Wiley, D. C. (1992). Crystallographic detection of a second ligand binding site in influenza virus hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1), 324–328. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.324>
165. Scheiffele, P., Roth, M. G., & Simons, K. (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *The EMBO journal*, 16(18), 5501–5508. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.18.5501>

166. Schmeisser, F., Adamo, J. E., Blumberg, B., Friedman, R., Muller, J., Soto, J., & Weir, J. P. (2012). Production and characterization of mammalian virus-like particles from modified vaccinia virus Ankara vectors expressing influenza H5N1 hemagglutinin and neuraminidase. *Vaccine*, 30(23), 3413–3422. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.033>
167. Schönle, A., Von Middendorff, C., Ringemann, C., Hell, S. W., & Eggeling, C. (2014). Monitoring triplet state dynamics with fluorescence correlation spectroscopy: bias and correction. *Microscopy research and technique*, 77(7), 528–536. <https://doi.org/10.1002/jemt.22368>
168. Schroth-Diez, B., Ponimaskin, E., Reverey, H., Schmidt, M. F., & Herrmann, A. (1998). Fusion activity of transmembrane and cytoplasmic domain chimeras of the influenza virus glycoprotein hemagglutinin. *Journal of virology*, 72(1), 133–141. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.133-141.1998>
169. Sempere Borau, M., & Stertz, S. (2021). Entry of influenza A virus into host cells - recent progress and remaining challenges. *Current opinion in virology*, 48, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.001>
170. Setny, P., Borkowska, P., & Worch, R. (2025). Integrating Cryo-Electron Microscopy and Molecular Dynamics Simulations to Investigate Membrane Binding of Influenza Virus Fusion Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 147(16), 13385–13395. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c18441>
171. Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
172. Shangguan, T., Alford, D., & Bentz, J. (1996). Influenza-virus-liposome lipid mixing is leaky and largely insensitive to the material properties of the target membrane. *Biochemistry*, 35(15), 4956–4965. <https://doi.org/10.1021/bi9526903>
173. Simons, K., & van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17), 6197–6202. <https://doi.org/10.1021/bi00417a001>
174. Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>
175. Simons, K., & Vaz, W. L. C. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. In *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* (Vol. 33, pp. 269–295). <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803>
176. Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
177. Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry*, 69, 531–569. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531>
178. Skibbens, J. E., Roth, M. G., & Matlin, K. S. (1989). Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 108(3), 821–832. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.3.821>
179. Smirnova, Y. G., Marrink, S. J., Lipowsky, R., & Knecht, V. (2010). Solvent-exposed tails as prestalk transition states for membrane fusion at low hydration. *Journal of the American Chemical Society*, 132(19), 6710–6718. <https://doi.org/10.1021/ja910050x>

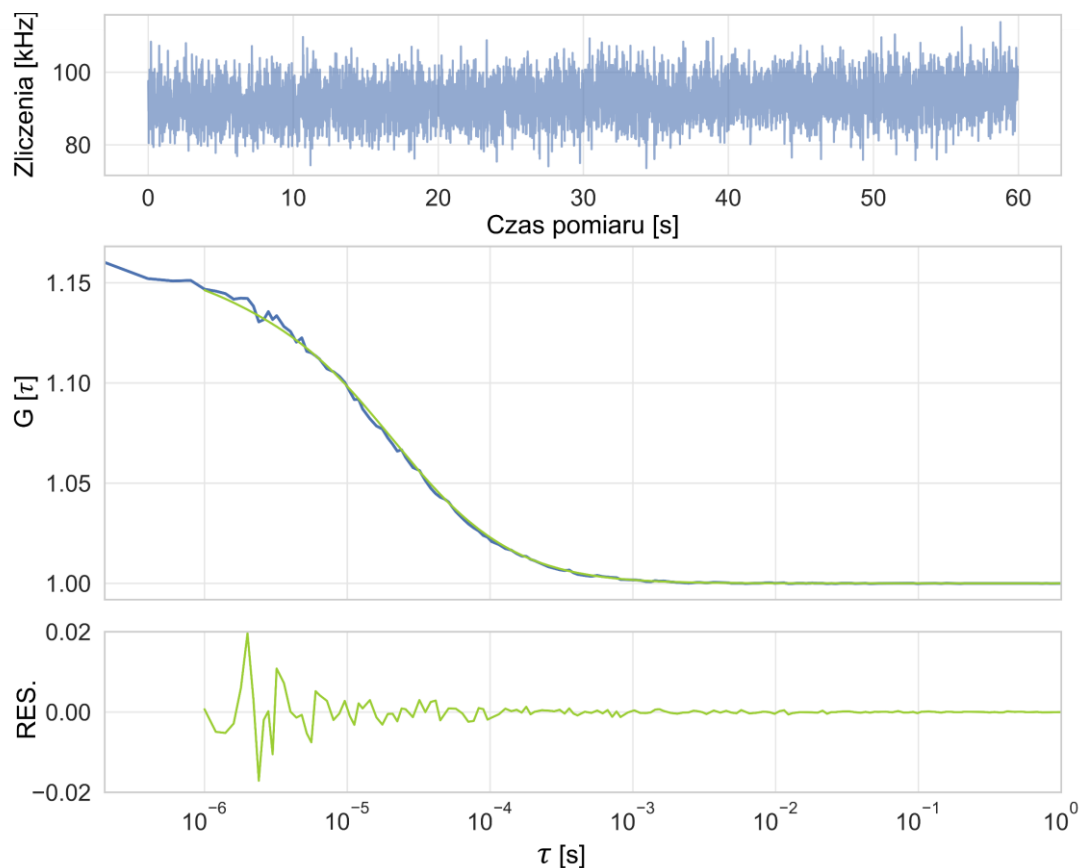
180. Smrt, S. T., Draney, A. W., & Lorieau, J. L. (2015). The influenza hemagglutinin fusion domain is an amphipathic helical hairpin that functions by inducing membrane curvature. *Journal of Biological Chemistry*, 290(1), 228–238. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.611657>
181. Sobo, K., Chevallier, J., Parton, R. G., Gruenberg, J., & van der Goot, F. G. (2007). Diversity of raft-like domains in late endosomes. *PLoS ONE*, 2(4), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000391>
182. Steinhauer, D. A., Wharton, S. A., Wiley, D. C., & Skehel, J. J. (1991). Deacylation of the hemagglutinin of influenza A/Aichi/2/68 has no effect on membrane fusion properties. *Virology*, 184(1), 445–448. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90867-b](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90867-b)
183. Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*, 8(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
184. Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D., & Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *The EMBO journal*, 11(7), 2407–2414. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05305.x>
185. Stöckl, M., Plazzo, A. P., Korte, T., & Herrmann, A. (2008). Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy of fluorescent lipid analogues. *The Journal of biological chemistry*, 283(45), 30828–30837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801418200>
186. Strambini, G. B., & Gonnelli, M. (2010). Fluorescence quenching of buried Trp residues by acrylamide does not require penetration of the protein fold. *The journal of physical chemistry. B*, 114(2), 1089–1093. <https://doi.org/10.1021/jp909567q>
187. Suguitan, A. L., Jr, Matsuoka, Y., Lau, Y. F., Santos, C. P., Vogel, L., Cheng, L. I., Orandle, M., & Subbarao, K. (2012). The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. *Journal of virology*, 86(5), 2706–2714. <https://doi.org/10.1128/JVI.05546-11>
188. Sun, X., Tse, L. V., Ferguson, A. D., & Whittaker, G. R. (2010). Modifications to the Hemagglutinin Cleavage Site Control the Virulence of a Neurotropic H1N1 Influenza Virus. *Journal of Virology*, 84(17), 8683–8690. <https://doi.org/10.1128/jvi.00797-10>
189. Sureshbabu, N., Kirubakaran, R., & Jayakumar, R. (2009). Surfactant-induced conformational transition of amyloid beta-peptide. *European biophysics journal : EBJ*, 38(4), 355–367. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0379-8>
190. Suza, W. P., & Chappell, J. (2016). Spatial and temporal regulation of sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *Physiologia plantarum*, 157(2), 120–134. <https://doi.org/10.1111/ppl.12413>
191. Takeda, M., Leser, G. P., Russell, C. J., & Lamb, R. A. (2003). Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 14610–14617. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235620100>
192. Tall, R. D., Alonso, M. A., & Roth, M. G. (2003). Features of influenza HA required for apical sorting differ from those required for association with DRMS or MAL. *Traffic*, 4(12), 838–849. <https://doi.org/10.1046/j.1398-9219.2003.0138.x>
193. Tamm L. K. (2003). Hypothesis: spring-loaded boomerang mechanism of influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion. *Biochimica et biophysica acta*, 1614(1), 14–23. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00159-7](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00159-7)

194. Tate, M. D., Job, E. R., Deng, Y. M., Gunalan, V., Maurer-Stroh, S., & Reading, P. C. (2014). Playing hide and seek: how glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses*, 6(3), 1294–1316. <https://doi.org/10.3390/v6031294>
195. Tatulian, S. A., Hinterdorfer, P., Baber, G., & Tamm, L. K. (1995). Influenza hemagglutinin assumes a tilted conformation during membrane fusion as determined by attenuated total reflection FTIR spectroscopy. *The EMBO journal*, 14(22), 5514–5523. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00238.x>
196. Tatulian, S. A., & Tamm, L. K. (2000). Secondary structure, orientation, oligomerization, and lipid interactions of the transmembrane domain of influenza hemagglutinin. *Biochemistry*, 39(3), 496–507. <https://doi.org/10.1021/bi991594p>
197. Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2010). Influenza: the once and future pandemic. *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)*, 125 Suppl 3(Suppl 3), 16–26.
198. Tenchov, B. G., MacDonald, R. C., & Lentz, B. R. (2013). Fusion peptides promote formation of bilayer cubic phases in lipid dispersions. An X-ray diffraction study. *Biophysical Journal*, 104(5), 1029–1037. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.12.034>
199. Thorén, P. E., Persson, D., Esbjörner, E. K., Goksör, M., Lincoln, P., & Nordén, B. (2004). Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochemistry*, 43(12), 3471–3489. <https://doi.org/10.1021/bi0360049>
200. Trovão, N. S., Khan, S. M., Lemey, P., Nelson, M. I., & Cherry, J. L. (2024). Comparative evolution of influenza A virus H1 and H3 head and stalk domains across host species. *mBio*, 15(1), e0264923. <https://doi.org/10.1128/mbio.02649-23>
201. Tzarum, N., de Vries, R. P., Peng, W., Thompson, A. J., Bouwman, K. M., McBride, R., Yu, W., Zhu, X., Verheije, M. H., Paulson, J. C., & Wilson, I. A. (2017). The 150-Loop Restricts the Host Specificity of Human H10N8 Influenza Virus. *Cell reports*, 19(2), 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.054>
202. Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
203. Veit, M., Serebryakova, M. V., & Kordyukova, L. V. (2013). Palmitoylation of influenza virus proteins. *Biochemical Society transactions*, 41(1), 50–55. <https://doi.org/10.1042/BST20120210>
204. Veit, M., & Thaa, B. (2011). Association of influenza virus proteins with membrane rafts. *Advances in virology*, 2011, 370606. <https://doi.org/10.1155/2011/370606>
205. Victor, B. L., Baptista, A. M., & Soares, C. M. (2012). Structural determinants for the membrane insertion of the transmembrane peptide of hemagglutinin from influenza virus. *Journal of chemical information and modeling*, 52(11), 3001–3012. <https://doi.org/10.1021/ci3003396>
206. Victor, B. L., Lousa, D., Antunes, J. M., & Soares, C. M. (2015). Self-assembly molecular dynamics simulations shed light into the interaction of the influenza fusion peptide with a membrane bilayer. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(4), 795–805. <https://doi.org/10.1021/ci500756v>
207. Wagner, R., Herwig, A., Azzouz, N., & Klenk, H. D. (2005). Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. *Journal of virology*, 79(10), 6449–6458. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6449-6458.2005>

208. Wasniewski, C. M., Parkanzky, P. D., Bodner, M. L., & Weliky, D. P. (2004). Solid-state nuclear magnetic resonance studies of HIV and influenza fusion peptide orientations in membrane bilayers using stacked glass plate samples. *Chemistry and physics of lipids*, 132(1), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.09.008>
209. Weidemann, T., Schwille, P. (2009). Fluorescence Correlation Spectroscopy in Living Cells. In: Hinterdorfer, P., Oijen, A. (eds) Handbook of Single-Molecule Biophysics. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76497-9_8
210. Wharton, S. A., Martin, S. R., Ruigrok, R. W., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1988). Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin. *The Journal of general virology*, 69 (Pt 8), 1847–1857. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-8-1847>
211. White, J. M., & Whittaker, G. R. (2016). Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes. In Traffic (Vol. 17, Issue 6, pp. 593–614). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/tra.12389>
212. White, J. M., Ward, A. E., Odongo, L., & Tamm, L. K. (2023). Viral Membrane Fusion: A Dance Between Proteins and Lipids. *Annual review of virology*, 10(1), 139–161. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-111821-093413>
213. Wilson, I. A., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, 289(5796), 366–373. <https://doi.org/10.1038/289366a0>
214. Wilson, R. L., Frisz, J. F., Klitzing, H. A., Zimmerberg, J., Weber, P. K., & Kraft, M. L. (2015). Hemagglutinin clusters in the plasma membrane are not enriched with cholesterol and sphingolipids. *Biophysical journal*, 108(7), 1652–1659. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.02.026>
215. Worch, R. (2014). Structural biology of the influenza virus fusion peptide. *Acta Biochimica Polonica*, 61(3), 421–426. https://doi.org/10.18388/abp.2014_1859
216. Worch, R., Krupa, J., Filipek, A., Szymaniec, A., & Setny, P. (2017). Three conserved C-terminal residues of influenza fusion peptide alter its behavior at the membrane interface. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1861(2), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.004>
217. Worch, R., Dudek, A., Borkowska, P., & Setny, P. (2021). Transient Excursions to Membrane Core as Determinants of Influenza Virus Fusion Peptide Activity. *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5301. <https://doi.org/10.3390/ijms22105301>
218. Wu, N. C., & Wilson, I. A. (2020). Structural Biology of Influenza Hemagglutinin: An Amaranthine Adventure. *Viruses*, 12(9), 1053. <https://doi.org/10.3390/v12091053>
219. Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., & Gao, G. F. (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in microbiology*, 22(4), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.010>
220. Yang, L., & Huang, H. W. (2002). Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5588), 1877–1879. <https://doi.org/10.1126/science.1074354>
221. Yang, S.-T., Kreutzberger, A. J. B., Lee, J., Kiessling, V., & Tamm, L. K. (2016). The role of cholesterol in membrane fusion. *Chemistry and Physics of Lipids*, 199, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003>
222. Yu, J., Fischman, D. A., & Steck, T. L. (1973). Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *Journal of supramolecular structure*, 1(3), 233–248. <https://doi.org/10.1002/jss.400010308>

223. Yuan, Z., Zhang, F., Davis, M. J., Bodén, M., & Teasdale, R. D. (2006). Predicting the solvent accessibility of transmembrane residues from protein sequence. *Journal of proteome research*, 5(5), 1063–1070. <https://doi.org/10.1021/pr050397b>
224. Zhang, J., Pekosz, A., & Lamb, R. A. (2000). Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *Journal of virology*, 74(10), 4634–4644. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.10.4634-4644.2000>
225. Zhang, L., & Granick, S. (2005). Slaved diffusion in phospholipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9118–9121. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502723102>
226. Zhang, Y., Yang, X., Liu, L., Huang, X., Pu, J., Long, G., Zhang, L., Liu, D., Xu, B., Liao, J., & Liao, F. (2013). Comparison of Förster-resonance-energy-transfer acceptors for tryptophan and tyrosine residues in native proteins as donors. *Journal of fluorescence*, 23(1), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s10895-012-1128-z>
227. Zhang, Y., Li, Q., Dong, M., & Han, X. (2020). Effect of cholesterol on the fluidity of supported lipid bilayers. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 196, 111353. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111353>
228. Zhang, Y., Ghosh, U., Xie, L., Holmes, D., Severin, K. G., & Weliky, D. P. (2023). Lipid acyl chain protrusion induced by the influenza virus hemagglutinin fusion peptide detected by NMR paramagnetic relaxation enhancement. *Biophysical chemistry*, 299, 107028. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2023.107028>
229. Zhao, C., & Pu, J. (2022). Influence of Host Sialic Acid Receptors Structure on the Host Specificity of Influenza Viruses. *Viruses*, 14(10), 2141. <https://doi.org/10.3390/v14102141>
230. Zheng, L., Lin, Y., Yang, J., Fang, K., Wu, J., & Zheng, M. (2023). Global variability of influenza activity and virus subtype circulation from 2011 to 2023. *BMJ open respiratory research*, 10(1), e001638. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2023-001638>
231. Zheng, Z., Lü, S., & Long, M. (2022). Simulation and prediction of membrane fusion dynamics. *Theoretical and Applied Mechanics Letters*, 12(1). <https://doi.org/10.1016/j.taml.2022.100321>

Załączniki



Rycina Z 1 Przykładowy wynik pomiaru FCS dla barwnika Alexa 488. Wykresy przedstawiają zliczenia intensywności fluorescencji w czasie, krzywą autokorelacji z danych eksperymentalnych, dopasowaną funkcję autokorelacji oraz reszty z dopasowania. Wykres wykonany na podstawie uśrednionych 6 pomiarów roztworu barwnika Alexa 488 (25 nM).

Tabela Z 1 Podsumowanie wyników dla przykładowych eksperymentów FCS 25 nM roztworu barwnika Alexa 488, wyniki dla każdego eksperymentu zostały uzyskane na podstawie 6 uśrednionych pomiarów

Zliczenia na cząstkę CPM [kHz]	Liczba cząstek	Stan trypletowy [%]	Czas relaksacji stanu trypletowego [μ s]	Czas dyfuzji τ_D [μ s]
13,3	6,9	8,4	4,9	20,3
13,6	9,4	11,1	5,7	20,2
8,9	6	12	9,1	24,2

Osiągnięcia naukowe

Publikacje naukowe, których wyniki zostały zaprezentowane w przedstawionej pracy naukowej:

1. **Borkowska, P.**, Kubiszewski-Jakubiak, S., Bykowski, M., Kowalewska, L., Michalski, M., Setny, P., & Worch, R. (2024). Transmembrane domains of H1 and H3 hemagglutinin contribute to membrane fusion in a different manner. *BioRxiv*, 2024.10.31.621245. <https://doi.org/10.1101/2024.10.31.621245>
2. Worch, R., Dudek, A., **Borkowska, P.**, & Setny, P. (2021). Transient excursions to membrane core as determinants of influenza virus fusion peptide activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms22105301>

Pozostałe publikacje:

1. Setny, P., **Borkowska, P.**, & Worch, R. (2025). Integrating Cryo-Electron Microscopy and Molecular Dynamics Simulations to Investigate Membrane Binding of Influenza Virus Fusion Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 147(16), 13385–13395. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c18441>
2. Kurpiejewski, K., Jędrych, A., **Borkowska, P.**, Łukaszewicz, M., Piecyk, K., Worch, R., Wójcik, M., & Jankowska-Anyszka, M. (2025). Gold nanoparticles functionalized with mRNA cap analogs as a strategy to inhibit eIF4E in cancer therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 107, 106820. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2025.106820>
3. **Borkowska, P.**, Worch, R. (2024). „Wyroby „wirusopodobne”. *Forum Akademickie*, (7–8)