

УДК 578.23+54.03

## АДСОРБЦИЯ ПОЛИПРОТЕИНА Gag ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА НА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ: ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ КОМПЕНСАЦИИ ВНУТРИМЕМБРАННОГО ПОЛЯ

© 2024 г. З. Г. Дениева<sup>a, \*</sup>, К. И. Макринский<sup>a</sup>, Ю. А. Ермаков<sup>a</sup>, О. В. Батищев<sup>a, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

\*e-mail: zaret03@mail.ru

\*\*e-mail: olegbati@gmail.com

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 27.11.2023 г.

Полипротеин Gag – это основной структурный белок вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Он ответственен за сборку новых вирусных частиц в инфицированной клетке. Данный процесс происходит на плазматической мембране клетки и, во многом, регулируется взаимодействиями Gag с липидным матриксом клеточной мембраны. В настоящей работе с помощью метода компенсации внутримембранного поля и электрокинетических измерений дзета-потенциала в суспензии липосом нами было изучено связывание немиристоилированного полипротеина Gag ВИЧ с модельными липидными мембранами. Для количественной оценки аффинности белка к заряженным и незаряженным липидным бислоям были получены изотермы адсорбции Gag и вычислены константы связывания. Показано, что данный белок способен взаимодействовать с обоими типами мембран примерно с одинаковыми истинными константами связывания ( $K_{PC} = 8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  и  $K_{PS} = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Однако присутствие в липидном бислое анионного липида фосфатидилсерина значительно усиливает адсорбцию белка на мембране за счет дополнительного влияния создаваемого им поверхностного скачка потенциала вблизи мембраны ( $K_{PS}^{\text{эфф}} = 37.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Таким образом, взаимодействие Gag с мембранами определяется, скорее, гидрофобными взаимодействиями и площадью, приходящейся на одну липидную молекулу, в то время как наличие отрицательного поверхностного заряда лишь увеличивает концентрацию положительно заряженного белка вблизи мембраны.

**Ключевые слова:** вирус иммунодефицита человека, полипротеин Gag, бислоенная липидная мембрана, компенсация внутримембранного поля, граничные потенциалы

DOI: 10.31857/S0424857024060019, EDN: PVFDAZ

## ADSORPTION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS Gag POLYPROTEIN ON LIPID MEMBRANES: A STUDY BY THE INNER FIELD COMPENSATION METHOD

© 2024 г. Z. G. Denieva<sup>a, \*</sup>, K. I. Makrinsky<sup>a</sup>, Yu. A. Ermakov<sup>a</sup>, and O. V. Batishchev<sup>a, \*\*</sup>

<sup>a</sup>A.N. Frumkin Institute of physical chemistry and electrochemistry, Russian academy of sciences,  
Moscow, Russia

\*e-mail: zaret03@mail.ru

\*\*e-mail: olegbati@gmail.com

The Gag polyprotein is the main structural protein of the human immunodeficiency virus (HIV). It is responsible for the assembly of new viral particles in the infected cell. This process occurs on the plasma membrane of the cell and is largely regulated by the interactions of Gag with the lipid matrix of the cell membrane. In this work, using the inner field compensation method and electrokinetic measurements of the zeta potential in a liposome suspension, we studied the binding of the HIV non-myristoylated Gag polyprotein to model lipid membranes. To quantify protein affinity for charged and uncharged lipid bilayers, Gag adsorption isotherms were obtained and binding constants were calculated. It has been shown that this protein is able to interact with both types of membranes with approximately the same binding constants ( $K_{PC} = 8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$

and  $K_{PS} = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). However, the presence of the anionic lipid phosphatidylserine in the lipid bilayer significantly enhances protein adsorption on the membrane due to the additional influence of the surface potential jump it creates near the membrane ( $K_{PS}^{\text{eff}} = 37.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Thus, the interaction of Gag with membranes is determined rather by hydrophobic interactions and the area per lipid molecule, while the presence of a negative surface charge only increases the concentration of the positively charged protein near the membrane.

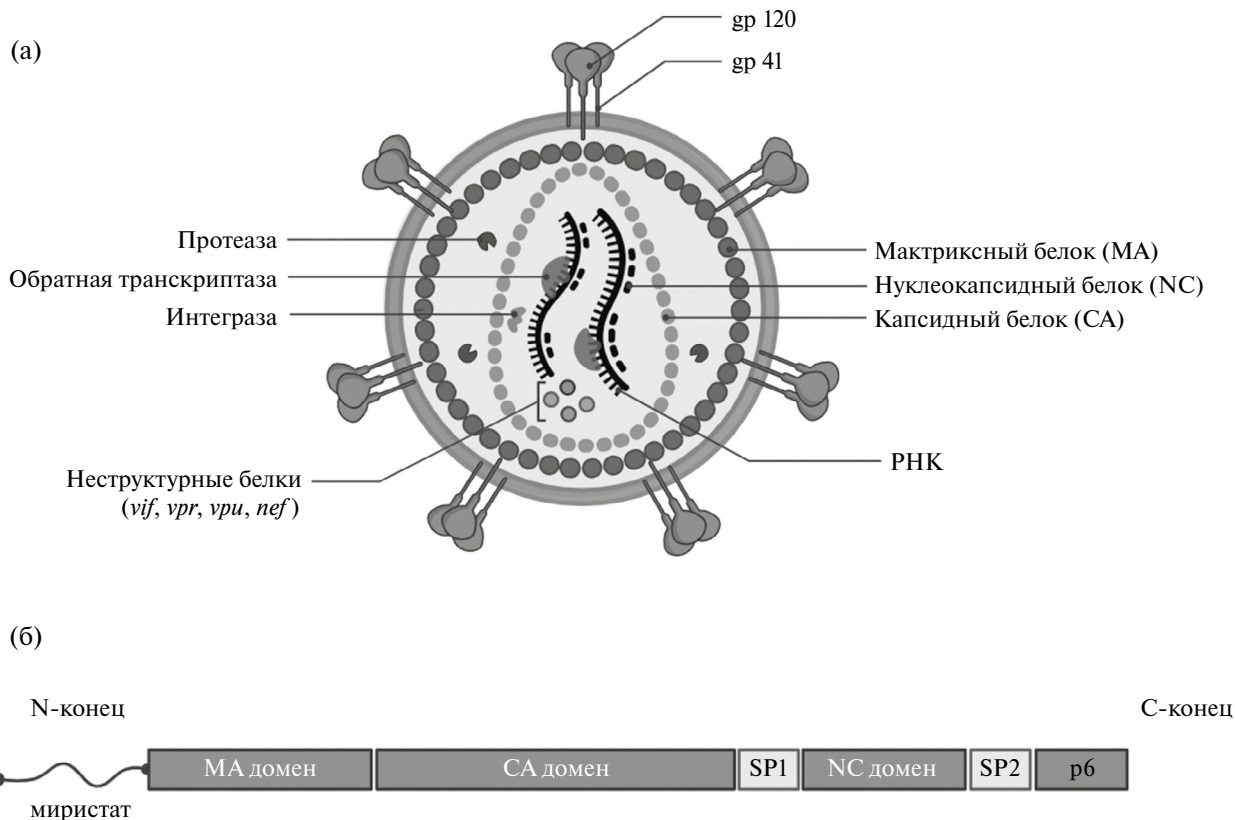
**Keywords:** Human immunodeficiency virus, Gag polyprotein, lipid bilayer membrane, inner field compensation technique, boundary potentials

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) поражает клетки иммунной системы и приводит к развитию синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). Зрелый (инфекционный) ВИЧ является частицей сферической формы с диаметром около 100 нм, окруженной оболочкой из бислоевой липидной мембраны, захватываемой вирусом при его отпочковывании с поверхности инфицированной клетки (рис. 1а). Генетический материал ВИЧ представлен двумя копиями молекулы РНК, а наиболее консервативным геном является ген *gag*, который кодирует основной структурный белок вируса – полипротеин Gag. Этот белок составляет примерно 50% массы всей вирусной частицы и участвует во многих стадиях жизненного цикла вируса [1, 2]. Полипротеин

Gag является миристоилированным по N-концу белком и состоит из четырех основных доменов (матриксного МА, капсидного СА, нуклеокапсидного NC и домена р6), которые при созревании вируса в инфекционно-активную форму расщепляются на отдельные белки, и двух связующих пептидов (SP1 и SP2) (рис. 1б) [2].

Матриксный домен отвечает за связывание Gag с плазматической мембраной, на которой происходит сборка и отпочковывание дочерних вирионов [2]. В ряде исследований показано, что домен МА взаимодействует с мембраной электростатически через высокоосновный участок на его N-конце, связываясь с заряженными липидами фосфатидилсерин (PS) и фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом (PI(4,5)P<sub>2</sub>) на внутренней стороне плазматической мембраны [3, 4].



**Рис. 1.** Схематическое изображение частицы ВИЧ (а). Схематическое изображение структурных элементов полипротеина Gag (б).

Мутации в этом участке приводят к диссоциации Gag с плазматической мембраны и его обратному захвату во внутриклеточное пространство в некоторых типах клеток [5]. Таким образом, электростатические взаимодействия играют важную роль в формировании ВИЧ [6]. Кроме того, исследования показали, что связывание миристоилированного домена МА с мембраной нарушается в отсутствие молекул PI(4,5)P<sub>2</sub>, что предполагает специфическое взаимодействие между белком и данным липидом [7, 8]. В этих работах специфичность взаимодействия Gag с PI(4,5)P<sub>2</sub> объясняется двумя механизмами: 1) он служит “якорем” для закрепления белка в липидном бислое за счет электростатических взаимодействий и 2) запускает конформационные изменения миристоилированного участка белка, которые дополнительно удерживают Gag в мембране за счет гидрофобных сил [9]. Однако и PI(4,5)P<sub>2</sub>, и PS заряжены отрицательно, и до сих пор нет четкого понимания того, участвует ли поверхностный заряд, обеспечиваемый фосфатидилсерином, в специфическом связывании Gag с мембраной, которое наблюдается в присутствии PI(4,5)P<sub>2</sub> [8].

Фосфатидилсерин широко распространен в различных тканях организма и принимает участие в “нацеливании” белков на клеточные мембраны в результате электростатических белок-липидных взаимодействий, которые могут существенным образом влиять на физико-химические характеристики липидного бислоя [10]. Подобные эффекты наблюдались при адсорбции на мембранах некоторых многовалентных катионов, которые проявляют высокое сродство к фосфатидилсерину. Так, связывание катионов гадолия (Gd<sup>3+</sup>) с PS изменяет свойства липидного матрикса, делая его более упругим при сжатии монослоя в латеральном направлении и повышая его жесткость при трансмембранном сжатии бислоя [11, 12]. Моделирование мембран методами молекулярной динамики (МД) позволило выявить координацию многовалентных катионов с полярными головками фосфолипидов, в результате которой 2–3 молекулы липидов объединяются в нанокластеры [12]. Также методами МД было показано, что при связывании молекул лизина и полипептидов на его основе с поверхностью мембран, содержащих анионные фосфолипиды, существенным образом меняется сеть водородных связей между фосфатными группами этих липидов, которые вносят свой вклад в упругие характеристики мембран [13]. Естественно предположить, что оба механизма могут быть реализованы и при связывании белков с мембрана-

ми живых клеток. Для изучения таких эффектов целесообразно использовать биоэлектрохимические методы, эффективность которых проявляется в изучении взаимодействия многих биологически активных веществ с липидными моделями клеточных мембран [14].

К настоящему времени электростатический характер адсорбции белка Gag ВИЧ на липидных мембранах, содержащих фосфатидилсерин, не исследован. Отдельные работы существуют лишь для выделенных доменов Gag. Для домена МА методом поверхностного плазмонного резонанса было показано, что эффективность его адсорбции на поверхности липидного бислоя зависит от присутствия не менее 20 мол. % анионного PS в составе мембраны [8]. Неожиданным оказалось, что не только домен МА, но и домен NC как в свободной форме, так и в комплексе с нуклеиновой кислотой связываются с поверхностью мембран, в которых присутствует фосфатидилсерин [15]. Однако результаты, полученные для отдельных доменов Gag, могут не в полной мере отражать взаимодействие с мембраной всего полноразмерного полипротеина Gag. Например, сродство к мембранам для димера домена МА на несколько порядков превышает эффективность связывания мономера данного белка [6]. Этот факт указывает на то, что взаимодействие нескольких молекул Gag друг с другом должно усилить их адсорбцию на мембранах благодаря электростатическому притяжению соответствующих положительно заряженных групп белка к анионным липидам в составе мембран [16, 17]. Тем не менее есть лишь несколько исследований, где были получены количественные данные о взаимодействии белка Gag с мембранами в условиях *in vitro* на модельных системах [18, 19]. При этом во всех них исследовалась только роль PI(4,5)P<sub>2</sub>, игнорируя противоречивые данные о вкладе фосфатидилсерина, а также о принципиальной возможности связывания белка Gag с нейтральными мембранами [20]. Таким образом, вопрос о роли анионных и нейтральных фосфолипидов в адсорбции Gag остается открытым, а для его решения необходимы подробные исследования взаимодействия белка с мембранами различного липидного состава.

Электростатические эффекты, вызванные адсорбцией макромолекул на поверхности липидных мембран, можно регистрировать классическим методом электрокинетических измерений в суспензии липосом, определяя величину дзета-потенциала в гидродинамической плоскости скольжения [21]. Найденные из этих опытов

значения поверхностного потенциала можно сопоставить с измерениями граничного потенциала на плоских липидных мембранах того же состава, проводимыми методом компенсации внутримембранного поля (**КВП**) [22]. Таким образом можно получить информацию о термодинамических константах связывания макромолекул с липидным бислоем и оценить вклад электростатических эффектов в эффективность данного взаимодействия [23]. С этой целью в настоящей работе нами был выбран описанный подход для анализа адсорбции водорастворимой формы полипротеина Gag на нейтральных мембранах и мембранах, содержащих фосфатидилсерин. В результате были оценены константы связывания данного белка с анионным фосфатидилсерином и цвиттер-ионным фосфатидилхолином с учетом влияния фонового электролита на процесс его адсорбции, а также определена стехиометрия связывания Gag с липидами.

#### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

**Материалы.** В экспериментах были использованы реактивы: KCl (Sigma-Aldrich, США), NERES (Хеликон, Россия), ЭДТА (Life Technologies, США), КОН (х.ч. Реахим, Россия), HCl (х.ч. Реахим, Россия), агар (Хеликон, Россия), *n*-декан (Acros Organics, США), липиды 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин (DPhPC) и 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилсерин (DPhPS) (Avanti Polar Lipids, США), растворенные в хлороформе (99%, Merck, Германия) в концентрации 10 мг/мл.

Полипротеин Gag получали по методу, описанному в [24]. В использованном белке отсутствует миристоильная группа на N-конце и домен р6, что делает его водорастворимым. В экспериментах Gag растворяли в буферном растворе, содержащем 10 мМ KCl, 5 мМ NERES и 0.1 мМ ЭДТА, рН 7.2, непосредственно перед каждым экспериментом и хранили при +4°C не более 72 ч.

**Формирование липидных мембран.** Плоские бислоенные липидные мембраны (**БЛМ**) получали на круглом отверстии диаметром 1 мм в перегородке, разделяющей два отсека ячейки из инертного гидрофобного материала (тефлона) по методу Мюллера — Рудина [25]. В данной работе формировали незаряженные БЛМ из DPhPC и заряженные БЛМ из смеси DPhPC:DPhPS 80:20 (по мол. %).

Каждую полуячейку заполняли рабочим буферным раствором 10 мМ KCl, 5 мМ NERES, 0.1 мМ ЭДТА, рН 7.2. БЛМ формировали путем

нанесения на отверстие в ячейке капли раствора липидов в *n*-декане в концентрации 15 мг/мл. Для этого хлороформ из стокового раствора липидов предварительно удаляли под струей аргона в течение 30 мин с образованием тонкой пленки на стенках колбы, в которую затем добавляли необходимое количество *n*-декана. Электрические измерения БЛМ проводили с помощью пары Ag/AgCl-электродов, контактирующих с рабочим буферным раствором в отсеках ячейки через солевые мостики (пластиковые наконечники микропипеток, заполненные раствором 2 мас. % агара в 100 мМ KCl). Сопrotивление электродов с мостиками составляло не более 40–50 кОм. Процесс формирования мембраны регистрировался по росту ее электрической емкости. Для проведения электрических измерений к электроду с одной стороны мембраны подключали генератор переменного напряжения (выход ЦАП платы L780, Lcard, Россия), а с другой — усилитель тока Keithley-427 (Великобритания). О том, что удалось сформировать бислоенную мембрану, свидетельствовало появление емкости 1–3 нФ, из предположения, что мембрана занимает всю площадь отверстия. В ходе эксперимента буферный раствор в обоих отсеках ячейки перемешивался с помощью магнитной мешалки.

Липосомы готовили методом гидратации липидной пленки [26]. Раствор липидов в хлороформе упаривали на роторном испарителе (40 мин при давлении 40 мбар) для получения тонкой пленки на дне круглодонной стеклянной колбы. Затем ее гидратировали раствором 10 мМ KCl, рН 7.0 и встряхивали на BioVortex до получения опалесцирующей суспензии. Конечная концентрация липидов в суспензии липосом составляла 1 мг/мл.

**Дзета-потенциал липосом.** Измерения электрофоретической подвижности липосом проводили методом динамического светорассеяния с помощью Zetasizer II (Malvern Instruments, Великобритания) с коррелятором PhotoCor SP (США) [23]. Электрическое поле в электрофоретической ячейке генерировалось приложением напряжения 100–120 В между двумя платинированными электродами, отделенными от образца полупроницаемой мембраной, не пропускающей коллоидные частицы. Для измерения напряженности электрического поля использовали кратковременное подключение пары платиновых электродов, расположенных на расстоянии 5 см друг от друга внутри измерительной ячейки. Для предотвращения поляризации электродов поляризуемость подаваемого на них потенциала менялась

с частотой 2 Гц. Электрический потенциал в гидродинамической плоскости скольжения ( $\zeta$ -потенциал) рассчитывали по уравнению Смолуховского [21].

**Метод компенсации внутримембранного поля (КВП).** Разность граничных потенциалов БЛМ ( $\Delta\phi_b$ ) определяли методом КВП с помощью фазочувствительного усилителя Stanford (DSP Lock-In amplifier, model SR830, США) с использованием второй гармоники емкостного тока [22, 27]. Метод основан на способности мембран менять толщину в электрическом поле, тем самым увеличивая свою электрическую емкость. Значение емкости минимально, когда электрическое поле внутри мембраны равно нулю, а напряжение, при котором оно достигается, равно разности граничных потенциалов на БЛМ. В этом случае регистрируется нулевая амплитуда второй гармоники емкостного тока. Выбор этой гармоники позволяет организовать систему обратной связи и, тем самым, непрерывно контролировать изменения разности граничных потенциалов и регистрировать кинетику адсорбции заряженных молекул с одной стороны мембраны. Для уменьшения эффектов экранирования поверхностного заряда и увеличения разрешающей способности метода КВП [28], все измерения проводили в условиях низкой ионной силы раствора фонового электролита (10 мМ KCl, 5 мМ HEPES, 0.1 мМ ЭДТА). При проведении расчетов влияние компонентов буфера на ионную силу полагаем незначительным. Во всех экспериментах белок Gag в диапазоне концентраций ( $C_{Gag}$ ) от 10 до 200 нМ добавляли в один из двух отсеков ячейки с мембраной и наблюдали изменение разности граничных потенциалов до выхода на стационарное состояние.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Определение плотности заряда на мембране

Чтобы оценить вклад фосфатидилсерина в общий заряд поверхности мембраны, нами была определена плотность заряда на мембране ( $\sigma$ ), состоящей из заряженных и незаряженных липидов. Для случая симметричного электролита взаимосвязь плотности заряда на мембране и ее поверхностного потенциала можно представить в рамках модели двойного электрического слоя Гуи–Чепмена [29, 30], представленной уравнением (1). В связи с тем, что ионы фонового электролита могут связываться с полярными группами липидов, эта модель должна быть дополнена соответствующим уравнением адсорбции (2), как было предложено Штерном [31]. Тогда, если счи-

тать, что концентрация ионов вблизи поверхности мембраны описывается распределением Больцмана (3), а распределение потенциала вблизи заряженной поверхности мембраны описывается уравнением (4), мы получаем следующую систему уравнений для определения плотности заряда на мембране из электрокинетических измерений:

$$\sigma = \sqrt{8kT\epsilon\epsilon_0 C} \operatorname{sh}\left(\frac{ze\phi(0)}{2kT}\right), \quad (1)$$

$$\frac{\sigma}{\sigma_{\max PS}} = \frac{1}{1 + K_{\text{Эл}} C_{\text{Эл}}(0)}, \quad (2)$$

$$C_i = C_i \exp\left(-\frac{z_i e \phi(0)}{kT}\right), \quad (3)$$

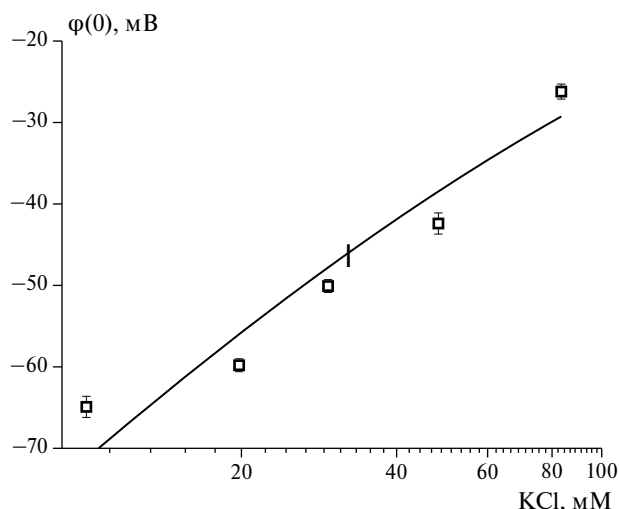
$$\operatorname{th}\left(\frac{z_i e \phi(x)}{4kT}\right) = \exp(-\kappa x) \operatorname{th}\left(\frac{z_i e \phi(0)}{4kT}\right), \quad (4)$$

где  $\sigma$  – плотность заряда на поверхности мембраны,  $\phi(0)$  – поверхностный потенциал мембраны,  $\phi(x)$  – потенциал на расстоянии  $x$  от границы раздела мембраны с раствором,  $c_i$  и  $c_i(0)$  – объемная и поверхностная концентрации ионов электро-

лита соответственно,  $\kappa = \sqrt{\frac{2e^2 C}{\epsilon\epsilon_0 kT}}$  – обратная де-

баевская длина экранирования,  $K_{\text{Эл}}$  – константа связывания ионов калия,  $\sigma_{\max PS}$  – максимальная поверхностная плотность заряда на мембране с фосфатидилсеринем,  $C_{\text{Эл}}(0)$  – поверхностная концентрация ионов калия,  $\epsilon$  и  $\epsilon_0$  – диэлектрическая проницаемость в растворе и в вакууме соответственно,  $z_i$  – валентность ионов электролита,  $e$  – заряд электрона,  $k$  – константа Больцмана,  $T$  – абсолютная температура.

О величине поверхностного потенциала мембраны можно судить по результатам электрокинетических измерений дзета-потенциала в гидродинамической плоскости скольжения. Расстояние  $x$  от плоскости Гельмгольца до плоскости скольжения, экспериментально определенное как 0.2 нм для фосфолипидных мембран, широко используется для количественного анализа электрокинетических измерений в суспензии липосом [21, 32]. Нами была экспериментально получена зависимость  $\zeta$ -потенциала от ионной силы электролита для суспензии мультислойных липосом из смеси DPhPC:DPhPS 80:20 (мол. %). Рассчитанные по уравнению (4) величины поверхностного потенциала представлены на рис. 2. По аппроксимации экспериментальных данных уравнениями (1)–(3) была найдена поверхностная плотность заряда



**Рис. 2.** Зависимость значений поверхностного потенциала липосом из смеси DPhPC:DPhPS 80:20 (мол. %) от ионной силы раствора KCl. Теоретическая кривая построена по комбинации уравнений (1)–(3).

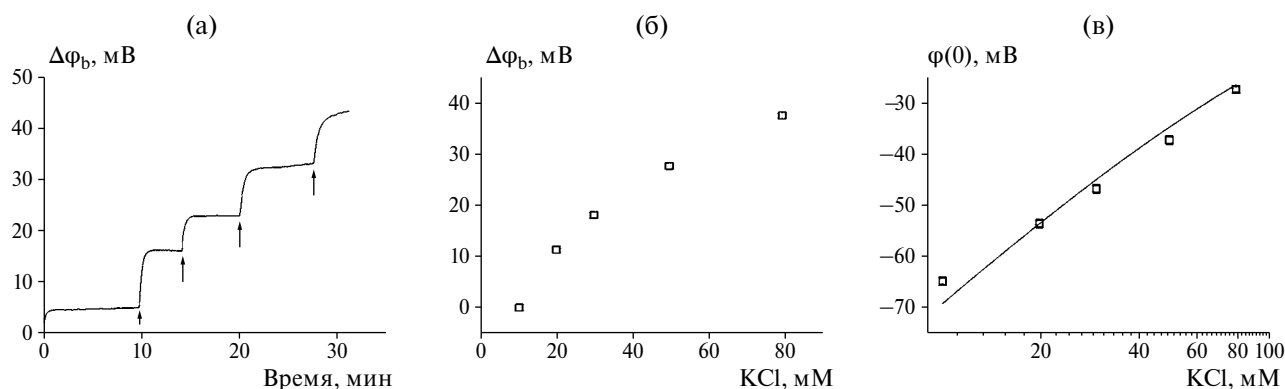
липосом ( $\sigma = -(2.5 \pm 0.2) \times 10^{-6}$  Кл/см<sup>2</sup>), а также значение константы связывания ионов калия фонового электролита ( $K_{Эл} = 1.00 \pm 0.04$  М<sup>-1</sup>). Полученные значения согласуются с литературными данными [32, 33].

Плотность заряда на мембране была определена также методом измерения разности граничных потенциалов на плоской БЛМ с этим же липидным составом. Мы формировали БЛМ на отверстиях в перегородке тefлоновой ячейки в 10 мМ растворе KCl, после чего постепенно увеличивали ионную силу электролита с одной стороны от мембраны путем последовательного добавления 1 М раствора KCl и регистрировали разность граничных потенциалов методом КВП. Зависимость изменения граничного потенциала с ростом ионной силы электролита в одном из отсеков ячей-

ки представлена на рис. 3а. Для расчета величины поверхностной плотности заряда на БЛМ эта зависимость была перестроена следующим образом. Значение граничного потенциала для каждой концентрации KCl было получено путем сложения эффектов от всех предыдущих добавок соли в этот отсек ячейки (рис. 3б). Нулевой уровень соответствовал исходному значению поверхностного потенциала (–64 мВ) в фоновом электролите (10 мМ KCl) до начала увеличения ионной силы, найденному из электрокинетических измерений. Из полученной зависимости были рассчитаны значения поверхностного потенциала на БЛМ и далее по ним определена плотность заряда на мембране (рис. 3в). Аппроксимация экспериментальной зависимости поверхностного потенциала от концентрации электролита комбинацией уравнений (1–3) дала значение  $\sigma = -(2.3 \pm 0.1) \times 10^{-6}$  Кл/см<sup>2</sup>, а константы связывания калия –  $K_{Эл} = 1.0 \pm 0.1$  М<sup>-1</sup>. На рис. 2 и 3 приведены результаты одиночного эксперимента, который был проведен независимо трижды для оценки параметров теоретической модели и их погрешности. Таким образом, результаты измерений методами КВП и электрофоретической подвижности липосом дали одинаковые (в пределах ошибки) значения для  $\sigma$  мембран из смеси фосфатидилсерина и фосфатидилхолина. Полученные нами значения поверхностной плотности заряда мембран согласуются с литературными данными для липосом, содержащих фосфатидилсерин [33–35].

#### Адсорбция Gag на бислойных липидных мембранах

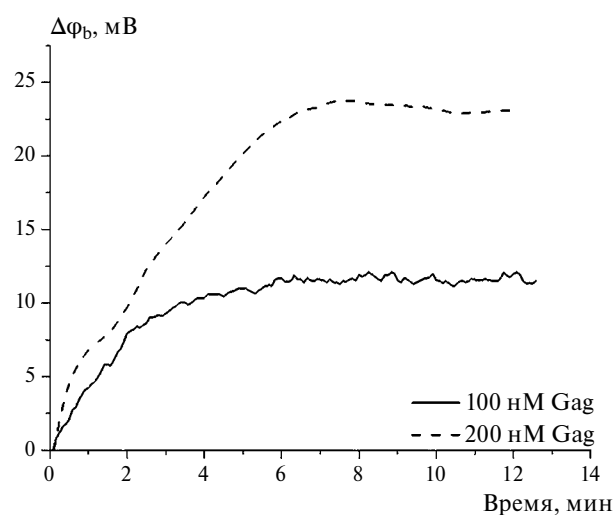
Белок Gag практически постоянно взаимодействует с липидными мембранами в цикле репродукции вируса [36]. Некоторые исследователи полагают, что это взаимодействие происходит



**Рис. 3.** Определение поверхностной плотности заряда на БЛМ из смеси DPhPC:DPhPS 80:20 (мол. %). (а) Изменение разности граничных потенциалов в результате последовательной добавки 1 М KCl в один из отсеков экспериментальной ячейки. Стрелки (слева направо) соответствуют изменению ионной силы раствора до 20, 30, 50 и 80 мМ. (б) Зависимость приращения разности граничных потенциалов на БЛМ от концентрации KCl. (в) Зависимость поверхностного потенциала на БЛМ от концентрации KCl в ячейке. Теоретическая кривая построена по уравнениям (1)–(3).

через домен МА, в результате конформационных перестроек в белке и встраивания N-концевой миристоильной группы в липидный бислой [37]. Однако изучение кинетики адсорбции полноразмерного Gag на липидных мембранах на подложке показало возможность связывания белка независимо от наличия или отсутствия миристана, причем на поверхностях, содержащих заряженные фосфолипиды, адсорбция Gag оказывалась эффективнее [18]. Этот результат подтверждает зависимость сродства белка к мембранам от электростатических взаимодействий. При этом понятно, что электростатическое притяжение не должно зависеть от наличия углеводородной цепи в структуре белковой молекулы, которая способна погружаться в липидный бислой. Чтобы ответить на вопрос о физико-химических механизмах связывания белка Gag с липидными мембранами, нами были проведены эксперименты по изучению адсорбции данного белка, лишённого миристоильной группы, на липидных мембранах различного состава. Исследование связывания Gag с липидным матриксом в суспензии мультислойных липосом оказалось затруднено необходимостью расходования большого количества белка для получения данных в широком диапазоне концентраций. Поэтому было решено далее изучать адсорбцию Gag методом КВП в системе с плоскими БЛМ, которая позволяет работать с меньшими количествами белка при аналогичном молярном соотношении белка с липидами. При разработке метода КВП достоверность полученных результатов была доказана на примере анализа адсорбции малых молекул и ионов [23, 27, 38]. В дальнейшем было показано, что он позволяет получать важные результаты и при изучении адсорбции различных макромолекул [13, 35, 39].

Так как адсорбированный белок, несущий заряд, изменяет граничный потенциал липидного монослоя, с которым он связан, трансмембранное электрическое поле также изменяется для любого асимметричного добавления белка к липидному бислою. Результирующее изменение в трансмембранном поле может быть измерено путем определения внешнего поля, которое нейтрализует асимметрию. По этому принципу метод КВП обеспечивает возможность регистрировать и кинетику процесса адсорбции белка. Добавление белка Gag на одну из сторон плоской фосфолипидной мембраны приводит к быстрому увеличению разницы граничных потенциалов ( $\Delta\phi_b$ ) на мембране с начальным наклоном, пропорциональным объемной концентрации белка (рис. 4). Это отражает кинетику адсорбции Gag на



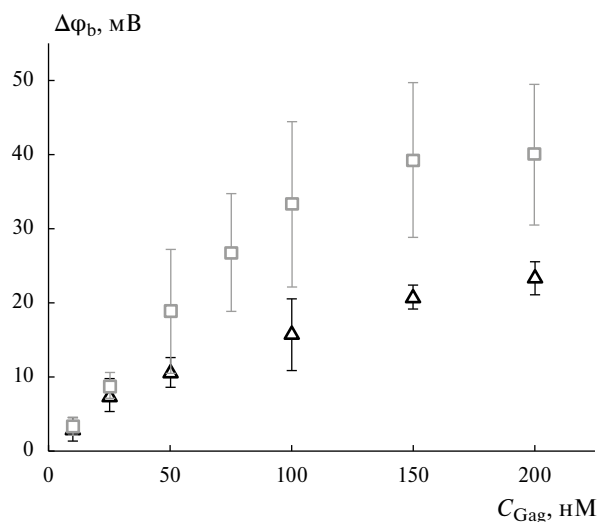
**Рис. 4.** Кинетика изменения разности граничных потенциалов на БЛМ при добавлении Gag с одной стороны мембраны в нулевой момент времени. БЛМ сформирована из DPhPC в буферном растворе 10 мМ KCl, 5 мМ HEPES, 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.2. Концентрация Gag в растворе составляла 100 нМ (сплошная кривая) и 200 нМ (пунктирная кривая).

липидном бислое с достижением стационарного уровня разности граничных потенциалов и выходом кривой на насыщение.

На основании полученных зависимостей изменения разности граничных потенциалов от объемной концентрации Gag нами были построены изотермы адсорбции (рис. 5) на заряженной и незаряженной мембранах в биологически релевантном диапазоне концентраций (до 500 нМ в цитоплазме клеток [40]). Каждая точка на графиках соответствует стационарному уровню для заданной концентрации, усредненному по 3–5 независимым сериям экспериментов. При добавке от 10 до 200 нМ Gag на одну сторону мембраны из цвиттер-ионного DPhPC разность граничных потенциалов изменялась от  $3 \pm 2$  мВ до  $23 \pm 2$  мВ (рис. 5, треугольные символы) с ростом объемной концентрации белка ( $C_{Gag}$ ). Полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности адсорбции Gag на незаряженной липидной мембране. Кроме того, положительные значения разности граничных потенциалов говорят о положительном заряде белковой молекулы на мембране. Из этого мы можем заключить, что способность Gag связываться с липидными бислоями выходит за рамки только лишь электростатического притяжения, и важную роль играют гидрофобные взаимодействия.

Внутри инфицированной клетки Gag направляется на внутренний монослой плазматической мембраны, обогащенной отрицатель-

но заряженными фосфатидилсерин и PI(4,5)P<sub>2</sub>. Принято считать, что его домен МА взаимодействует с мембраной посредством электростатических сил притяжения, с возможностью специфического белок-лигандного связывания с PI(4,5)P<sub>2</sub> [41]. На сегодняшний день хорошо изучена адсорбция полноразмерного белка Gag на липидных бислоях, содержащих PI(4,5)P<sub>2</sub> [18]. Однако электростатический характер адсорбции Gag на липидных мембранах с фосфатидилсерин, но без PI(4,5)P<sub>2</sub>, не анализировался, а есть лишь некоторые данные для отдельного домена МА [8]. При этом исследования показали, что минимум 20 мол. % PS в составе мембраны обеспечивают эффективное связывание данного домена [8]. Чтобы оценить взаимодействие Gag с мембранами, содержащими фосфатидилсерин, нами была получена изотерма адсорбции Gag на липидной мембране из смеси DPhPC:DPhPS 80:20 мол. % (рис. 5, квадратные символы). Условия экспериментов и диапазон концентраций Gag были аналогичны описанным выше для мембраны из DPhPC. Изменение разности граничных потенциалов в зависимости от концентрации Gag в растворе происходило от 3 ± 1 мВ до 40 ± 9 мВ. Полученные значения Δφ<sub>b</sub> подтверждают более эффективное связывание Gag с мембраной, содержащей анионный липид, по сравнению с незаряженным бислоем.



**Рис. 5.** Приращение разности граничных потенциалов, измеренное при адсорбции белка Gag на поверхности липидной мембраны из DPhPC (треугольники) и DPhPC:DPhPS 80:20 мол. % (квадраты) методом КВП. Каждая точка соответствует стационарному уровню разности граничных потенциалов. Диапазон концентраций Gag в растворе – от 10 до 200 нМ. Погрешность измерений получена как стандартное отклонение по 3–5 независимым экспериментам.

Для определения термодинамических констант связывания Gag с каждым из двух типов фосфолипидов полученные нами данные были проанализированы в рамках модели молекулярного связывания Ленгмюра. Она была использована ранее для описания адсорбции белка М1 вируса гриппа А в низких концентрациях [28] и, таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность анализа адсорбции белковых структур простой моделью. Изотерма адсорбции Gag на мембране из фосфатидилхолина имеет вид, описываемый уравнением (5), в котором отражено изменение величины заряда на поверхности мембраны по мере адсорбции белка.

$$\frac{\sigma}{\sigma_{\max \text{Gag}}} = \frac{1}{1 + K_{\text{PC}} C_{\text{Gag}}(0)}, \quad (5)$$

где  $K_{\text{PC}}$  – константа связывания Gag с фосфатидилхолином,  $\sigma_{\max \text{Gag}}$  – максимальная поверхностная плотность заряда, создаваемая на фосфатидилхолине адсорбированным белком,  $C_{\text{Gag}}(0)$  – поверхностная концентрация Gag.

Из экспериментов методом КВП возможно определить лишь изменение граничных потенциалов мембраны, вызванное адсорбцией белка, но не количество связанных молекул. В рамках модели Гуи–Чепмена (1) взаимосвязь поверхностного заряда и потенциала можно считать линейной, если изменение потенциала, создаваемое адсорбцией белка, меньше, чем  $kT/e$  (приблизительно 25.4 мВ). Потенциал, измеренный в наших экспериментах на DPhPC, был меньше этой величины во всем диапазоне концентраций Gag. Обоснованность линейного приближения легко вычислить. Если аргумент гиперболического синуса равен 0.5, функция превышает значение аргумента примерно на 4%. Это означает, что даже при потенциале 25.4 мВ погрешность линейного приближения не превышает 5%, а это значение находится в пределах точности измерений методом КВП. Поэтому мы предположили, что измеренные разности граничных потенциалов прямо пропорциональны количеству белка, адсорбированного на единицу площади мембраны. То есть мы можем принять  $\sigma = A \Delta \phi_b$  и  $\sigma_{\max \text{Gag}} = A \Delta \phi_{b \max \text{Gag}}$ , где  $\Delta \phi_{b \max \text{Gag}}$  соответствует полному заполнению мембраны белком, а  $A$  – некоторая константа, и для фосфатидилхолина в уравнении (5) вместо  $\sigma$  и  $\sigma_{\max \text{Gag}}$  использовать  $\Delta \phi_b$  и  $\Delta \phi_{b \max \text{Gag}}$  соответственно.

Для липидных мембран, содержащих анионные липиды, важно учесть возможность адсорбции ионов фонового электролита на центрах связывания. В уравнении Гуи–Чепмена (1) рассматривается случай симметричного



электролита. Более общая зависимость от состава раствора может быть выражена с помощью уравнения Грэма (6) [42], которое позволяет учесть присутствие в электролите нескольких типов ионов.

$$\sigma^2 = 2kT\epsilon\epsilon_0 \sum_i C_i \left[ \exp\left(-\frac{z_i e \varphi(0)}{kT}\right) - 1 \right]. \quad (6)$$

В таком случае уравнение в модели Ленгмюра при стехиометрии один адсорбат на молекулу липида приобретает вид уравнения конкурентной адсорбции (7) [43] исследуемого белка и одновалентного катиона электролита.

$$\sigma = \frac{\alpha \sigma_{\max PS} \left[ (z_{Gag} - 1) K_{PS} C_{Gag}(0) - 1 \right]}{1 + K_{Эл} C_{Эл}(0) + K_{PS} C_{Gag}(0)} + \frac{(1 - \alpha) \sigma_{\max Gag} z_{Gag} K_{PC} C_{Gag}(0)}{1 + K_{PC} C_{Gag}(0)}, \quad (7)$$

где  $\alpha$  – доля заряженного фосфолипид в мембране,  $\sigma_{\max PS}$  – максимальная поверхностная плотность заряда на мембране, полностью состоящей из отрицательно заряженного фосфатидилсерина,  $K_{PS}$  – константа связывания Gag с фосфатидилсерином,  $z_{Gag}$  – зарядовое число Gag.

Таким образом, для вычисления констант связывания белка Gag отдельно с фосфатидилхолином и фосфатидилсерином с учетом адсорбции ионов калия фонового электролита необходимо было решить систему из уравнений (3), (6) и (7). Для этого были выбраны следующие параметры. Максимальная плотность заряда (центров связывания на мембране)  $\sigma_{\max PS}$  принимается равной  $-11.5 \times 10^{-6}$  Кл/см<sup>2</sup> для 10 мМ раствора KCl из расчета, что для используемой в эксперименте мембраны с 20 мол. % DPhPS значение  $\sigma = -(2.3 \pm 0.1) \times 10^{-6}$  Кл/см<sup>2</sup>. Значение  $\sigma_{\max Gag}$  было определено как  $0.9 \times 10^{-6}$  Кл/см<sup>2</sup> по уравнению (1) в рамках приближения для малых потенциалов ( $\varphi(0) < kT/e$ ) при  $\Delta\varphi_{b\max Gag} = 37 \pm 3$  мВ. Значение константы связывания ионов калия фонового электролита принято равным 1 М<sup>-1</sup>. Поскольку зарядовое число для Gag остается неизвестным параметром, нами было рассмотрено несколько вариантов для  $z_{Gag}$  (от 1 до 3) и показано, что только при величине, равной 1, удается лучше всего описать экспериментальные данные (рис. 6). Истинные константы связывания Gag при указанных параметрах составили  $K_{PC} = 8 \times 10^6$  М<sup>-1</sup> с фосфатидилхолином и  $K_{PS} = 3 \times 10^6$  М<sup>-1</sup> с фосфатидилсерином. Полученное нами значение  $K_{PC}$  совпадает по порядку величины с результатами предыдущих исследований для полно-

размерного Gag, проведенных на плоских БЛМ методом регистрации интенсивности второй гармоники в слое адсорбированного белка [18]. Эффективная константа связывания с фосфатидилсерином  $K_{PS}^{\text{эфф}}$ , учитывающая электростатический вклад  $\exp[e\varphi(0)/kT]$ , составила  $37.2 \times 10^6$  М<sup>-1</sup>, что также хорошо согласуется с величиной константы связывания, полученной ранее для домена МА белка Gag методом рефрактометрии поверхностного плазмонного резонанса [8], однако без попытки отдельно оценить вклад электростатических взаимодействий.

Полученные значения констант связывания совпадают между собой по порядку величины, из чего мы можем заключить, что адсорбция Gag на мембране – сложный по своему характеру процесс, состоящий из комбинации электростатических и гидрофобных взаимодействий белка с липидным матриксом. При этом важно отметить, что в наших исследованиях мы использовали белок Gag, не содержащий миристанта на N-конце, но при этом наблюдали сродство белка к незаряженной мембране с высокой аффинностью. Это указывает на равносильный вклад как электростатических, так и гидрофобных взаимодействий в связывание белка с липидным матриксом, не зависящих от наличия миристоильной группы. Фактически мы можем заключить, что истинные константы взаимодействия белка Gag с липидными мембранами определяются, скорее, площадью на липидную молекулу, которые близки для фосфатидилхолина и фосфатидилсерина [33], а не каким-либо специфическим взаимодействием с фосфатидилсерином. При этом наличие заряда на липидной молекуле вносит свой вклад

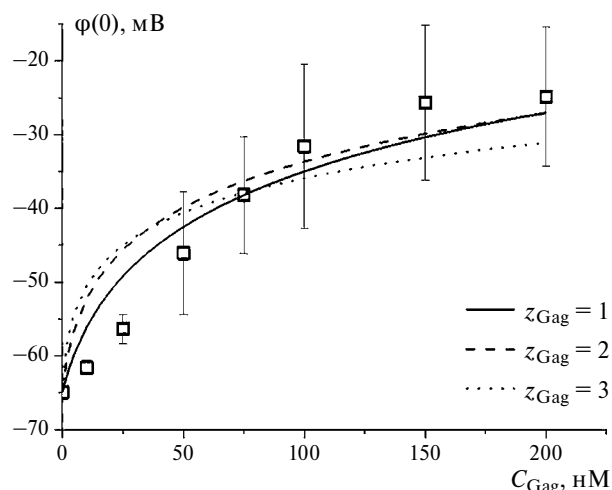


Рис. 6. Зависимость поверхностного потенциала на мембране из DPhPC:DPhPS 80:20 (мол. %) от концентрации Gag, аппроксимированная системой из уравнений (3), (6) и (7). Теоретические кривые построены для зарядового числа Gag  $z_{Gag}$  от 1 до 3.

в дополнительное электростатическое притяжение белка к мембране, увеличивая, таким образом, поверхностную концентрацию белка около отрицательно заряженной мембраны, что может быть интерпретировано как более высокая эффективная константа связывания.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полипротеин Gag является основным белком вируса иммунодефицита человека и участвует в нескольких этапах цикла репродукции вируса. Взаимодействуя с плазматической мембраной инфицированной клетки, белок Gag запускает формирование новой вирусной частицы. В данной работе мы исследовали связывание белка Gag с модельными липидными мембранами электрохимическими методами для лучшего понимания физико-химических механизмов этого взаимодействия. С помощью метода компенсации внутримембранного поля нами были получены изотермы адсорбции Gag на незаряженных и отрицательно заряженных липидных мембранах, содержащих фосфатидилсерин. Из полученных экспериментальных данных были вычислены значения констант связывания с цвиттер-ионным фосфатидилхолином и анионным фосфатидилсерином. Результаты измерения граничных потенциалов показали, что присутствие в липидном бислое 20 мол. % фосфатидилсерина усиливает взаимодействие Gag с мембраной по сравнению с незаряженным бислоем. Принципиальная возможность адсорбции Gag на нейтральных бислоях говорит о роли гидрофобных сил в белок-липидных взаимодействиях помимо специфических и электростатических. Вклад гидрофобных взаимодействий подтверждается значениями констант связывания с обоими типами фосфолипидов, которые оказались практически одинаковыми. Таким образом, связывание полипротеина Gag с липидным матриксом – сложный процесс, в котором участвуют не только электростатические силы притяжения, но также гидрофобные взаимодействия, определяемые площадью, приходящейся на липидную молекулу, а поверхностный заряд мембраны влияет лишь на изменение концентрации белка вблизи мембраны. При этом наличие миристана в структуре белка не играет решающую роль в таких взаимодействиях, как считалось ранее [3, 37].

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 20-54-14006.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы Дениева З.Г. и Макринский К.И. провели эксперименты электрохимическими методами. Все авторы участвовали в обработке данных и обсуждении результатов. Автор Батищев О.В. руководил работой. Авторы Дениева З.Г., Ермаков Ю.А. и Батищев О.В. участвовали в написании текста статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bell, N.M. and Lever, A.M., HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly, *Trends in microbiology*, 2013, vol. 21, no. 3, p. 136. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.006>
2. Freed, E., HIV-1 assembly, release and maturation, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 13, p. 484. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3490>
3. Saad, J.S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R.H., and Summers, M.F., Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly, *Proc. National Acad. Sci. United States of America*, 2006, vol. 103, no. 30, p. 11364. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602818103>
4. Mercredi, P. Y., Bucca, N., Loeliger, B., Gaines, C.R., Mehta, M., Bhargava, P., Tedbury, P.R., Charlier, L., Floquet, N., Muriaux, D., Favard, C., Sanders, C.R., Freed, E.O., Marchant, J., and Summers, M.F., Structural and Molecular Determinants of Membrane Binding by the HIV-1 Matrix Protein, *J. molecular biology*, 2006, vol. 428, no. 8, p. 1637. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.005>
5. Mammano, F., Ohagen, A., Höglund, S., and Göttinger, H.G., Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis, *J. virology*, 1994, vol. 68, no. 8, p. 4927. <https://doi.org/10.1128/JVI.68.8.4927-4936.1994>
6. Dalton, A.K., Ako-Adjei, D., Murray, P.S., Murray, D., and Vogt, V.M., Electrostatic interactions drive membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Gag MA domain, *J. virology*, 2007, vol. 81, no. 12, p. 6434. <https://doi.org/10.1128/JVI.02757-06>
7. Chukkapalli, V., Hogue, I.B., Boyko, V., Hu, W.S., and Ono, A., Interaction between the human immunodeficiency virus type 1 Gag matrix domain and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate is essential for efficient gag membrane binding, *J. virology*, 2008, vol. 82, no. 5, p. 2405. <https://doi.org/10.1128/JVI.01614-07>
8. Barros, M., Heinrich, F., Datta, S.A.K., Rein, A., Karageorgos, I., Nanda, H., and Lösche, M., Membrane Binding of HIV-1 Matrix Protein: Dependence

- on Bilayer Composition and Protein Lipidation, *J. virology*, 2016, vol. 90, no. 9, p. 4544.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02820-15>
9. Freed, E.O., HIV-1 Gag: flipped out for PI(4,5)P(2), *Proc. National Acad. Sci. United States of America*, 2006, vol. 103, no. 30, p. 11101.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0604715103>
10. Yeung, T., Heit, B., Dubuisson, J.F., Fairn, G.D., Chiu, B., Inman, R., Kapus, A., Swanson, M., and Grinstein, S., Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation, *J. cell biology*, 2009, vol. 185, no. 5, p. 917.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200903020>
11. Ermakov, Y.A., Averbakh, A.Z., Yusipovich, A.I., and Sukharev, S., Dipole potentials indicate restructuring of the membrane interface induced by gadolinium and beryllium ions, *Biophys. J.*, 2001, vol. 80, no. 4, p. 1851.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76155-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76155-3)
12. Ermakov, Y.A., Kamaraju, K., Sengupta, K., and Sukharev, S., Gadolinium ions block mechanosensitive channels by altering the packing and lateral pressure of anionic lipids, *Biophysical Journal*, 2010, vol. 98, no. 6, p. 1018.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.11.044>
13. Marukovich, N., McMurray, M., Finogenova, O., Nesterenko, A., Batishev, O., and Ermakov, Y., Interaction of Polylysines with the Surface of Lipid Membranes, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 2013, vol. 17, p. 139.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411516-3.00006-1>
14. Ермаков, Ю.А., Соколов, В.С., Акимов, С.А., Батищев, О.В. Физико-химические и электрохимические аспекты функционирования биологических мембран. *Журн. физ. химии*. 2020. Т. 94. № 3. С. 342. [Ermakov, Y.A., Sokolov, V.S., Akimov, S.A., and Batishev O.V., Physicochemical and Electrochemical Aspects of the Functioning of Biological Membranes, *Russ. J. Phys. Chem.*, 2020, vol. 94, p. 471.]  
<https://doi.org/10.1134/S0036024420030085>
15. Kempf, N., Postupalenko, V., Bora, S., Didier, P., Arntz, Y., de Rocquigny, H., and Mély, Y., The HIV-1 nucleocapsid protein recruits negatively charged lipids to ensure its optimal binding to lipid membranes, *J. virology*, 2015, vol. 89, no. 3, p. 1756.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02931-14>
16. Perez-Caballero, D., Hatzioannou, T., Martin-Serrano, J., and Bieniasz, P. D., Human immunodeficiency virus type 1 matrix inhibits and confers cooperativity on gag precursor-membrane interactions, *J. virology*, 2004, vol. 78, no. 17, p. 9560.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9560-9563.2004>
17. Ono, A., Demirov, D., and Freed, E.O., Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding, *J. virology*, 2000, vol. 74, no. 11, p. 5142.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.74.11.5142-5150.2000>
18. Tran, R.J., Lalonde, M.S., Sly, K.L., and Conboy, J.C., Mechanistic Investigation of HIV-1 Gag Association with Lipid Membranes, *J. Phys. Chem., B*, 2019, vol. 123, no. 22, p. 4673.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b02655>
19. Gui, D., Gupta, S., Xu, J., Zandi, R., Gill, S., Huang, I.C., Rao, A. L., and Mohideen, U., A novel minimal in vitro system for analyzing HIV-1 Gag-mediated budding, *J. biolog. Phys.*, 2015, vol. 41, no. 2, p. 135.  
<https://doi.org/10.1007/s10867-014-9370-z>
20. Vlach, J. and Saad, J. S., Trio engagement via plasma membrane phospholipids and the myristoyl moiety governs HIV-1 matrix binding to bilayers, *Proc. National Acad. Sci. United States of America*, 2013, vol. 110, no. 9, p. 3525.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1216655110>
21. Ермаков, Ю.А. Равновесие ионов вблизи липидных мембран – эмпирический анализ простейшей модели. *Коллоид. журн.* 2000. № 6. С. 437. [Ermakov, Yu.A., Equilibrium of ions near lipid membranes – empirical analysis of the simplest model. *Colloid Journal* (in Russian), 2000, no. 6, p. 437.]
22. Sokolov, V.S. and Kuz'min, V.G., Measurement of differences in the surface potentials of bilayer membranes according to the second harmonic of a capacitance current, *Бифизика*, 1980, vol. 25, no. 1, p. 170.
23. Ермаков, Ю.А. Первые шаги в регистрации и интерпретации граничного потенциала липидных мембран. *Биол. мембраны: Журн. мембранной и клеточной биологии*. 2022. Т. 39. № 5. С. 337. [Ermakov, Y.A., First Steps in Detection and Interpretation of the Lipid Membrane Boundary Potential, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, 2022, vol. 16, p. 261.]  
<https://doi.org/10.1134/S1990747822050051>
24. Datta, S.A. and Rein, A., Preparation of recombinant HIV-1 gag protein and assembly of virus-like particles in vitro, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2009, vol. 485, p. 197.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59745-170-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-170-3_14)
25. Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., and Wescott, W.C., Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.*, 1963, vol. 67, no. 2, p. 534.  
<https://doi.org/10.1021/j100796a529>
26. Jesorka, A. and Orwar, O., Liposomes: technologies and analytical applications, *Annual rev. analyt. chem. (Palo Alto, Calif.)*, 2008, vol. 1, p. 801.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747>
27. Ermakov, Y.A. and Sokolov, V.S., Boundary potentials of bilayer lipid membranes: methods and interpretations, *Membrane Sci. and Technol. Ser.-*, 2003, vol. 7, p. 109.  
[https://doi.org/10.1016/S0927-5193\(03\)80027-X](https://doi.org/10.1016/S0927-5193(03)80027-X)
28. Batishev, O.V., Shilova, L.A., Kachala, M.V., Tashkin, V.Y., Sokolov, V.S., Fedorova, N.V., Baratova, L.A., Knyazev, D.G., Zimmerberg, J., and Chizmadzhev, Y.A., pH-Dependent Formation and Disintegration of the Influenza A Virus Protein Scaffold To Provide Tension

- for Membrane Fusion, *J. virology*, 2015, vol. 90, no. 1, p. 575.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.01539-15>
29. Gouy, M., Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte, *J. Phys. Theor. Appl.*, 1910, vol. 9, no. 1, p. 457.  
<https://doi.org/10.1051/jphysap:019100090045700>
  30. Chapman, D.L., LI. A contribution to the theory of electrocapillarity, *London, Edinburgh, and Dublin Philosoph. Magazine and J. Sci.*, 1913, vol. 25, no. 148, p. 475.  
<https://doi.org/10.1080/14786440408634187>
  31. Amory, D.E. and Dufey, J. E., Model for the electrolytic environment and electrostatic properties of biomembranes, *J. bioenergetics and biomembranes*, 1985, vol. 17, no. 3, p. 151.  
<https://doi.org/10.1007/BF00751059>
  32. Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T., and McLaughlin, S., Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids, *Biochemistry*, 1979, vol. 18, no. 23, p. 5213.  
<https://doi.org/10.1021/bi00590a028>
  33. Ermakov, Y.A., The determination of binding site density and association constants for monovalent cation adsorption onto liposomes made from mixtures of zwitterionic and charged lipids, *Biochimica et biophysica acta*, 1990, vol. 1023, no. 1, p. 91.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90013-e](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90013-e)
  34. McLaughlin, S., The electrostatic properties of membranes, *Annual rev. biophys. and biophys. chem.*, 1989, vol. 18, p. 113.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.18.060189.000553>
  35. Князев, Д.Г., Радшхин, В.А., Соколов, В.С. Изучение межмолекулярных взаимодействий белков М1 вируса гриппа А на поверхности модельной липидной мембраны методом компенсации внутримембранного поля. *Биол. мембраны: Журн. мембранной и клеточной биологии*. 2008. Т. 25. № 6. С. 488. [Knyazev, D.G., Radyukhin, V.A., and Sokolov, V.S., Intermolecular interactions of influenza M1 proteins on the model lipid membrane surface: A study using the inner field compensation method, *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, 2009, vol. 3, p. 81.]  
<https://doi.org/10.1134/S1990747809010115>
  36. Bieniasz, P.D., The cell biology of HIV-1 virion genesis, *Cell host & microbe*, 2009, vol. 5, no. 6, p. 550.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.015>
  37. Chukkapalli, V. and Ono, A., Molecular determinants that regulate plasma membrane association of HIV-1 Gag, *J. molecular biology*, 2011, vol. 410, no. 4, p. 512.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.015>
  38. Sokolov, V.S., Sokolenko, E.A., Sokolov, A.V., Dontsov, A.E., Chizmadzhev, Yu.A., and Ostrovsky, M.A., Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes, *J. Photochem. and Photobiol. B: Biology*, 2007, vol. 86, no. 2, p. 177.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.09.006>
  39. Bähr, G., Diederich, A., Vergères, G., and Winterhalter, M., Interaction of the effector domain of MARCKS and MARCKS-related protein with lipid membranes revealed by electric potential measurements, *Biochemistry*, 1998, vol. 37, no. 46, p. 16252.  
<https://doi.org/10.1021/bi981765a>
  40. Fogarty, K.H., Berk, S., Grigsby, I.F., Chen, Y., Mansky, L.M., and Mueller, J.D., Interrelationship between cytoplasmic retroviral Gag concentration and Gag-membrane association, *J. molecular biology*, 2014, vol. 426, no. 7, p. 1611.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.025>
  41. Monje-Galvan, V. and Voth, G.A., Binding mechanism of the matrix domain of HIV-1 gag on lipid membranes, *eLife*, 2020, vol. 9, p. e58621.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.58621>
  42. GRAHAME, D.C., The electrical double layer and the theory of electrocapillarity, *Chem. Rev.*, 1947, vol. 41, no. 3, p. 441.  
<https://doi.org/10.1021/cr60130a002>
  43. McLaughlin, S., Mulrine, N., Gresalfi, T., Vaio, G., and McLaughlin, A., Adsorption of divalent cations to bilayer membranes containing phosphatidylserine, *J. general physiol.*, 1981, vol. 77, no. 4, p. 445.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.77.4.445>