

Исследование агрегации белка NEP вируса гриппа А методом химического кросслинкинга.

Научный руководитель – Друза Валерий Львович

Головки Анастасия Олеговна

Аспирант

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: nastiagolovko@mail.ru

Белок ядерного экспорта NEP вируса гриппа А участвует в одном из важнейших процессов жизненного цикла вируса - экспорте вирусного генома из ядра в цитоплазму. Ранее нами было показано, что рекомбинантный белок склонен к образованию агрегатов. Целью настоящей работы было изучение этого явления методом химического кросслинкинга - подхода, широко используемого для исследования структуры белковых комплексов.

Препараты NEP, содержащие на N- или C-конце His(6)-модуль (NEP-N и NEP-C), получали в результате продукции белков в специально созданной бактериальной экспрессионной системе с последующей аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе. Для изучения агрегации проводили эксперименты по «сшивке» (кросслинкингу) присутствующих в растворе белковых агрегатов глутаровым альдегидом - бифункциональным реагентом, взаимодействующим с ϵ -аминогруппами остатков лизина. При проведении реакции варьировали следующие параметры: концентрацию глутарового альдегида (0,001 М - 0,2 М), pH раствора, время инкубации (8-30 мин), присутствие низкомолекулярных добавок (соли аргинина, SDS и другие). Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 10-15% SDS-ПААГ. Полученные данные свидетельствуют о наличии в растворе димерных и более высокомолекулярных продуктов сшивки (составляющих до 70% от массы всего белка), что подтверждает высокую склонность белка к агрегации. В присутствии 100 мМ аргинина (деагрегирующий агент) доля олигомеров существенно уменьшается, а добавление 1% SDS полностью предотвращает образование агрегатов. Ранее в работе [1] с использованием другого бифункционального реагента этиленгликоль-бис(сукцинимидилсукцината) [EGS] было показано, что только делеционный вариант белка NEP, лишенный N-концевого домена (но не полноразмерный белок), способен к образованию димера.

Таким образом, в настоящей работе впервые методом кросслинкинга с использованием глутарового альдегида было продемонстрировано наличие высокомолекулярных агрегатов растворах белка NEP при физиологических условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 15-32-20629 и 13-04-01504).

Источники и литература

- 1) Akarsu H., Burmeister W.P., Petosa C. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). // EMBO J. 2003. N. 22(18). P. 4646–4655.