

Гетерологичная экспрессия и изучение агрегации белка NEP

Головки Анастасия Олеговна

Аспирант

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

E-mail: nastiagolovko@mail.ru

Один из важнейших белков вируса гриппа - белок ядерного экспорта NEP. Его функции изучены недостаточно. В структуре NEP различают чувствительный к протеазам N-концевой домен, а также высокоструктурированный C-концевой домен, который состоит из двух альфа-спиралей C1 и C2, соединенных коротким линкером. С целью изучения его функциональных и физико-химических свойств было осуществлено клонирование гена белка NEP, содержащего на 3'-конце модуль, кодирующий His(6), с последующей экспрессией в клетках *E. coli* и аффинным выделением белка на Ni-агарозе.

Выделенный белок склонен к быстрой агрегации. Уже через несколько часов после его выдерживания в растворе при комнатной температуре практически весь белок находился в растворе в виде крупных сферических агрегатов, что было прямо показано методом динамического светорассеяния (DLS). Было изучено влияние различных факторов на процесс агрегации: присутствие добавок (2М и 8М мочевины, 1% SDS, формамид, ацетонитрил), а также температуры раствора (60 [U+1D3C] C, 80 [U+1D3C] C и 90 [U+1D3C] C). Методом светорассеяния показано, что в рабочем буфере (20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 100 мМ имидазол) при комнатной температуре размер наблюдаемых агрегатов находился в диапазонах 40-50 нм и 460-530 нм. При повышении температуры до 90 [U+1D3C] C происходило увеличение размера агрегатов до 2270 нм. Была выявлена сложная зависимость размера агрегатов от температуры в присутствии денатурирующих агентов. В растворе 2М мочевины происходило резкое увеличение размера агрегатов (до ~4000 нм) при 60 [U+1D3C] C, затем возвращение к прежнему состоянию при 80 [U+1D3C] C. Подобная зависимость от температуры характерна для раствора с формамидом и раствора с ацетонитрилом. В случае раствора с ацетонитрилом при 80 [U+1D3C] C формировалась заметная фракция димеров белка, которая практически отсутствовала уже при 90 [U+1D3C] C. В растворе белка с 8М мочевиной эффект увеличения размера менее выражен (до ~1100 нм) при 60 [U+1D3C] C. При увеличении температуры дальнейших изменений не происходило. В растворе с 1% SDS во всем диапазоне температур наблюдалась фракция димеров белка. Небольшая доля крупных агрегатов появлялась при температуре выше 60 [U+1D3C] C. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) было показано, что помимо сферических агрегатов в растворе присутствует и небольшая доля палочкообразных амилоидоподобных наночастиц.

В дальнейшем предполагается методом сайт-специфического мутагенеза гена белка NEP с последующей экспрессией получить модифицированные белки с целью выявления участков, ответственных за агрегационные свойства.