

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Разработка нового метода химической модификации белков по остаткам аргинина

Мансурходжаев А.Ф.¹, Зацепин Т.С.²

1 - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, 2 - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

E-mail: Artem.Mansurkhodzhaev@gmail.com

Взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами (НК) являются одними из важнейших для функционирования клетки, и исследование структуры и функционирования НК-белковых комплексов является актуальной задачей. Одним из наиболее информативных методов изучения НК-белковых и белок-белковых комплексов является белковый футпринтинг с последующим определением модифицированных аминокислотных остатков методом масс-спектрометрии. Существуют эффективные методы, позволяющие селективно модифицировать остатки лизина и цистеина. Вместе с тем, не получили широкого распространения методы эффективной модификации остатков аргинина, также играющих важную роль во взаимодействии белков с НК.

В рамках данной работы был разработан метод химической модификации остатков аргинина в составе белков и продемонстрирована эффективность этого метода на примере ряда белков. В качестве реагента, способного взаимодействовать с гуанидиновой группировкой аргинина, было выбрано производное 1-фенил-1,3-дикетона, содержащее репортерную группу (родамин 6Ж). Предложенный реагент способен взаимодействовать как с остатками аргинина, так и с остатками лизина белка. Однако продукт присоединения к лизину стабилен только после восстановления цианоборгидридом натрия основания Шиффа, образующегося между кетогруппой бета-дикетона и аминогруппой белка. Если же продукты реакции дополнительно обработать гидроксиламином при pH 5, то происходит разрушение оснований Шиффа и возможна идентификация только продуктов селективного присоединения дикетона к остаткам аргинина. Отработаны условия присоединения данного реагента к различным белкам: бычьему сывороточному альбумину, лизоциму и интегразам прототипного спумавируса и ВИЧ-1. За прохождением реакции следили методом гель-электрофореза белков по Лэммли, с последующей визуализацией и количественным анализом на сканере флуоресценции PhosphorImager Turrhoon FLA 9500, а также окрашиванием белков Кумасси R250 или серебром. Было продемонстрировано, что данное производное бета-дикетона достаточно эффективно взаимодействует с белком в довольно широком диапазоне pH - от 8,0 до 10,0. Флуоресцентная визуализация позволила нам однозначно идентифицировать продукт модификации и рассчитать относительное изменение ее эффективности при варьировании условий. Кроме того было продемонстрировано, что родаминовое производное 1-фенил-1,3-дикетона модифицирует белок с эффективностью, сравнимой с существующими модифицирующими агентами, такими как N-гидроксисукцинимидный эфир карбокси-тетраметилрамидина.

Я хотел бы поблагодарить моего научного руководителя, Королёва Сергея Павловича, за оказанную им поддержку в проведении этой работы.

Конференция «Ломоносов 2014»

Работа выполнена на средства следующих грантов РФФИ: 12-04-33049-мол_а_вед
и 14-04-00833-а.