Секция «Биоинженерия»

Выявление участков, определяющих различную морфологию агрегатов белка ядерного экспорта (NEP) вируса гриппа А.

Научный руководитель – Друца Валерий Львович

Головко А.О.[1], *Толстова А.П.*[2]

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Физический факультет, Кафедра биофизики, Москва, Россия

Белок ядерного экспорта (NEP) играет важную роль в жизненном цикле вируса гриппа А. Ранее мы сконструировали бактериальную систему для высокоэффективной экспрессии и выделения рекомбинантного белка NEP и его вариантов, содержащих С- или N-концевой $(His)_6$-тэг (NEP-C и NEP-N, соответственно). При работе с растворами этих белков оказалось, что NEP быстро агрегирует в растворе.

Для определения склонных к агрегации участков в структуре белка, использованы нескольких известных компьютерных методов (TANGO, FoldAmyloid, Pasta 2.0, Waltz и т.д.). Подобные «горячие точки» агрегации находятся как в N- (аа 4-16 и 29-43) так и в С-домене белка (аа 67-82, 93-109 и 113-122). Полученные результаты указывают на возможное преобладающее влияние на процесс агрегации С-домена белка (аа 64-115), в особенности его С2 α-спирали (аа 94-115). Для того, чтобы установить возможный механизм ассоциации NEP, провели компьютерное моделирование процесса агрегации в системе, содержащей 50 молекул NEP методом молекулярной динамики в программной среде GROMACS 4.6.5. Оказалось, что образовавшиеся после первых 50 нс олигомеры белка (2-4 мономера), ассоциируют с образованием агрегатов 10-20 мономеров. Статистический анализ аминокислотных остатков, вовлеченных в образование межмолекулярных контактов коррелирует с результатами предсказания «горячих точек» агрегации.

Для подтверждения и уточнения результатов моделирования, провели конструирование мутантных вариантов белка, содержащих различные делеции N- и С-концевых участков, методом сайт-специфического мутагенеза. Влияние мутаций, а так же влияние различных внешних факторов (pH, ионная сила, температура) на агрегацию NEP изучено методами динамического рассеяния света (ДРС) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Анализ вариантов NEP методом АСМ выявил различную морфологию образующихся агрегатов: NEP-N формирует сферические агрегаты; в растворе белка NEP-C преобладают амилоидо-подобные фибриллы. Измерения ДРС показали, что растворы вариантов белка (природный NEP, NEP-N, NEP-C) содержат три фракции агрегатов с гидродинамическими радиусами 2-15 нм (фракция 1), 100 - 400 нм (фракция 2), и 2000-3000 нм (фракция 3), размер мономера белка (по данным АСМ) 1,2±0,2 нм. Вариант белка $NEP_{\Delta 64\text{-}85}$ (удалена α-спираль С1), образует укороченные фибриллы, в растворе присутствует 3 фракции агрегатов; N-домен белка или $NEP_{\Delta 94\text{-}115}$ (удалена С2) образуют небольшие сферические агрегаты. Вариант белка $NEP_{64\text{-}85}$ образует только низкомолекулярную и среднюю фракции агрегатов. Таким образом, было показано, что варианты белка NEP образуют агрегаты различной морфологии. Определяющую роль в образовании амилоидо-подобных агрегатов играет С2 α-спираль С-домена белка. Агрегаты многих вирусных белков, образующиеся в инфицированных клетках, необходимы для развития инфекции. Вероятно, что подобные агрегаты белка NEP могут выполнять определенную функцию в жизненном цикле вируса гриппа А.

Работы поддержана РФФИ, грант № 16-04-00563.