

УДК 577.112.083

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ЯДЕРНОГО ЭКСПОРТА NEP ВИРУСА ГРИППА А*

© 2017 А.О. Головки¹, О.Н. Королева^{2**}, В.Л. Друца³

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики,
119991 Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: koroleva@genebee.msu.ru

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 19.07.17

После доработки 05.09.17

Белок ядерного экспорта NEP (NS2, 14,4 кДа) вируса гриппа А играет важную роль на различных этапах развития вирусной инфекции. Для проведения всесторонних исследований структуры и функции NEP необходимо располагать высокочистыми препаратами белка. В данной работе получена серия плазмидных конструкций с геном NEP под контролем конститутивного промотора *trp*, позволяющих с высокой эффективностью экспрессировать белок NEP в клетках *Escherichia coli*. Разработан эффективный метод извлечения белка из телец включения на основе солиubilизации раствором додецилсульфата натрия. С использованием хроматографии на Ni-агарозе получены чистые препараты белка, несущие (His)₆-модули на N- или C-конце, с выходом более 20 мг на литр культуры. Методом КД продемонстрировано соответствие вторичной структуры полученных препаратов структуре природного белка NEP. Выявлена высокая склонность белка к агрегации в широком диапазоне условий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус гриппа А, белок ядерного экспорта NEP, аффинная хроматография, агрегация белков.

Вирус гриппа А является причиной острого инфекционного заболевания. Поиск мишеней в структуре вируса для создания терапевтических препаратов является чрезвычайно актуальной задачей. Такой мишенью может быть вирусный белок ядерного экспорта NEP (или NS2, 14,4 кДа, 121 а. о.), который вовлечен в целый ряд ключевых процессов, связанных с циклом размножения вируса [1, 2]. В частности, NEP играет важную регулируемую роль в транскрипции и репликации вирусной РНК, модулируя активность полимеразного комплекса [2, 3]. Кроме того, NEP участвует в экспорте вирусного генетичес-

кого материала из ядра хозяйской клетки в цитоплазму, выступая в роли посредника между комплексом вирусного рибонуклеопротеида (vRNP) с белком оболочки M1 (vRNP-M1) и рецептором ядерного экспорта CRM1 [4–7]. В литературе имеются данные о влиянии NEP также и на другие стадии жизненного цикла вируса, например, на процесс отпочковывания вирионов. При этом NEP взаимодействует с β -субъединицей F₀F₁-АТФазы [8].

В структуре NEP различают N-концевой и C-концевой домены. Последний характеризуется конформационной жесткостью и кристаллизуется в виде димера [9, 10]. В C-домеине имеются две α -спирали (C1 и C2), которые образуют антипараллельную амфифильную шпильку. Гидрофильная поверхность шпильки, участвующая во взаимодействии с белком M1, содержит а.о. Trp78, окруженный кластером остатков глутаминовой кислоты. Протеазочувствительный N-концевой участок белка конформационно подвижен [11], что, по-видимому, препятствует

Принятые сокращения: NEP – белок ядерного экспорта (nuclear export protein), IPTG – изопропил- β -D-тио-галактопиранозид; ПЦР – полимеразная цепная реакция; аминокислотный остаток – а.о.; пар нуклеотидов – п.н.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM 17-334, 00.00.2017.

** Адресат для корреспонденции.

кристаллизации полноразмерного белка. В то же время, молекулярное моделирование пространственной структуры *N*-концевого участка не исключает возможности образования в этой области двух антипараллельных α -спиралей [1, 12]. Есть данные, что *N*-концевой участок, в структуре которого выявлены два сигнала ядерного экспорта (NES), обеспечивает взаимодействие с CRM1 [6].

В настоящее время физико-химические и функциональные свойства NEP изучены не в полной мере. Для проведения исследований белка *in vitro* необходимо располагать достаточными количествами гомогенных препаратов. Выделение NEP из вирионов весьма трудоемко, требует многостадийной хроматографии и не позволяет достигать высоких выходов [4]. В подавляющем большинстве исследований широко используют рекомбинантные варианты NEP, продуцируемые в различных экспрессионных системах, как бактериальных, так и эукариотических [6, 13, 14]. Однако во многих случаях задачи исследований не требуют выделения белка в чистом виде, т.е. взаимодействие NEP с другими биомолекулами изучают непосредственно в живой клетке или путем его иммобилизации на твердой подложке [6, 7, 15–18]. Белок NEP также получали в бесклеточной системе синтеза белка [19]. Выделение рекомбинантного белка NEP в чистом виде описано лишь в нескольких работах [4, 9, 11, 14, 19]. К числу наиболее эффективных можно отнести системы на основе клеток *E. coli* BL21(DE3), где ген *NEP* находится под контролем T7-промотора. Экспрессируемый белок выделяли либо многостадийной хроматографией [11], либо аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе [9]. Данные о выходах белка, как правило, не приводят, но они не превышают 4 мг с 1 л культуры [20].

Целью настоящей работы было создание удобной высокоэффективной бактериальной системы экспрессии для получения чистых препаратов рекомбинантного белка NEP с *N*- и *C*-концевой локализацией аффинного (His)₆-модуля, а также определение некоторых физико-химических свойств этого белка.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали: Tris («Merck», Германия), IPTG («MP Biomedicals Inc.», Германия), ATP, dATP, dGTP, dCTP и dTTP («СибЭнзим», Россия), триптон, бакто-агар и дрожжевой экстракт («Difco», США), Ds-Na («Sigma», США), Ni-NTA-агароза («Invitrogen», Германия).

Препараты ферментов: полинуклеотидкиназа, ДНК-лигаза, ДНК-полимераза *Taq*SE, обратная

транскриптаза AMV, эндонуклеазы рестрикции («СибЭнзим», Россия). Энзиматические обработки ДНК проводили по прописям фирмы-производителя.

Использовали клетки *E. coli* штаммов ER1821 и BL21(DE3) («NEB», США) и плазмиды pET30a(+) («Novagen», США), pCYB4 («NEB»), pB1 [21]. Структуры синтетических олигодезоксирибонуклеотидов («Синтол», Россия) приведены в таблице. Препаративное фосфорилирование синтетических олигодезоксирибонуклеотидов проводили с помощью полинуклеотидкиназы [22].

Культивирование клеток *E. coli* осуществляли в среде dyt (16 г триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl в 1 л) с ампициллином (100 мг в 1 л) или без него. Для клонирования использовали чашки Петри с твердой агаризованной средой ЕНА (13 г триптона, 8 г NaCl, 2,4 г Na-цитрата, 1,4 г глюкозы, 100 мг ампициллина в 1 л). Приготовление компетентных клеток и трансформацию осуществляли кальциевым методом, выделение ДНК и другие генно-инженерные процедуры проводили по стандартным методикам [23].

Основные буферные растворы: буфер А – 20 мМ Hepes-Na, pH 7,2, 0,5 М NaCl, 0,05%-ный Triton X-100; ТЕ – 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 мМ ЭДТА.

Полимеразные цепные реакции (ПЦР) проводили в программируемом термостате «Цикло-Темп-107» (ЗАО «Ресурс-Прибор», Россия). Оптимальные условия для ПЦР подбирали эмпирически для каждого эксперимента. В каждом случае использовали минимальное количество циклов (8–12), в течение которых происходило накопление достаточного количества целевого продукта.

Первичные структуры плазмидных ДНК определяли на автоматическом секвенаторе «ABI PRISM 310» («Applied Biosystems», США) с использованием праймера 16-sqtl.

Анализ белковых препаратов электрофорезом в денатурирующем Ds-Na-ПААГ проводили по методу Леммли [24] с использованием 12%-ного и 15%-ного разделяющего ПААГ. Гели окрашивали Кумасси G-250.

Спектры КД измеряли на дихрографе Chirascan CD spectrometer («Applied Photophysics», Англия) в кювете толщиной 0,01 см.

Конструирование плазмид. ПЦР-поиск клонов с целевыми плазмидами. Часть клеток колонии с чашки Петри стерильной иглой переносили в пробирки объемом 0,5 мл и суспендировали в 8 мкл буфера ТЕ. Суспензию покрывали 10 мкл минерального масла, пробирку прогревали 5 мин при 98 °С, ее содержимое тщательно перемешивали.

Использованные в работе олигонуклеотиды

Обозначение	Последовательность (5'→3')
20-NSr	AATAAGCTGAAACGAGAAAG
44-NSl	ATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGACATACTGCTGAG
15-ptmt	CGGCCGCGTTGCTGG
19-ptmb	GAGATTATCAAAAAGGATC
16-sqtl	GCGGAGCCTATGGAAG
19-etl	TGAGCAATAACTAGCATAA
17-ttr	GCAAAAAACCCCTCAAG
51-chb	GAGGTGATGGTGATGGTGATGAGATCCGGGGTCAATAAGCTGAAACGAGAA
15-sqhr	TGCTCAGAGGTGATG
17-PTl	TACGACTCACTATAGGG
18-PTr	ATGTATATCTCCTTCTTA
17-Ptal	TTTGCTTTGTGAGCGGA
19-Ptar	ATGGTTAATTTCTCCTCTT
19-Ptrl	GAGCTGTTGACAATTAATC
21-Ptrr	ATGAATCGATACCCTTTTAC
50-nht	ATGCACCATCACCACCATCACTCTGGAGGCACCATGGATCCAAACACTGT

вали встряхиванием и разделяли центрифугированием. Аликвоту (1 мкл) водной фазы добавляли к реакционной ПЦР-смеси с выбранными праймерами, проводили 27–30 циклов ПЦР и анализировали продукты электрофорезом в агарозном геле. Отбирали колонии, анализ которых показал наличие (или отсутствие) ПЦР-продуктов ожидаемой величины.

Получение ПЦР-копии гена NEP (363 п.н.). кДНК с РНК вируса гриппа получали праймером 20-NSr с использованием обратной транскриптазы AMV. Продукт осаждали этанолом и затем амплифицировали фосфорилированными праймерами p20-NSr и p44-NSl, удаляя 473-звенный интрон в начале гена NEP, закодированного в РНК вируса гриппа.

Плазмида pB-NEP (ген NEP, 2064 п.н.). Линейную ПЦР-копию плазмиды pB1 (1701 п.н., оперон бета-лактамазы, ориджин репликации плазмиды pUC19, линкер с сайтами эндонуклеаз рестрикции RsrII, SexAI и BstEII), полученную с использованием праймеров 15-ptmt и 19-ptmb, лигировали с 363-звенным ПЦР-фрагментом, содержащим ген NEP, и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* ER1821. ПЦР-поиск целевых клонов проводили праймерами 44-NSl и 16-sqtl. Первичную структуру плазмиды в области вставки подтверждали секвенированием.

Плазмида pBt-NEP (ген NEP, терминатор T7, 2123 п.н.). Фрагмент ДНК с терминатором фага T7 (59 п.н.) получали ПЦР-копированием участка

плазмиды pET30a(+) праймерами p19-etl и p17-ttr. Линейную ПЦР-копию плазмиды pB-NEP получали с использованием праймеров 20-NSr и 15-ptmt. Линеаризованную плазмиду и вставку соединяли Т4-ДНК-лигазой и использовали для трансформации клеток *E. coli* ER1821. ПЦР-поиск целевых клонов осуществляли праймерами 44-NSl и 17-ttr. Первичную структуру плазмиды в области вставки подтверждали секвенированием.

Плазмида pBt-NEPh (ген NEP, C-концевой (His)₆-модуль, терминатор T7, 2156 п.н.). Встраивание C-концевого (His)₆-модуля проводили при получении линеаризованной плазмиды pBt-NEP с использованием фосфорилированных праймеров p19-etl и p51-chb. Продукт ПЦР замыкали в кольцо ДНК-лигазой и использовали для трансформации клеток *E. coli* ER1821. ПЦР-поиск целевых клонов проводили праймерами 44-NSl и 15-sqhr. Первичную структуру плазмиды в области вставки подтверждали секвенированием.

Плазмида pET7t-NEPh (ген NEP, C-концевой (His)₆-модуль, терминатор и промотор T7, 2233 п.н.). Фрагмент ДНК с промотором фага T7 (77 п.н.) получали ПЦР-копированием участка плазмиды pET30a(+) фосфорилированными праймерами p17-PTl и p18-PTr. Линейную ПЦР-копию плазмиды pBt-NEPh получали с использованием праймеров 19-ptmb и 44-NSl. Линеаризованную плазмиду и вставку соединяли Т4-ДНК-лигазой и использовали для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3). ПЦР-поиск целевых кло-

нов проводили праймерами 17-PTI и 16-sqtl. Первичную структуру плазмиды в области вставки подтверждали секвенированием.

Плазмида *Eptat-NEPh* (ген *NEP*, C-концевой $(His)_6$ -модуль, терминатор *T7*, промотор *tac*, 2249 п.н.). Фрагмент ДНК с промотором *tac* (93 п.н.) получали ПЦР копированием участка плазмиды pCYB4 фосфорилированными праймерами p17-Ptal и p19-Ptar. Линейную ПЦР-копию плазмиды pBt-NEPh получали с использованием праймеров 19-ptmb и 44-NSI. Линеаризованную плазмиду и вставку соединяли T4-ДНК-лигазой и использовали для трансформации клеток *E. coli* ER1821. ПЦР-поиск целевых клонов проводили праймерами 17-Ptal и 16-sqtl. Первичную структуру плазмиды в области вставки подтверждали секвенированием.

Плазмида *Eptrt-NEPh* (ген *NEP*, C-концевой $(His)_6$ -модуль, терминатор, промотор *trp*, 2227 п.н.). Фрагмент ДНК с промотором *trp* (71 п.н.) получали ПЦР копированием суммарной геномной ДНК *E. coli* фосфорилированными праймерами p19-Ptrl и p21-Ptrr. Линейную ПЦР-копию плазмиды pBt-NEPh получали с использованием праймеров 19-ptmb и 44-NSI. Линеаризованную плазмиду и вставку соединяли T4-ДНК-лигазой и использовали для трансформации клеток *E. coli* ER1821. ПЦР-поиск целевых клонов вели праймерами 19-ptrl и 16-sqtl. Первичную структуру плазмиды в области вставки подтверждали секвенированием.

Плазмида *Eptrt-NEP* (ген *NEP* без аффинных модулей, терминатор, промотор *trp*, 2194 п.н.). Делетирование C-концевого $(His)_6$ -модуля в плазмиде *Eptrt-NEPh* осуществляли путем получения ее линейной копии фосфорилированными праймерами p20-NSr и p19-etl, замыкания полученного ПЦР-продукта в кольцо T4-ДНК-лигазой и трансформации клеток *E. coli* ER1821. ПЦР-поиск целевых клонов проводили праймерами 19-Ptrl и 15-sqhr. Первичную структуру плазмиды в области делеции подтверждали секвенированием.

Плазмида *Eptrt-hNEP* (ген *NEP*, N-концевой $(His)_6$ -модуль, терминатор, промотор *trp*, 2227 п.н.). Встраивание N-концевого $(His)_6$ -модуля проводили при получении линеаризованной плазмиды *Eptrt-NEP* с использованием фосфорилированных праймеров p21-Ptrr и p50-nht. Продукт ПЦР замыкали в кольцо T4-ДНК-лигазой и использовали для трансформации клеток *E. coli* ER1821. ПЦР-поиск целевых клонов вели праймерами 50-nht и 16-sqtl. Первичную структуру плазмиды в области вставки подтверждали секвенированием.

Экспрессия и выделение рекомбинантных белков. Экспрессия белка *NEP-C* в клетках *E. coli*

***BL21(DE3)* с плазмидой *EpT7t-NEPh*.** К 100 мл среды dyt с ампициллином (100 мг/л) добавляли 1 мл ночной культуры клеток *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой *EpT7t-NEPh*, подращивали клетки 2 ч, интенсивно перемешивая при 37 °С, добавляли IPTG до конечной концентрации 2 мМ и растили культуру еще 16 ч при 37 °С.

Экспрессия белков *NEP-C* и *NEP-N* в клетках *E. coli* ER1821. К 100 мл среды dyt с ампициллином (100 мг/л) добавляли 0,5 мл ночной культуры клеток *E. coli* ER1821 с плазмидами *Eptrt-NEPh* или *Eptrt-hNEP* и растили культуру 18 ч интенсивно перемешивая при 37 °С.

Выделение белка *NEP-C* из цитоплазмы. Клетки осаждали центрифугированием, суспендировали в 4 мл буфера А и разрушали ультразвуком при 0 °С. Полученный клеточный гомогенат центрифугировали (15 мин, 4 °С, 8000g), к супернатанту, содержащему белок *NEP-C*, добавляли $(NH_4)_2SO_4$ до 25%-ного насыщения при 0 °С и осадок отделяли центрифугированием. К супернатанту снова добавляли $(NH_4)_2SO_4$ до 55%-ного насыщения при 0 °С и осадок, содержащий не менее 95% целевого белка *NEP-C*, отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в 0,3 мл буфера А, полученный раствор наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой объемом 0,2 мл, уравновешенную с буфером А, промывали ее буфером А (6 × 0,2 мл), а затем белок *NEP-C* элюировали с колонки буфером А с 0,3 М имидазолом (4 × 0,15 мл). К полученному раствору (0,6 мл) добавляли равный объем насыщенного при комнатной температуре раствора $(NH_4)_2SO_4$, выпавший осадок белка *NEP-C* отделяли центрифугированием и растворяли в буфере для дальнейшей работы. Аликвоту полученного препарата анализировали электрофорезом в 15%-ном Ds-Na-ПААГ. Выход оценивали по интенсивности окраски полосы *NEP-C* в сравнении с окраской полосок реперного белка (БСА).

Выделение белков *NEP-C* и *NEP-N* из телец включения. Клетки осаждали центрифугированием, суспендировали в 4 мл буфера А и разрушали ультразвуком при 0 °С. Полученный клеточный гомогенат центрифугировали (15 мин, 4 °С, 8000g) и удаляли супернатант. Клеточный дебрис, содержащий тельца включения, сформированные белком *NEP-C* (*NEP-N*), суспендировали в 0,54 мл 1%-ного водного раствора Ds-Na. Остаток клеточных компонентов, не перешедших в раствор при такой обработке, удаляли центрифугированием (5 мин, 25 °С, 12 500 g). К супернатанту добавляли 1/9 объема (60 мкл) 5 М раствора ацетата калия и удаляли нерастворимый в воде осадок Ds-K центрифугированием. К полученному супернатанту добавляли $(NH_4)_2SO_4$ до 25%-ного насыщения при 0 °С и

осадок отделяли центрифугированием. К супернатанту снова добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 55%-ного насыщения при 0 °C и осадок отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в 0,5 мл буфера А, полученный раствор наносили на 0,3 мл колонку с Ni-NTA-агарозой, уравновешенную с буфером А, промывали ее буфером А ($6 \times 0,3$ мл), а затем белок NEP-C (NEP-M) элюировали с колонки буфером А с 0,3 М имидазола ($4 \times 0,2$ мл). К полученному раствору (0,8 мл) добавляли равный объем насыщенного при комнатной температуре раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, выпавший осадок белка NEP-C (NEP-M) отделяли центрифугированием и растворяли в буфере для дальнейшей работы. Аликвоту полученного препарата анализировали электрофорезом в 15%-ном Ds-Na-ПААГ. Выход оценивали по интенсивности окраски полосы NEP-C (NEP-M) в сравнении с окраской полос реперного белка (БСА).

Кросслинкинг глутаровым альдегидом. К 6 мкг белка в 7 мкл буфера-элюата с аффинной колонки (буфер А + имидазол) добавляли 0,5 мкл раствора глутарового альдегида в ТЕ. Конечная концентрация глутарового альдегида в пробе варьировала в диапазоне 0,025–1% (2,5–100 мМ). Объем пробы доводили буфером А до 10 мкл. Смесь инкубировали при 25 °C в течение 8–20 мин и анализировали электрофорезом в 12%-ном ПААГ. Аналогично проводили контрольный кросслинкинг в присутствии Ds-Na (конечная концентрация 1%).

Получение спектров кругового дихроизма. Спектры КД белков измеряли в области 190–250 нм (дальний УФ) в кювете с длиной оптического пути 0,01 см в 100 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0, при концентрации белка 0,12 мг/мл. КД выражали в величинах молярной эллиптичности $[\Theta] = 3300 \times \Delta\epsilon$. Молярный коэффициент дихроического поглощения $\Delta\epsilon$ рассчитывали на моль аминокислотных остатков. Расчет проводили по формуле $\Delta\epsilon = \Delta D / (c \times l)$, где ΔD — измеренная величина дихроизма, c — концентрация белка в М аминокислотных остатков, l — длина оптического пути в см. Среднюю молекулярную массу аминокислотного остатка принимали равной 120,7 г/моль. Измерения проводили при 25 °C с шагом 1,0 нм и накоплением каждого шага 0,5 с. Итоговый спектр получали по результатам усреднения данных 5-ти сканирований и вычитания спектра базовой линии (контроль). Полученный спектр сглаживали, используя программное обеспечение прибора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для всестороннего исследования белка NEP необходимо иметь в руках высокоэффективную систему экспрессии и выделения как самого

белка, так и его мутантных вариантов. При разработке такой системы в настоящей работе были приняты во внимание данные литературы, из которых следует, что наилучших результатов удавалось достичь с использованием клеток *E. coli* BL21(DE3), генерирующих РНК-полимеразу (РНКП) фага Т7, в комбинации с плазмидной конструкцией, в которой ген белка находился под контролем промотора, узнаваемого Т7 РНКП [9, 11]. Нами была предпринята попытка создать аналогичную систему (рис. 1, а), позволяющую экспрессировать в клетках *E. coli* BL21(DE3) белок NEP с С-концевым $(\text{His})_6$ -модулем, обеспечивающим в дальнейшем аффинную очистку на Ni-агарозе [25]. В качестве исходной была использована короткая лабораторная плаزمида pB1 (1701 п.н., ориджин репликации pUC19, оперон β -лактамазы) [21], которая позволяет проводить быструю перестройку (мутагенез) целевого участка методом ПЦР-копирования всей плазмиды [26]. На ее основе была сконструирована экспрессионная плаزمида pET7t-NEP, содержащая промотор и терминатор РНКП фага Т7, а также ген *NEP* с прилегающим с 3'-конца участком, кодирующим С-концевой $(\text{His})_6$ -модуль (рис. 1, а). Указанные структурные элементы последовательно встраивали в плазмиду, как описано в разделе «Материалы и методы». Необходимый для клонирования фрагмент ДНК с геном *NEP* получали в два этапа: а) синтез кДНК путем обратной транскрипции соответствующей области суммарной РНК вируса гриппа А с использованием праймера 20-NSr (комплементарного 3'-концевой области гена *NEP*); б) ПЦР-копирование кДНК с одновременным удалением 473-звенного интрона в предшественнике гена NEP.

В результате индуцируемой IPTG экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET7t-NEP, целевой белок NEP-C (132 аминокислотных остатка), содержащий на С-конце дополнительный аминокислотный фрагмент DPGSHNNNNHL ($(\text{His})_6$ -модуль), оказывался как в цитоплазме (одна треть), так и в тельцах включения (две трети). Однако, вопреки ожиданиям, его суммарный выход после аффинной хроматографии на Ni-агарозе оказывался не очень высоким (не более 2 мг с литра культуры). Проблемы низкой экспрессии белков в системах на основе РНКП фага Т7 были описаны ранее [27] и связаны, скорее всего, со спецификой конкретных белков и трудностями подбора оптимальных условий индукции и наращивания клеток продуцента.

С целью увеличения выхода целевого продукта были предприняты попытки создания другой экспрессионной системы, в которой

транскрипцию гена *NEP* осуществляли бы РНК-полимеразой *E. coli*. Для этого на основе вектора EpT7t-NEPh были получены плазмидные конструкции, в которых ген *NEP* с участком, кодирующим *N*-или *C*-концевой (His)₆-модуль, находился под контролем либо IPTG-индуцируемого промотора *tac*, либо конститутивного промотора *trp* [28] (рис. 1, б, в). Уровень экспрессии белка NEP-C в клетках *E. coli* ER1821 с плазмидой Eptat-NEPh (рис. 1, б), содержащей промотор *tac*, оказывался выше, чем в случае системы с РНКП T7 (около 7 мг с литра культуры), при этом белок обнаруживали как в цитоплазме, так и в тельцах включения (рис. 2, а).

При использовании плазмиды с сильным промотором *trp* (Ep*trt*-NEPh) выход белка (NEP-C) заметно возрастал (около 17 мг с литра культуры) (рис. 2, б), причем практически весь белок NEP-C оказывался в тельцах включения.

С целью последующего изучения влияния расположения (His)₆-модуля на свойства белка NEP была сконструирована плазида Ep*trt*-hNEP (рис. 1, в), позволяющая получать белок NEP-N с *N*-концевым дополнительным фрагментом МНННННННSGGT. Продукент с этой плазмидой также давал высокие выходы белка NEP-N (более 20 мг с литра культуры). И в этом случае белок NEP-N оказывался в тельцах включения.

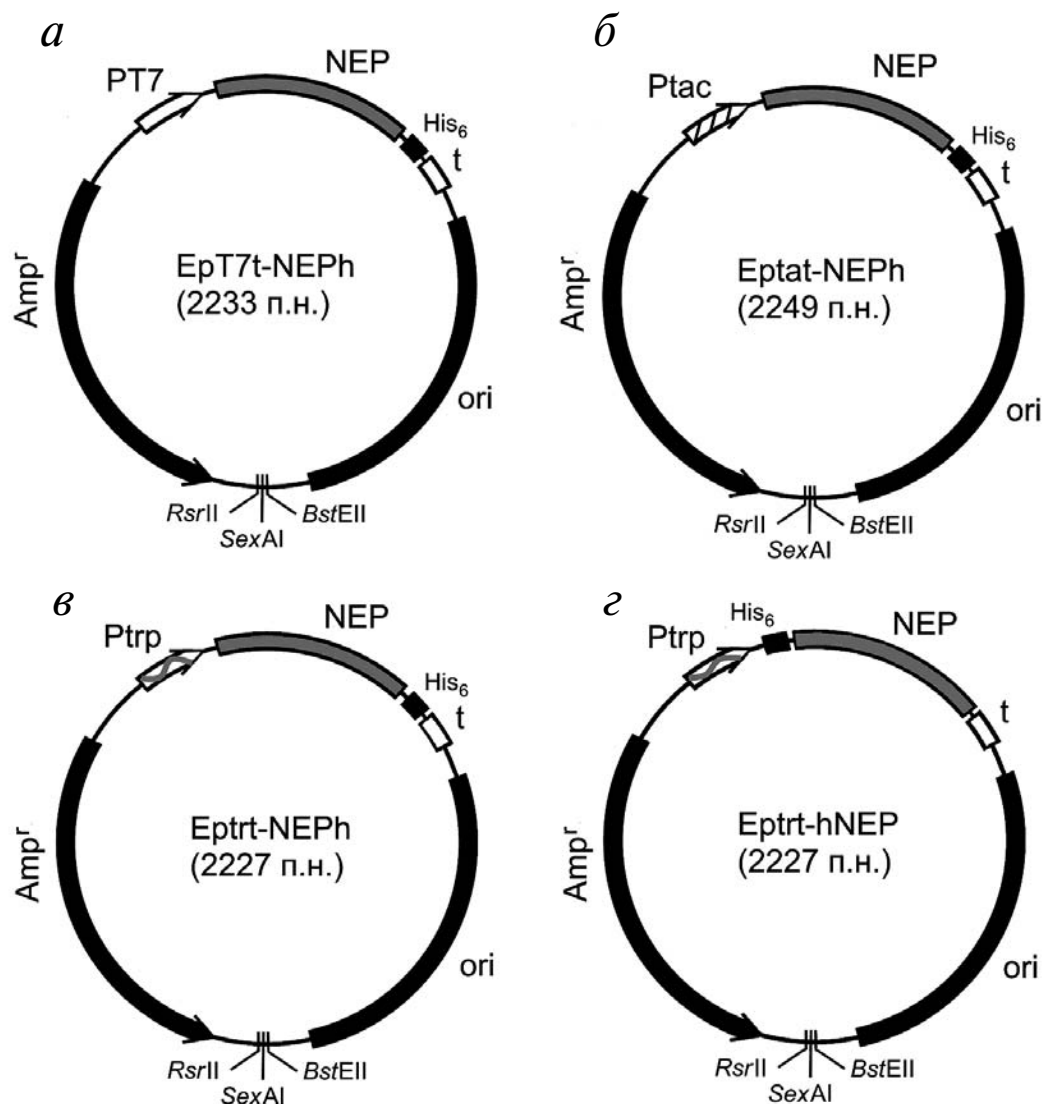


Рис. 1. Экспрессионные плазмиды, сконструированные в настоящей работе для получения препаратов белка NEP с (His)₆-модулем на *N*- или *C*-конце. Обозначения: Amp^r – ген устойчивости к ампициллину; ori – ориджин репликации плазмиды pUC19; t – T7-терминатор; PT7 – промотор РНК-полимеразы фага T7; Ptac – индуцируемый промотор *tac*, узнаваемый РНК-полимеразой *E. coli*; Ptrp – конститутивный промотор *trp*, узнаваемый РНК-полимеразой *E. coli*; His₆ – участок, кодирующий аффинный пептидный модуль DPGSHННННННL (а, б, в) или МНННННННSGGT (г)

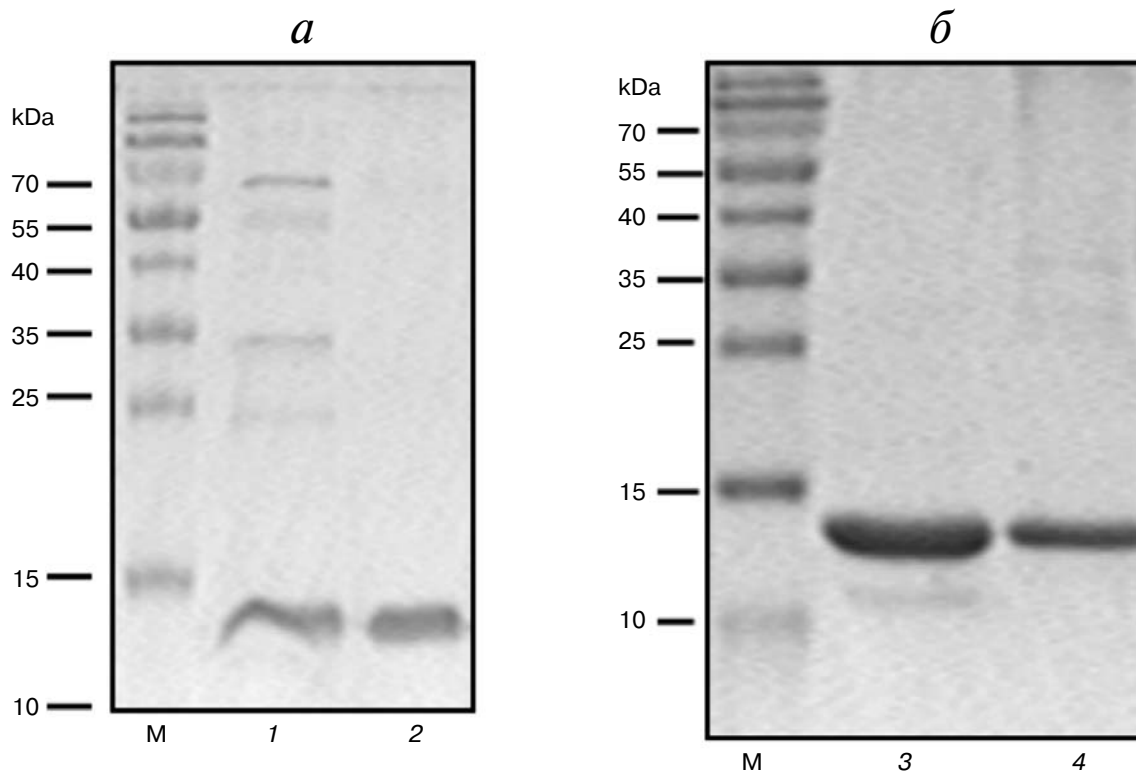


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в Ds-Na-ПААГ белковых препаратов NEP-C (дорожки 1, 2, 3) и NEP-N (дорожка 4), выделенных из клеток с плазмидами Eptat-NEPh (1, 2), Eptat-NEPh (3) и Eptat-hNEP (4). М – белковые маркеры молекулярной массы

Для извлечения белка из телец включения была разработана специальная технология. После разрушения клеток клеточный дебрис с тельцами включения осаждали центрифугированием, обрабатывали 1%-ным раствором Ds-Na и отделяли полученный раствор от нерастворимой части дебриса центрифугированием. Из полученного раствора додецилсульфат удаляли в виде нерастворимой калиевой соли путем добавления избытка ацетата калия. Целевой белок далее выделяли на Ni-NTA-агарозе. С учетом того, что белок имеет малый размер и относительно простую структуру, можно было ожидать, что при такой обработке нативная структура белка легко будет восстановлена. Электрофоретический анализ белковых препаратов NEP-N и NEP-C в Ds-Na-ПААГ приведен на рис. 2. Видно, что белки, полученные таким способом, практически гомогенны, причем оказалось, что препараты, выделенные из телец включения NEP-N и NEP-C, содержат меньше примесей, чем белок NEP-C, выделенный из цитоплазмы (рис. 2, а, б). Такое явление было ранее описано и для других белков. В последнее время разработаны даже специальные приемы, позволяющие обеспечить целенаправленный увод белка в тельца включения [29].

Для подтверждения нативной структуры белков, выделенных из телец включения, были получены и проанализированы спектры КД NEP-C и NEP-N в дальнем ультрафиолетовом диапазоне (рис. 3). Видно, что спектры белков с N- и C-концевыми (His)₆-модулями практически идентичны и хорошо коррелируют с данными литературы для NEP [11]. Они имеют отрицательные максимумы при 208/209 и 221/222 нм, характерные для спектров белков со значительной долей α -спиралей во вторичной структуре. Расчетная доля α -спиралей, оцененная методом Гринфельд–Фасмана, составляет 58% [30]. Таким образом, данные КД подтверждают наличие у белков NEP-C и NEP-N вторичной структуры, практически идентичной структуре природного NEP.

При работе с препаратами NEP-C и NEP-N было обнаружено, что оба белка весьма склонны к агрегации в широком диапазоне условий (варьировали pH, концентрацию, состав буфера, ионную силу, температуру, время выдерживания). Такое явление обнаруживали и ранее. Например, упоминалось об образовании в препаратах белка нерастворимого осадка [11], хотя природа последнего не была изучена. Для подтверждения наличия агрегатов в растворах NEP-

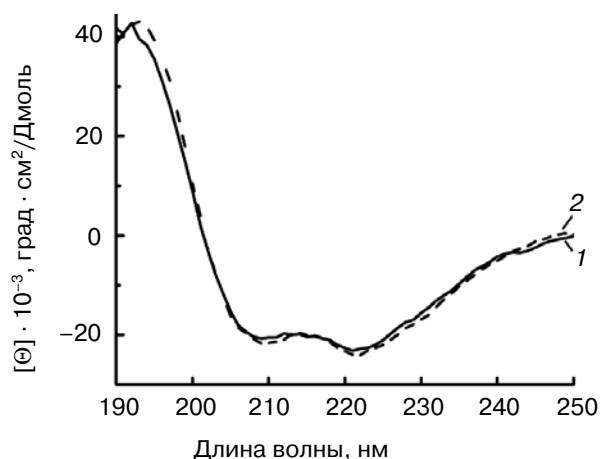


Рис. 3. Спектры КД белков NEP-C (1) и NEP-N (2), полученных в результате экспрессии в клетках *E. coli* с плазмидами Eprtrt-NEPh и Eprtrt-hNEP и выделенных из телец включения

С и NEP-N были проведены эксперименты по кросслинкингу. В качестве бифункционального реагента использовали глутаровый альдегид, который широко применяется для межмолекулярной сшивки белков в комплексах. Такой прием позволяет продемонстрировать способность белка к олигомеризации [31, 32]. Электрофоретический анализ продуктов сшивки представлен на рис. 4. Видно, что в реакционной смеси образуется заметное количество продукта по подвижности соответствующего димеру NEP (10–30%), а также некоторое количество олигомеров (рис. 4, а, б). В присутствии Ds-Na (денатурирующие условия) продукты сшивки не образуются. По данным литературы, обработка белка другим сшивающим реагентом (этиленгликоль-бис-сукцинимидилсукцинатом) не приводила к образованию продуктов межмолекулярной сшивки [9]. В то же время в тех же усло-

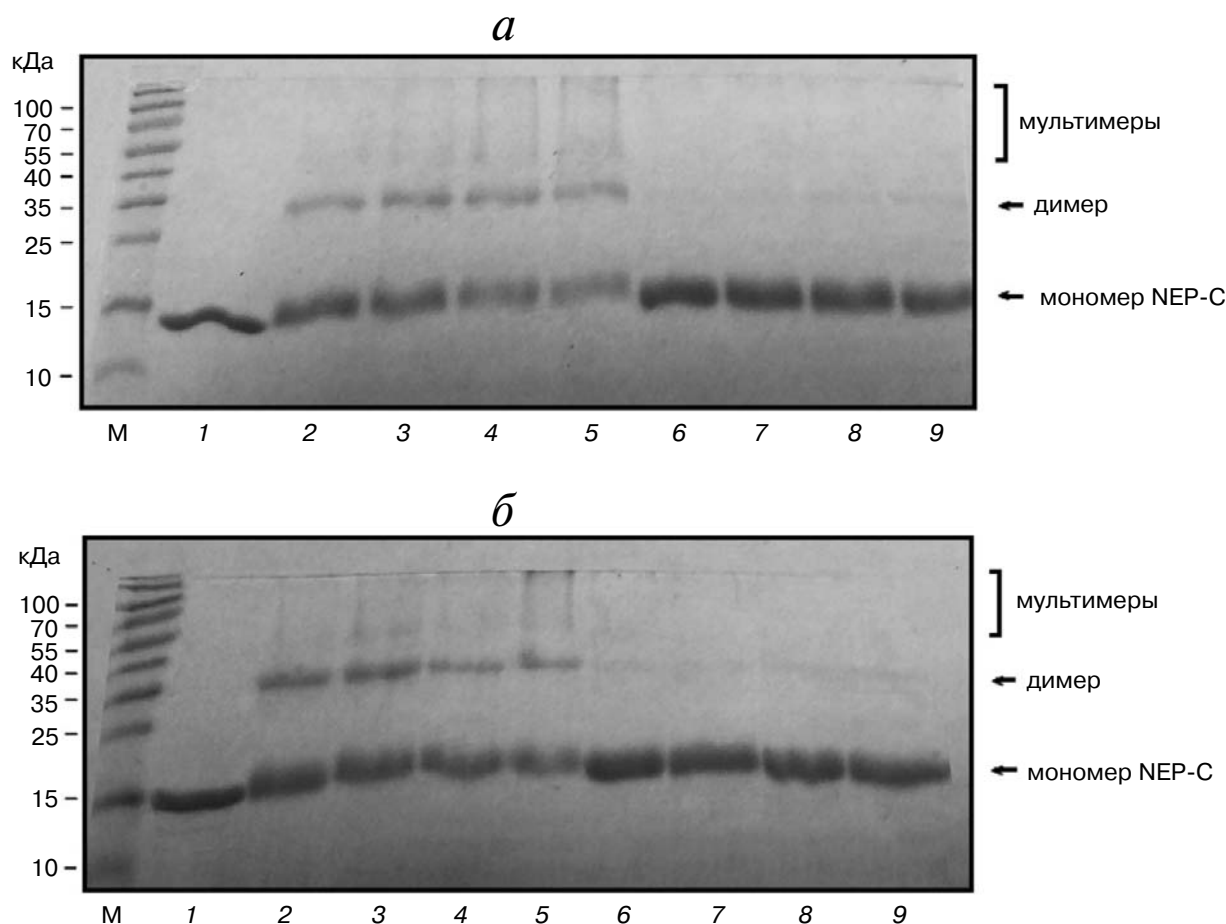


Рис. 4. Электрофоретический анализ в Ds-Na-ПААГ продуктов кросслинкинга глутаровым альдегидом белковых препаратов NEP-N (а) и NEP-C (б) (6 мкг, 40 мкМ белка) глутаровым альдегидом в присутствии 1%-ного Ds-Na (дорожки 6–9) и в его отсутствие (дорожки 2–5). Концентрация глутарового альдегида: 0,025% (2,5 мМ) (2, 6), 0,25% (25 мМ) (3, 7) и 0,5% (50 мМ) (4, 5, 8, 9), время инкубации 10 мин (2–4, 6–8) и 20 мин (5, 9). Дорожки: 1 – препараты белка в отсутствие глутарового альдегида; М – маркер молекулярной массы. Указано положение мономеров белков, их димеров и высокомолекулярных продуктов сшивки

виях делеционный вариант NEP, включающий C-концевой домен, давал заметное количество димера. Наличие продуктов сшивки в нашем случае свидетельствует о том, что структура глутарового альдегида больше соответствует расстоянию между соединяемыми функциональными группами в агрегатах белка NEP. Таким образом, нам удалось показать, что полноразмерный белок способен к самосборке с образованием олигомерных агрегатов.

Таким образом, в данной работе создана новая высокоэффективная система экспрессии белка NEP, позволяющая получать высокоочи-

щенные препараты белка с (His)₆-модулем на C-или N-конце из телец включения с выходами более 20 мг/л. Особенности созданных плазмидных конструкций делают их весьма удобными для осуществления быстрых перестроек и получения мутантных вариантов белка методом полноразмерного копирования всей плазмиды.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00563.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Darapaneni, V., Prabhaker, V.K., and Kukol, A. (2009) Large-scale analysis of influenza A virus sequences reveals potential drug target sites of non-structural proteins, *J. Gen. Virol.*, **90**, 2124–2133.
2. Manz, B., Schwemmle, M., and Brunotte, L. (2013) Adaptation of avian Influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier, *J. Virol.*, **87**, 7200–7209.
3. Odagiri, T., and Tobita, K. (1990) Mutation in NS2, a non-structural protein of influenza A virus, extragenically causes aberrant replication and expression of the PA gene and leads to generation of defective interfering particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5988–5992.
4. Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T., and Ishihama, A. (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix, *Virology*, **196**, 249–255.
5. Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Fujii, Y., and Kawaoka, Y. (2004) Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence, *J. Virol.*, **78**, 10149–10155.
6. Brunotte, L., Flies, J., and Bolte, H. (2014) The nuclear export protein of H5N1 Influenza A viruses recruits matrix 1 (M1) protein to the viral ribonucleoprotein to mediate nuclear export, *J. Biol. Chem.*, **289**, 20067–20077.
7. Watanabe, K., Shimizu, T., Noda, S., Tsukahara, F., Maru, Y., and Kobayashi, N. (2014) Nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex: Interaction of Hsc70 with viral proteins M1 and NS2, *FEBS Open Bio*, **4**, 683–688.
8. Gorai, T., Goto, H., Noda, T., Watanabe, T., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Takano, R., Neumann, G., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2012) F1Fo-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4615–4620.
9. Akarsu, H., Burmeister, W.P., Petosa, C., Petit, I., Muller, C.W., Ruigrok, R.W., and Baudin, F. (2003) Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2), *EMBO J.*, **22**, 4646–4655.
10. Akarsu, H., Iwatsuki-Horimoto, K., Noda, T., Kawakami, E., Katsura, H., Baudin, F., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (2011) Structure-based design of NS2 mutants for attenuated influenza A virus vaccines, *Virus Res.*, **155**, 240–248.
11. Lommer, B.S., and Luo, M. (2002) Structural plasticity in influenza virus protein NS2 (NEP), *J. Biol. Chem.*, **277**, 7108–7117.
12. Salahuddin, P., and Khan, A.U. (2010) Structural and functional analysis of NS1 and NS2 proteins of H1N1 subtype, *Genomics Prot. Bioinform.*, **8**, 190–199.
13. Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D.R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., and Kawaoka, Y. (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9345–9350.
14. Ward, A.C., Castelli, L.A., Lucantoni, A.C., White, J.F., Azad, A.A., and Macreadie, I.G. (1995) Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus, *Arch. Virol.*, **140**, 2067–2073.
15. Hu, Y., Liu, X., Zhang, A., Zhou, H., Liu, Z., Chen, H., and Jin, M. (2015) CHD3 facilitates vRNP nuclear export by interacting with NES1 of influenza A virus NS2, *Cell Mol. Life Sci.*, **72**, 971–982.
16. Tawaratsumida, K., Phan, V., Hrincius, E.R., High, A.A., Webby, R., Redecke, V., and Hacker, H. (2014) Quantitative proteomic analysis of the influenza A virus nonstructural proteins NS1 and NS2 during natural cell infection identifies PACT as an NS1 target protein and antiviral host factor, *J. Virol.*, **88**, 9038–9048.
17. Reuther, P., Giese, S., Gotz, V., Kilb, N., Manz, B., Brunotte, L., and Schwemmle, M. (2014) Adaptive mutations in the nuclear export protein of human-derived H5N1 strains facilitate a polymerase activity-enhancing conformation, *J. Virol.*, **88**, 263–271.
18. Shimizu, T., Takizawa, N., Watanabe, K., Nagata, K., and Kobayashi, N. (2011) Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP, *FEBS Lett.*, **585**, 41–46.
19. Inglis, S.C., Barrett, T., Brown, C.M., and Almond, J.W. (1979) The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3790–3794.
20. Greenspan, D., Krystal, M., Nakada, S., Arnheiter, H., Lyles, D.S., and Palese, P. (1985) Expression of influenza virus NS2 nonstructural protein in bacteria and localization of NS2 in infected eucaryotic cells, *J. Virol.*, **54**, 833–843.
21. Koroleva, O.N., Dubrovin, E.V., Yaminsky, I.V., and Drutsa, V.L. (2016) Effect of DNA bending on transcriptional interference in the systems of closely spaced convergent promoters, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 2086–2096.
22. Королева О.Н., Друза В.Л., Долинная Н.Г., Цыгович А.В., Шабарова З.А. (1984) ДНК-подобные дуплексы, содержащие повторы. VII. Химико-ферментативный синтез полимеров с фрагментами природных промоторов, *Мол. Биол.*, **18**, 146–160.

23. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. (1984) Молекулярное клонирование, Мир, Москва.
24. Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
25. Bornhorst, J.A. and Falke, J.J. (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags, *Methods Enzymol.*, **326**, 245–254.
26. Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M.D., Cortopassi, G., and Galas, D.J. (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6545–6551.
27. Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., and Li, Q. (2009) Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Protein Sci.*, **18**, 936–948.
28. Bass, S.H., and Yansura, D.G. (2000) Application of the *E. coli* trp promoter, *Mol. Biotechnol.*, **16**, 253–260.
29. Wang, X., Zhou, B., Hu, W., Zhao, Q., and Lin, Z. (2015) Formation of active inclusion bodies induced by hydrophobic self-assembling peptide GFIL8, *Microb. Cell Fact.*, **14**, 88.
30. Greenfield, N.J. and Fasman, G.D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry*, **8**, 4108–4116.
31. Richards, F.M., and Knowles, J.R. (1968) Glutaraldehyde as a protein cross-linkage reagent, *J Mol Biol.*, **37**, 231–233.
32. Kowalczyk, M., and Bardowski, J. (2003) Overproduction and purification of the CcpA protein from *Lactococcus lactis*, *Acta Biochim. Pol.*, **50**, 455–459.

HETEROLOGOUS EXPRESSION AND ISOLATION OF INFLUENZA A VIRUS NUCLEAR EXPORT PROTEIN NEP

A. O. Golovko¹, O. N. Koroleva^{2*}, and V. L. Drutsa³

¹ Lomonosov Moscow State University, Department
of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow,
Russia; E-mail: nastiagolovko@mail.ru

² Lomonosov Moscow State University, Chemical Faculty,
119991 Moscow, Russia; E-mail: koroleva@genebee.msu.ru

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
Lomonosov Moscow State University, 11991 Moscow,
Russia; E-mail: drutsa@genebee.msu.ru

Received July 19, 2017

Revision received September 5, 2017

Influenza A virus nuclear export protein NEP (NS2, 14.4 kDa) plays a key role in various steps of virus life cycle. Highly purified preparations of protein are required for structural and functional studies. In this study, we designed a series of *Escherichia coli* plasmid constructs for highly efficient expression of the NEP gene under the control of the constitutive *trp* promoter. An efficient method for extraction of NEP protein from inclusion bodies based on dodecyl sulfate treatment was developed. Purified preparations of NEP proteins with either N- or C-terminal (His)₆-tag were obtained using Ni-NTA-agarose affinity chromatography, with a yield of more than 20 mg per liter of culture. According to CD data, the secondary structure of the proteins corresponds quite well to that of natural NEP. A high propensity of NEP protein to aggregate over a wide range of conditions was found.

Keywords: influenza A virus, nuclear export protein NEP, affinity chromatography, protein aggregation