

Разрушение ионной связи в межсубъединичном контакте приводит к амилоидозации мутанта D368N спермоспецифичной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

Анисимова Александра -

Студент (специалист)

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

E-mail: alessandrick@gmail.com

Спермоспецифичная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDs) - это гликолитический фермент, характерный для сперматозоидов. Он прикреплен к цитоскелету жгутика сперматозоида при помощи N-концевого домена. При экспрессии в клетках *E.coli* полноразмерный белок GAPDs образует нерастворимые агрегаты, поскольку N-концевой домен препятствует нормальному сворачиванию белка. Поэтому в работе была использована рекомбинантная GAPDs с делецией аминокислотных остатков N-концевого домена (dN-GAPDs). В рамках работы по определению свойств различных мутантов dN-GAPDs у мутанта dN-GAPDs D368N была обнаружена повышенная способность к образованию нерастворимых агрегатов. Мутация D368N нарушает солевой мостик между субъединицами белка и, предположительно, усиливает гидрофобные взаимодействия. Повышенный интерес к агрегации мутанта dN-GAPDs связан с тем, что была обнаружена связь между некоторыми однонуклеотидными полиморфизмами в гене GAPDs с развитием болезни Альцгеймера с поздним началом [1]. Кроме того, белок с повышенной склонностью к агрегации представляет интерес в качестве модели для исследования амилоидозов, а также для тестирования различных соединений, предотвращающих или способствующих агрегации белков.

Целью данной работы было определить зависимость свойств агрегатов dN-GAPDs D368N от условий их образования, а также выяснить является ли их структура амилоидной.

Были получены следующие результаты:

- с помощью метода динамического светорассеяния было исследовано влияние ионной силы и разведения клеточных экстрактов на размеры агрегатов, образующихся в экстрактах клеток, вырабатывающих мутантный белок dN-GAPDs D368N. Увеличение ионной силы и уменьшение разведения приводят к увеличению размеров образующихся агрегатов;
- методами спектрофотометрии исследовано влияние pH среды и ионной силы раствора на количество и интенсивность образования агрегатов;
- методами гель-фильтрации и точечного иммуноблоттинга показано наличие в экстракте клеток агрегатов, образованных dN-GAPDs D368N и превышающих по размерам тетрамеры dN-GAPDs wt;
- показано, что агрегаты, образующиеся в растворе с высокой ионной силой, частично нерастворимы в 2% додецилсульфате натрия, что характерно для амилоидных агрегатов;
- проведен анализ структуры агрегатов dN-GAPDs D368N с тиофлавином Т. При связывании тиофлавина Т с амилоидными структурами интенсивность его флуоресценции значительно увеличивается. В данной работе показано увеличение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т при взаимодействии с dN-GAPDs D368N по сравнению с dN-GAPDs wt;

- с помощью флуоресцентной микроскопии получены изображения агрегатов dN-GAPDs D368N.

Увеличение размера и количества агрегатов dN-GAPDS D368N при увеличении ионной силы раствора свидетельствует о гидрофобном характере взаимодействий при образовании агрегатов. Образующиеся агрегаты имеют амилоидный характер.

Источники и литература

- 1) Li, Y. et al. Association of late-onset Alzheimer's disease with genetic variation in multiple members of the GAPD gene family // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004. 101. P. 15688–93