

Кордюкова Л.В.¹, Побойнев В.В.², Хрусталёв В.В.², Хрусталёва Т.А.³
Дисульфидные связи в пептиде W14

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Российская Федерация

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

³ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Подмембранный домен гемагглютинаина вируса гриппа во многом остаётся на данный момент «terra incognita»: вторичная структура его неизвестна, а о характере его взаимодействий с другими вирусными белками можно только предполагать. Точно известно, что три остатка цистеина из этого домена образуют тиоэфирные связи с молекулами жирных кислот. В качестве модели подмембранного домена можно использовать синтетический пептид с аналогичной аминокислотной последовательностью, но со свободными сульфгидрильными группами. На адекватность такой модели в экспериментах *in vitro* могут повлиять дисульфидные связи. В случае их формирования придётся признать, что более близкой к реальности моделью для дальнейших экспериментов должен быть пептид с модифицированными («закрытыми») –SH группами.

Цель исследования – проверка гипотезы о том, что синтетический пептид, соответствующий подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа, в буферном растворе образует межмолекулярные дисульфидные связи.

Материалы и методы. В качестве материала использован пептид W14 с аминокислотной последовательностью: H₂N-WMCSNGSLQCRICI-COOH, соответствующего подмембранному домену гемагглютинаина вируса гриппа H1N1, вызвавшего пандемию в 2009 году. Пептид растворяли в 0,01M фосфатном буфере при pH=7,4 и при pH=5,0. Спектры флюоресценции триптофана в присутствии и в отсутствие восстанавливающего агента (добавляли 20 мкл 0,1M ТСЕР – трис-2-карбоксиэтилфосфина – на 1 мл раствора) регистрировали в режиме снятия спектра с шагом в 1 нм на приборе SOLAR CM2203. Спектры записывали при нагревании от 22°C до 50°C, в диапазоне от 300 до 400 нм, по три спектра для каждой температуры, с шагом в 1°C, длина волны возбуждения флюоресценции – 280 нм. Оценивали изменения в интенсивности флюоресценции на максимуме, а также соот-

ношение интенсивности флюоресценции на максимуме (в районе 360 нм) и в точке второго пика (в районе 330 нм).

Результаты. Добавление восстанавливающего агента к раствору пептида W114 существенно влияет на интенсивность температурного тушения флюоресценции. Так интенсивность флюоресценции пептида W114 в 0,01М фосфатном буфере с рН=7,4 при нагревании от 22°C до 50°C снизилась до 21,5% от исходной, а в присутствии восстанавливающего агента – до уровня 46,2% от исходной. При рН=5,0 получены сходные результаты: без восстанавливающего агента интенсивность флюоресценции снизилась до 7,7% от исходной, а с восстановленными дисульфидными связями – только до 36,4%.

Во всех опытах отмечено повышение отношения максимума флюоресценции в районе 360 нм к её интенсивности в районе второго максимума (около 330 нм) по мере нагревания. Однако для пептида с дисульфидными связями этот прирост не столь высок: от 1,20 до 1,26 при рН=7,4; от 0,98 до 1,05 при рН=5,0. После восстановления дисульфидных связей разница становится несколько более существенной: от 1,32 до 1,49 при рН=7,4; от 1,10 до 1,19 при рН=5,0. Нельзя не отметить, что восстановление дисульфидных связей приводит к некоторому повышению интенсивности флюоресценции при 360 нм. При рН=7,4 интенсивность флюоресценции при 360 нм выше, чем при рН=5,0, вне зависимости от наличия дисульфидных связей.

Можно предположить, что восстановление дисульфидных связей является причиной снижения стабильности олигомеров пептида: остатки триптофана становятся более экспонированными водному окружению, связи между отдельными молекулами пептида легче разрываются по мере нагревания. Более того, при определённой температуре (45°C при рН=7,4; 30°C при рН=5,0) интенсивность флюоресценции пептида W114 с восстановленными дисульфидными связями выходит на своеобразное «плато»: интенсивность её снижения по мере нагревания резко замедляется. Подобные «температурные остановки» отсутствуют на графиках снижения интенсивности флюоресценции для пептида W114 с дисульфидными связями как при рН=7,4, так и при рН=5,0.

Выводы. Между молекулами пептида W114 в растворе действительно образуются дисульфидные связи. Остатки триптофана находятся вблизи тушителя флюоресценции – карбоксильной группы соседнего пептида. При восстановлении дисульфидных связей олигомеры легче диссоциируют, что снижает влияние карбоксильных групп на интенсивность флюоресценции.