

ВЛИЯНИЕ ДОБАВКИ С- И N-КОНЦЕВОГО ПОЛИГИСТИДИНОВОГО ТЕГА НА АГРЕГАЦИЮ БЕЛКА НЕР ВИРУСА ГРИППА А

© 2024 О.Н. Королева¹, Н.В. Кузьмина², А.П. Толстова³,
Е.В. Дубровин^{4,5*}, В.Л. Друца⁶

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия

² Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071 Москва, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: dubrovin@polly.phys.msu.ru

⁵ Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,
119049 Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.01.2024

После доработки 06.11.2024

Принята к публикации 20.11.2024

Белок ядерного экспорта (NEP) вируса гриппа А, являющийся одним из ключевых компонентов жизненного цикла вируса, может рассматриваться в качестве перспективной модели для изучения особенностей образования амилоидов вирусными белками. С помощью атомно-силовой микроскопии проведены сравнительные исследования агрегационных свойств рекомбинантных вариантов NEP, в том числе белка природной структуры, а также модифицированных вариантов с N- и C-концевыми His₆-содержащими аффинными фрагментами. Все варианты белка в физиологических условиях способны образовывать агрегаты различной морфологии: мицеллоподобные наночастицы, гибкие протофибриллы, жесткие фибриллярные агрегаты амилоидного типа и др. Присоединенный к C-концу His₆-содержащий фрагмент оказывает наибольшее влияние на кинетику агрегации и морфологию наночастиц, что свидетельствует о важной роли C-концевого домена в процессе самосборки белка. Моделирование методом молекулярной динамики не выявило существенного влияния His₆-содержащих фрагментов на структуру белка, но продемонстрировало некоторые различия в подвижности этих фрагментов, что может объяснять наблюдаемые различия в кинетике агрегации различных вариантов NEP. Рассмотрены гипотетические механизмы образования и взаимопревращения различных агрегатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус гриппа А, белок ядерного экспорта NEP, агрегация белков, полигистидин-содержащие концевые добавки, атомно-силовая микроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972524120073 EDN: IFCIAD

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа А является причиной острых респираторных заболеваний, приводящих зачастую к тяжелым осложнениям. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодное число заболеваний в мире приближается примерно к 1 млрд, из них с летальным исходом – при-

мерно 600 000–700 000 (Глобальная программа по гриппу Всемирной организации здравоохранения; <https://www.who.int/tools/flunet>). Выявление инфекционных факторов, влияющих на протекание заболевания и его тяжесть, является необходимым этапом разработки терапевтических подходов. Одним из чрезвычайно перспективных с этой точки зрения объектов в составе вируса гриппа А

Принятые сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия; МД – молекулярная динамика; NEP – белок ядерного экспорта; NEP-C и NEP-N – рекомбинантные белки NEP с (His)₆-содержащим фрагментом на C- и N-концах соответственно; RMSD – среднеквадратическое отклонение.

* Адресат для корреспонденции.

является малоизученный белок NEP (nuclear export protein – белок ядерного экспорта), который участвует в регуляции ряда важнейших процессов жизненного цикла вируса [1–5]. В предыдущих работах нами было обнаружено, что NEP склонен к самосборке в сферические агрегаты и фибрillлярные структуры амилоидного типа [6, 7]. Были высказаны предположения относительно возможной роли этого явления на различных этапах размножения вируса [6, 8].

В литературе существует обширная информация по амилоидообразованию эукариотических белков, что в большинстве случаев сопряжено с развитием различных патологий [9, 10]. В то же время данные об агрегации вирусных белков крайне немногочисленны [11]. Однако недавние исследования указывают на то, что агрегаты вирусных белков могут служить факторами инфекционности [12]. В частности, особенности протекания вирусной инфекции Covid-19 увязывают с амилоидной агрегацией ряда белков SARS-CoV-2 [13–16]. В случае вируса гриппа А известно, что по крайней мере два белка, PB1-F2 и NS1, являющиеся ключевыми факторами вирулентности и участвующие в подавлении раннего иммунного ответа клеток, проявляют высокую склонность к агрегации амилоидного типа [17–19]. Причем для PB1-F2 экспериментально установлено, что агрегаты способствуют нарушению целостности мембран митохондрий [17, 20]. Еще одним показательным примером потенциально важной роли амилоидных агрегатов может служить белок NSs вируса лихорадки Рифт-Валли, агрегаты которого обнаружены в различных компартментах клетки-хозяина как на ранних, так и на поздних стадиях развития вирусной инфекции [21]. Таким образом, изучение молекулярных механизмов агрегации NEP позволит не только получить новые данные о функционировании вирусного аппарата, но и может послужить основой для разработки стратегий целенаправленного воздействия на этот процесс в рамках поиска новых терапевтических препаратов.

Для проведения различных структурно-функциональных исследований чрезвычайно важно располагать высокочистыми препаратами белков. Широкое распространение получил метод аффинной хроматографии с использованием концевых His₆-содержащих аффинных фрагментов [22]. Однако наличие таких дополнительных коротких последовательностей (тегов) может оказывать влияние на физико-химические и биологические свойства белка, а также на его функцию [23–25]. Влияние размера, положения и типа аффинного тега на процесс агрегации белков в настоящее время изучено недостаточно, и существующие данные весьма противоречивы [24, 26, 27]. Напри-

мер, в некоторых исследованиях показано, что положение тега (*N*-концевое или *C*-концевое) может влиять на склонность белка к агрегации [24, 25, 27–29], хотя в других случаях такого эффекта не наблюдается [28, 29]. Роль размера тега также остается неопределенной: в некоторых случаях его увеличение приводит к возрастанию склонности белка к агрегации, в то время как для других белков размер тега не оказывает значительного влияния [25, 28–30]. Эти аспекты требуют дальнейшего систематического изучения для разработки единой концепции влияния аффинных тегов на агрегацию белков.

Ранее нами были получены рекомбинантные варианты NEP с His₆-тегами на *N*- и *C*-концах (NEP-N и NEP-C), а также препарат, полностью соответствующий природной структуре (аминокислотная последовательность штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)) [31]. Предварительные результаты показали склонность всех вариантов белка к агрегации [6, 7]. Целью данной работы являлось более детальное исследование влияния упомянутых концевых добавок на характер агрегации вариантов NEP с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ). Оказалось, что вариант NEP-C демонстрирует наиболее высокие агрегационные свойства, что позволяет использовать этот вариант белка как удобную модель для изучения различных аспектов амилоидообразования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и электрофоретический анализ белка. Конструирование экспрессионных систем и выделение очищенных препаратов NEP, NEP-N и NEP-C описано в работах Golovko et al. [6, 31]. Концентрированные препараты белков (6–7 мкг/мкл) хранили при 4 °C в буферном растворе, содержащем 20 мМ Нерес (рН 7,2) и 0,5 М NaCl, и использовали в дальнейшем для изучения агрегации с варьированием условий инкубации. Аликовты белковых препаратов (концентрация – ~1,5 мкг/мкл) непосредственно после выделения, а также после выдерживания при 4 °C в течение 3 мес. в буферном растворе, содержащем 20 мМ Нерес (рН 7,2) и 0,15 М NaCl, анализировали с помощью ДСН-ПААГ по методу Laemmli [32] с использованием 15%-ного разделяющего ПААГ. Гели окрашивали Кумасси G-250. В качестве белкового маркера молекулярной массы использовали PageRuler Prestained Protein Ladder («Thermo Scientific», США).

Атомно-силовая микроскопия. Для АСМ-исследования белка аликовты 5–10 мкл концентрированного раствора белка разбавляли в 10–100 раз деионизованной водой или буфером, содержащим

10 мМ Tris-HCl (рН 7,0) и 10 мМ NaCl. Разбавленный белок (10 мкл) наносили на поверхность свежесколотой слюды на 5–10 мин, после чего высушивали в потоке воздуха. ACM-исследования проводили на атомно-силовом микроскопе Nanoscope III A «Digital Instruments», США в режиме прерывистого контакта на воздухе с использованием коммерческих кантителеверов HA_NC (константы жесткости – ~11,5 и 5,3 Н/м; резонансная частота – ~254 и 152 кГц; «Типснано», Россия). Обработку изображений проводили в программе Фемтоскан (Центр перспективных технологий, Россия) [33].

Молекулярная динамика. Полноразмерная структура для природной формы NEP была предсказана с помощью программы AlphaFold2 [34]. Далее, моделирование проводили в программной среде GROMACS [35] методом молекулярной динамики (МД) в воде в присутствии 150 мМ NaCl в течение 100 нс при 300 К для получения равновесной конформации, после чего белок нагревали в течение 3 нс до 500 К методом имитации отжига. Далее, фиксировали положение остатков 64–121 и моделировали белок при 500 К в течение 20 нс. Это привело к частичному разрушению α -спиралей на N-концевых участках белка. Итоговую структуру использовали в качестве начальной для МД-моделирования в течение 200 нс. Модификации N- и C-концов проводили в графическом молекулярном редакторе. NEP-N был получен путем добавления аминокислотной последовательности МНННННСГГТ к первому остатку, а NEP-C был получен путем добавления аминокислотной последовательности DPGSHHHHHHL к последнему остатку белка NEP штамма A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (запись в UniProt: P03508) в конформации, полученной нами по описанному выше протоколу.

Далее, белки моделировали в течение 200 нс в воде в присутствии 150 мМ NaCl при температуре 300 К. Размеры ячейки составляли 729 нм³ для всех трех изоформ. Использовалось силовое поле CHARMM36 [36] и модель воды TIP3P. Продуктивная стадия моделирования проводилась в NPT-ансамбле с шагом интегрирования 2 фс. Для термостатирования использовалась модель V-rescale, для баростатирования – C-rescale. Радиусы обрезания кулоновских и ван-дер-ваальсовых сил составляли 1,2 нм.

Из траекторий продуктивного моделирования утилитой gmxsham получали ландшафты энергии Гиббса относительно первой и второй главных компонент. Из полученного ландшафта для каждой траектории извлекали все конформации, для которых энергия Гиббса имела минимальное значение. Репрезентативные структуры получали с помощью кластеризации по алгоритму DBSCAN.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения рекомбинантных вариантов полноразмерного белка NEP (121 а.о., 14 500 Да) как природной структуры, так и содержащих аффинные His₆-теги, NEP-N (МНННННСГГТ на N-конце) и NEP-C (DPGSHHHHHHL на C-конце) (рис. 1, а), были использованы бактериальные экспрессионные системы, описанные ранее [31]. Чистота полученных препаратов, а также их склонность к агрегации были продемонстрированы электрофорезом в 15%-ном ДСН-ПААГ. На рис. 1, б показан анализ белковых растворов непосредственно после выделения (дорожки 1–3), а также после инкубации в течение 3 мес. при 4 °C (дорожки 4–6). Во всех случаях наблюдается накопление устойчивых к ДСН агрегатов, причем для NEP-C это накопление заметно выше, чем для других двух препаратов. Известно, что таким свойством – устойчивостью к ДСН – обладают агрегаты амилоидного типа. Также следует отметить, что заметной деградации самих мономеров не наблюдается даже при длительной инкубации.

В настоящее время ведутся всесторонние исследования различных аспектов амилоидообразования как *in vitro*, так и *in vivo* с использованием широкого арсенала физико-химических методов, генно-инженерных, молекулярно-биологических, микробиологических и клеточных технологий [37, 38]. Одним из наиболее плодотворных подходов к изучению агрегации белков *in vitro* является атомно-силовая микроскопия, которая позволяет не только визуализировать объекты в нанометровом диапазоне, изучать морфологию и взаимопревращение наночастиц, но и получать количественные данные о ходе того или иного процесса (оценивать эффективность процесса, кинетику накопления продуктов, и т.д.) [39]. В связи с этим метод ACM был выбран в качестве основного для изучения особенностей агрегации в исследуемой системе.

На рис. 2–4 приведены ACM-изображения наночастиц, присутствующих в растворах NEP, NEP-N и NEP-C. Во всех случаях наблюдается гетерогенная смесь мономеров и более крупных частиц с различной морфологией. При этом в случае всех трех вариантов белка NEP наблюдаются заметные различия в скорости агрегации, в морфологии и размерах наночастиц, а также в соотношении образующихся продуктов.

Агрегация белка природной структуры NEP происходит относительно медленно с формированием различных по морфологии агрегатов, предположительно, по такому пути. В первые сутки преобладают мономеры, а также малые олигомеры (рис. 2, а и б) высотой до ~10 нм (рис. 2, ж), которые в результате «слипания» формируют

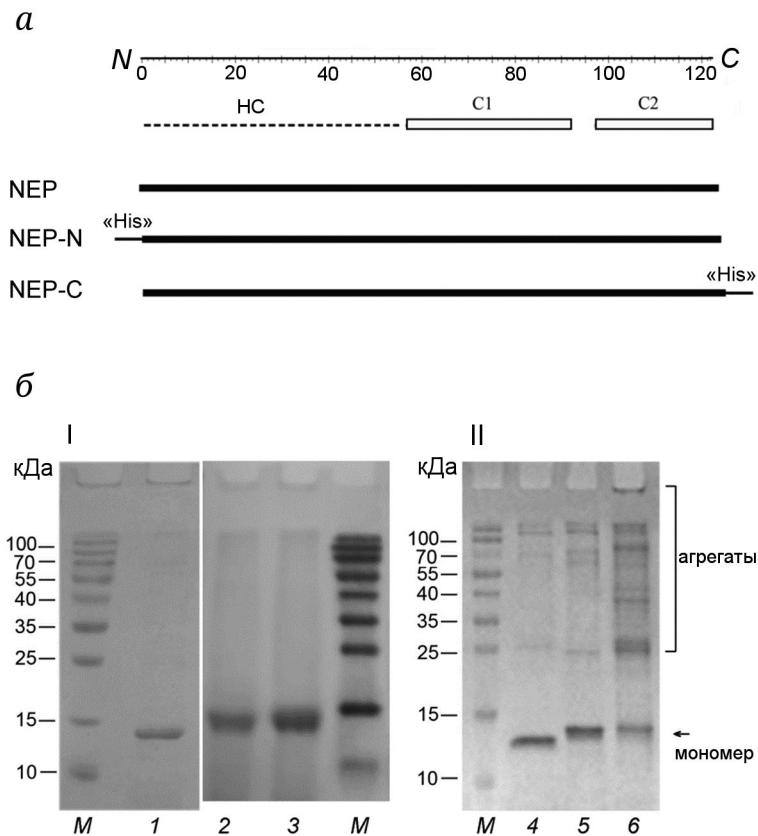


Рис. 1. Рекомбинантные варианты белка NEP, исследованные в работе. *а* – Схематическое изображение. В структуре белков прямоугольниками отмечены а-спирали C1 и C2 (по данным рентгеноструктурного анализа C-концевого фрагмента NEP [24]), пунктирной линией – неструктурированная область (НС), надписями «His» – полигистидин-содержащие аффинные теги МННННННССГГТ (для NEP-N) и DPGSHННННННЛ (для NEP-C). *б* – Электрофоретический анализ в 15%-ном ДСН-ПААГ свежевыделенных (I) и после выдерживания в течение 3 мес. (II) при 4 °С препаратов NEP (дорожки 1 и 4), NEP-N (дорожки 2 и 5) и NEP-C (дорожки 3 и 6); *М* – белковые маркеры молекулярной массы

агрегаты зернистой структуры (рис. 2, *в* и *г*). Последние могут принимать разнообразные формы: сферические (так называемые «фрамбидные»; рис. 2, *в*), короткие вытянутые (фибриллярные) с неравномерной структурой (рис. 2, *в* и *г*), кольцевые (рис. 2, *г*). Помимо этого, постепенно в результате слияния зернистых структур образуются «гладкие» мицеллоподобные агрегаты диаметром от 15–40 нм (рис. 2, *б*) до 50–60 нм (рис. 2, *д*), а также жесткие фибриллярные структуры амилоидного типа (рис. 2, *е*).

Значительная агрегация NEP-N наблюдается уже в первые сутки после выделения препарата (рис. 3, *а* и *б*). В смеси присутствует большое количество глобулярных частиц различного размера, высота которых варьирует от 1 нм, что соответствует мономерам белка, до 50 нм (рис. 3, *г*), что соответствует крупным агрегатам. Промежуточные по размерам частицы представляют собой различные мультимеры белка, причем часть из них образует зернистые структуры (конгломераты; рис. 3, *а*). Присутствует значительное количество вытянутых фибриллярных структур

(типа «бусы на нити» [40]), состоящих из слипшихся олигомеров с высотой «бусин» около 5,5–6 нм (рис. 3, *б*). Кроме того, в растворе накапливаются также жесткие равномерные палочкообразные фибриллы длиной до 1 мкм и высотой ~5 нм (рис. 3, *в*). Таким образом, наличие His₆-содержащего фрагмента на N-конце, по всей видимости, меняет кинетику агрегации NEP, но при этом формируются весьма сходные по структуре наночастицы: мультимеры, зернистые структуры, крупные сферические агрегаты, червеобразные и палочкообразные фибриллы.

Агрегация NEP-C протекает с заметно более высокой эффективностью, чем в случае других вариантов белка: в растворе уже в течение первых часов после выделения образуются в большом количестве крупные мицеллоподобные агрегаты (фракции с диаметром 10–30 нм; рис. 4, *а* и *д*), которые затем в течение 12–24 ч трансформируются в гибкие червеобразные фибриллы с морфологией «бусы на нити» длиной до 500 нм. При этом высота бусин (2,5–3,5 нм; рис. 4, *б*) меньше, чем в случае NEP-N (рис. 3, *б*).

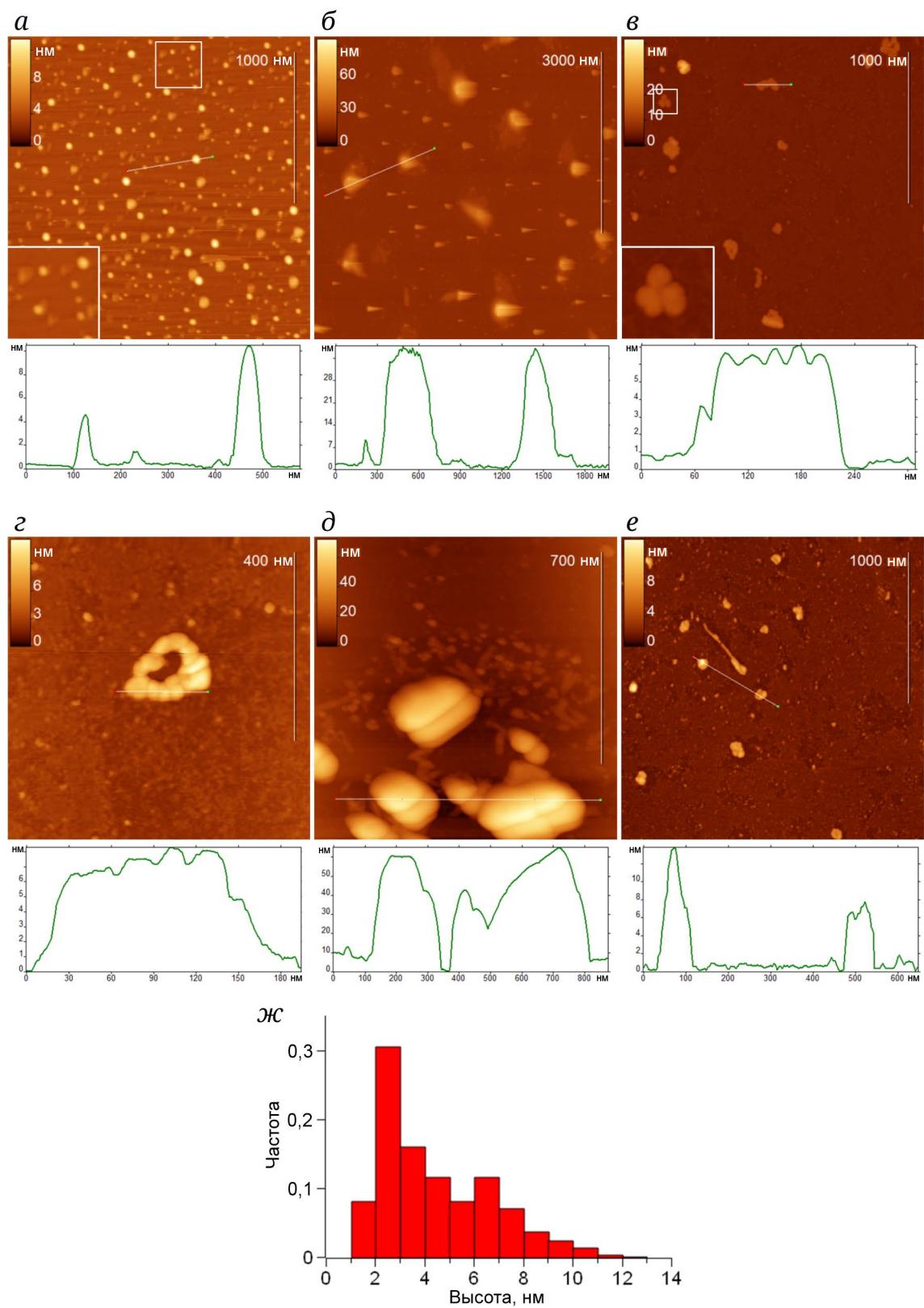


Рис. 2. АСМ-изображения природного белка NEP и его агрегатов. *а* и *б* – Срок хранения препарата после выделения составляет несколько часов (т.е. исследованы в день выделения). *в–е* – Срок хранения препарата после выделения составляет 5 мес. *д* – Присутствует эффект двоения изображения. Снизу приведены профили поверхности вдоль линий на соответствующих АСМ-изображениях. Вставки на панелях (*а*) и (*е*) представляют собой увеличенные области поверхности, выделенные квадратом (размер вставок 300×300 и 150×150 нм^2 для (*а*) и (*е*) соответственно). *жс* – Гистограмма распределения высот объектов на панели (*а*)

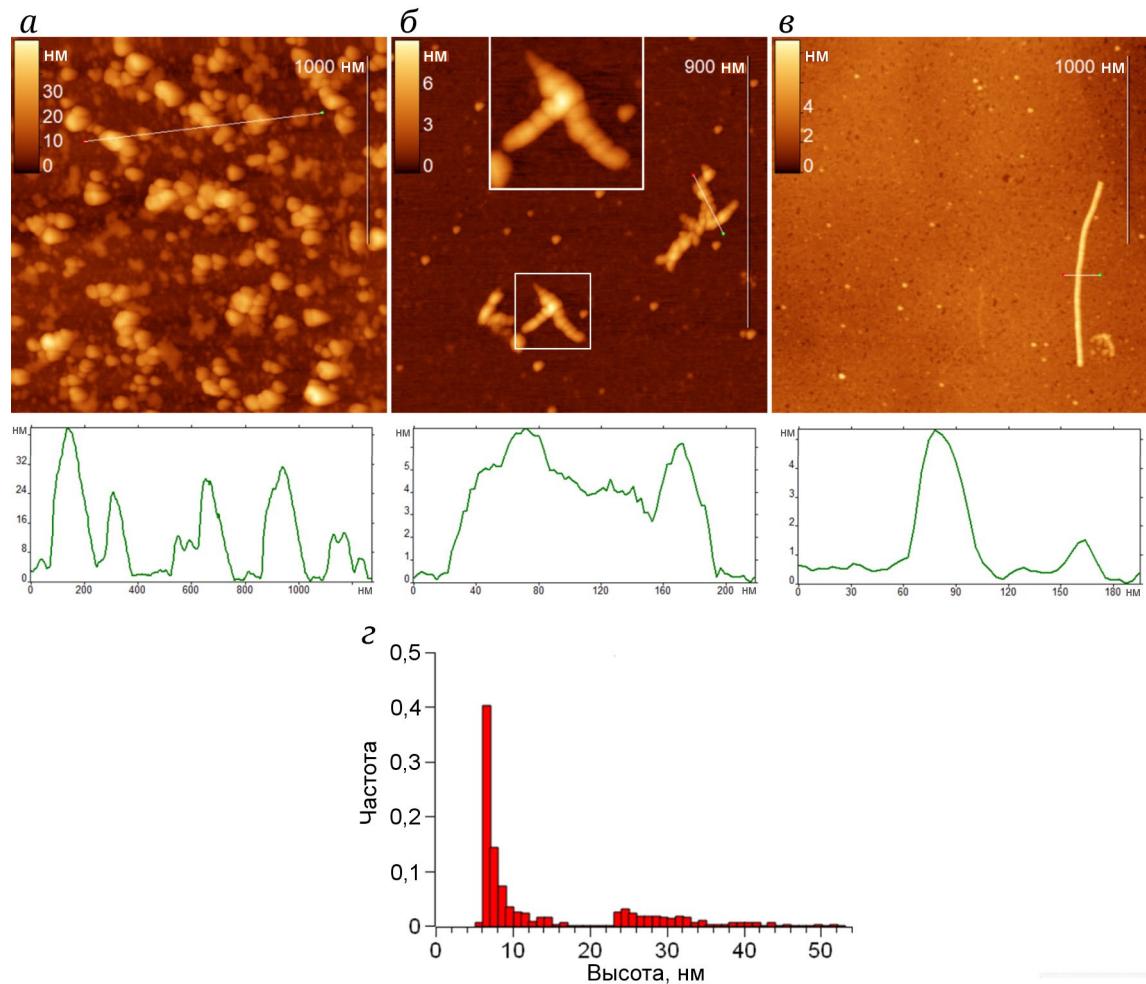


Рис. 3. ACM-изображения белка NEP-N и его агрегатов. Срок хранения препарата после выделения составлял 1 день (а и б) и 10 дней (в). Снизу приведены профили поверхности вдоль линий на соответствующих ACM-изображениях. Вставка на панели (б) представляет собой увеличенную область поверхности, выделенную квадратом (размер вставки $250 \times 250 \text{ нм}^2$). г – Гистограмма распределения высот объектов на панели (а)

Многочисленные ACM-изображения соединенных с фибриллами мицелл предполагают, что именно мицеллы генерируют фибриллы, причем наблюдаются также разветвленные структуры, т.е. когда несколько фибрилл соединены с одной мицеллой (рис. 4, б). В одной и той же смеси можно различить фибриллы с мицеллами, а также свободные фибриллы разной длины, что может свидетельствовать о протекании последовательных стадий образования фибрилл: зарождение короткого отростка, рост фибриллы, отдельно лежащие фибриллы (рис. 4, б и в). Подобные процессы были замечены и для других амилоидогенных белков, включая такие, как пептид бета-амилоид (A β), α -синуклеин, прион PrP мыши, транс-тиреин и др. [41–44]. На более поздних стадиях наблюдается присутствие палочкообразных агрегатов (рис. 4, г).

Полученные результаты схематично проиллюстрированы на рис. 5. Можно утверждать, что

на начальных этапах во всех случаях в растворах, помимо мономеров, наблюдаются малые олигомеры (от 2–3 до 10 нм). По мере дальнейшего выдерживания препаратов при 8–20 °C (период наблюдения составлял от 1 до 150 суток) накапливаются фракции более крупных агрегатов, имеющих сферическую форму, а также вытянутые фибриллярные структуры. Последние представлены по крайней мере двумя морфологическими типами: гибкие фибриллы (протофибриллы), а также более жесткие палочкообразные структуры (высотой ~5 нм), соответствующие по морфологии зрелым амилоидам [45, 46].

При анализе сходства и различий в характере агрегации исследуемых белков необходимо учитывать особенности структуры белка, а также возможные механизмы формирования различных агрегатов.

Особенности структуры белка NEP. Согласно данным литературы, в молекуле NEP различают

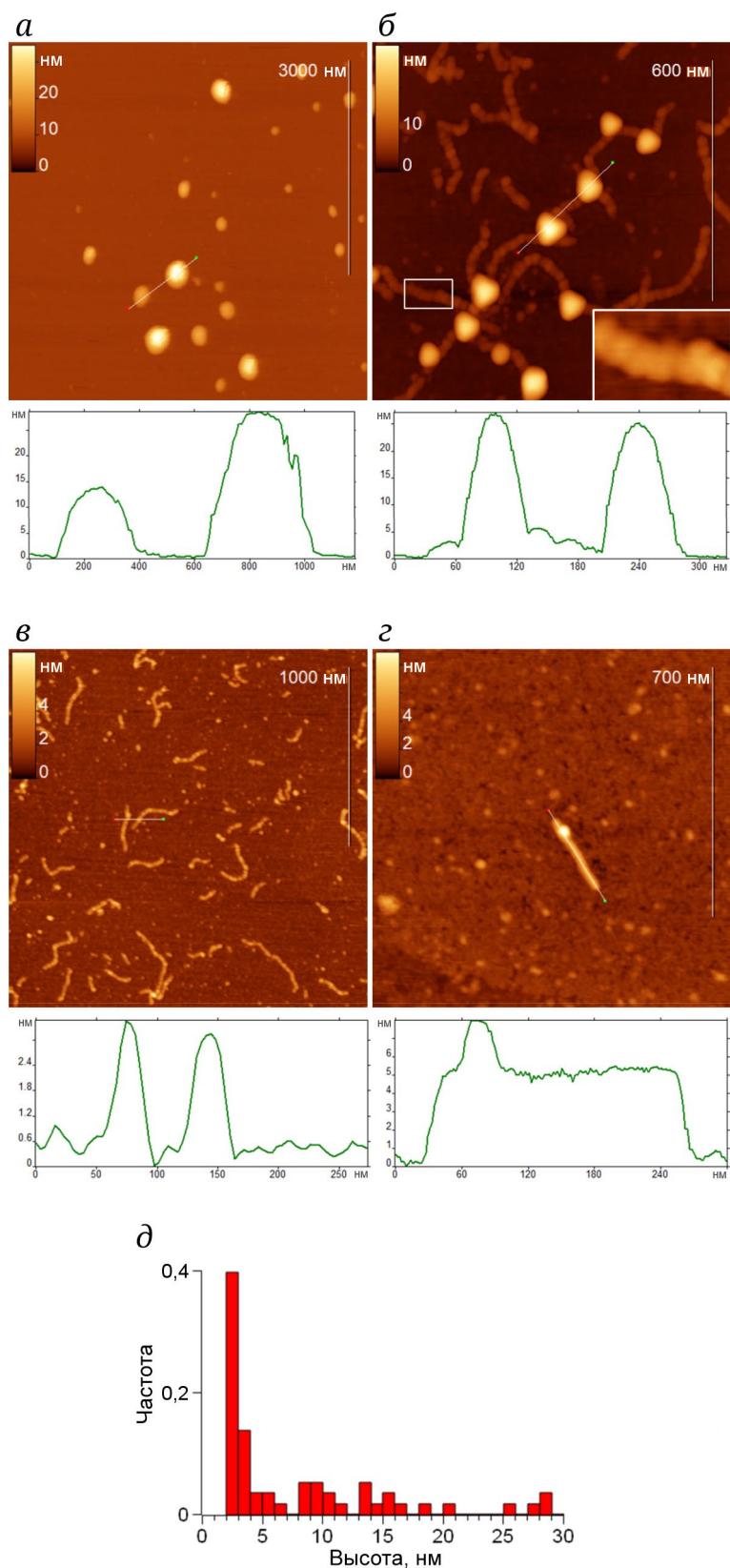


Рис. 4. АСМ-изображения белка NEP-C и его агрегатов. Срок хранения препарата после выделения составлял 1 день (а), 8 дней (б и в) и 14 дней (г). Снизу приведены профили поверхности вдоль линий на соответствующих АСМ-изображениях. Вставка на панели (б) представляет собой увеличенную область поверхности, выделенную квадратом (размер вставки $65 \times 100 \text{ нм}^2$). д – Гистограмма распределения высот объектов на панели (а)

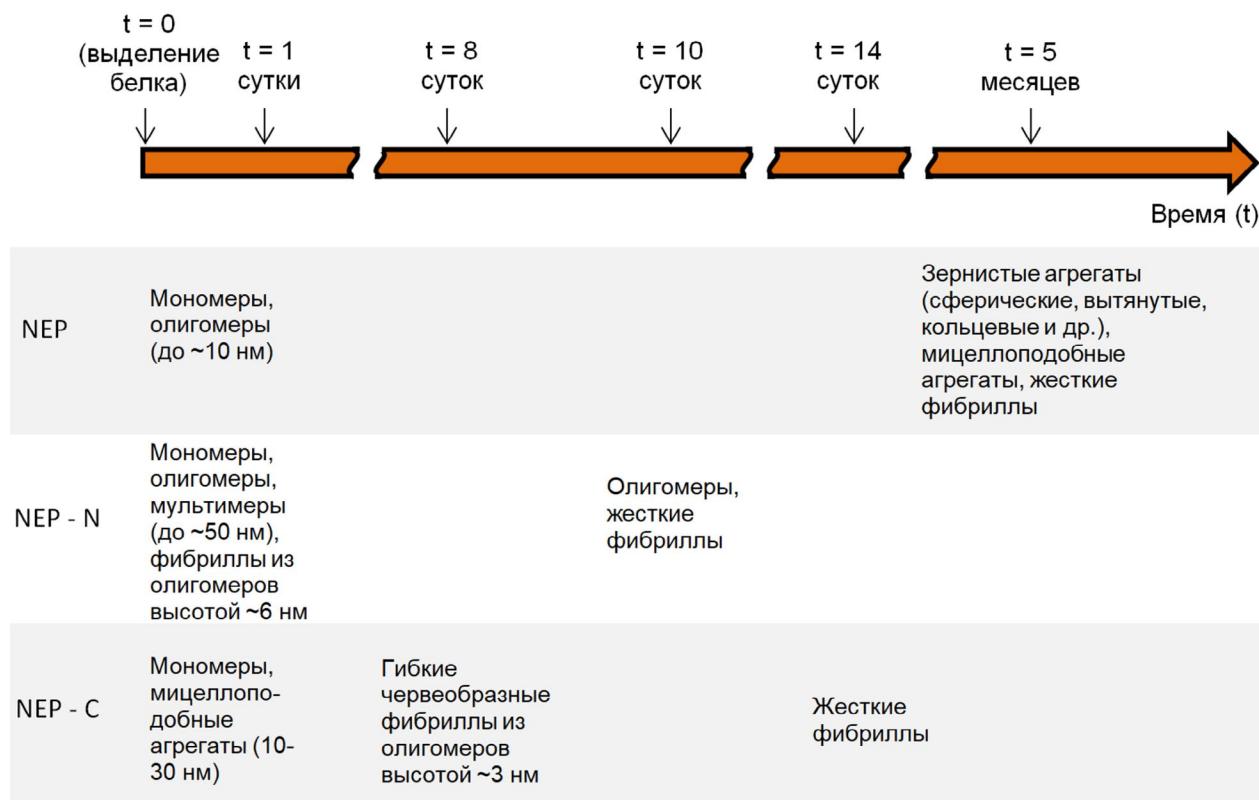


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая формирование различных агрегатов трех вариантов белка NEP с течением времени

протяженную неструктурированную *N*-концевую область и высокоструктурированный *C*-концевой домен, включающий амфифильную шпильку из двух антипараллельных α -спиралей: C1 (обогащена гидрофильными а.о.) и C2 (обогащена гидрофобными а.о.) [47] (рис. 1, *a*). Такая структура типична для большинства агрегирующих белков [38]. Кроме того, важным фактором образования амилоидных фибрилл является наличие так называемых амилоидогенных участков, обогащенных гидрофобными аминокислотными остатками [48]. Биоинформационический анализ последовательности NEP, проведенный нами ранее, показал, что наиболее амилоидогенной областью является *C*-концевая α -спираль, включающая высокогидрофобный участок 95–121 а.о. [7]. Таким образом, белок NEP обладает набором характерных структурных элементов, способствующих образованию структурированных агрегатов различной морфологии [49].

Для изучения влияния концевых His₆-содержащих фрагментов на стабильность структуры белковых мономеров и их агрегационные свойства было предпринято компьютерное моделирование методом МД поведения трех исследуемых в настоящей работе вариантов белка: NEP (121 а.о.), NEP-N (132 а.о.) и NEP-C (132 а.о.). Как упоминалось ранее, в литературе имеются данные рентгеноструктурного анализа только для *C*-концевого

домена белка NEP (PDB ID: 1PD3) [7], 63–116 а.о. Отсутствие таких данных для неупорядоченной *N*-концевой области не исключает возможности ее фолдинга при определенных условиях. Следует отметить, что ранее [6] нами уже были предприняты попытки смоделировать самосборку вариантов белка NEP. В частности, с использованием программы TASSER была реконструирована структура мономеров и продемонстрирована возможность образования коротких олигомеров-кластеров во всех случаях. При этом строгой закономерности в формировании кластеров не наблюдалось.

Современные достижения в области молекулярного моделирования, включая методы искусственного интеллекта, позволяют с гораздо большей степенью достоверности реконструировать структуру неупорядоченных областей. Примеры таких реконструкций имеются в литературе для ряда белков, таких как α -синуклеин, тау и TDP-43 [50, 51]. В данной работе мы применили подобные подходы для предсказания структуры недостающей части белка NEP с помощью программы AlphaFold2, которая решает задачи реконструкции пространственного фолдинга на основе первичной структуры [34, 52]. Предсказанная таким образом структура NEP представляет собой 4 попарно параллельных α -спирали, включающие остатки 8–21, 29–49, 55–86, 94–119 (рис. 6, *a*).

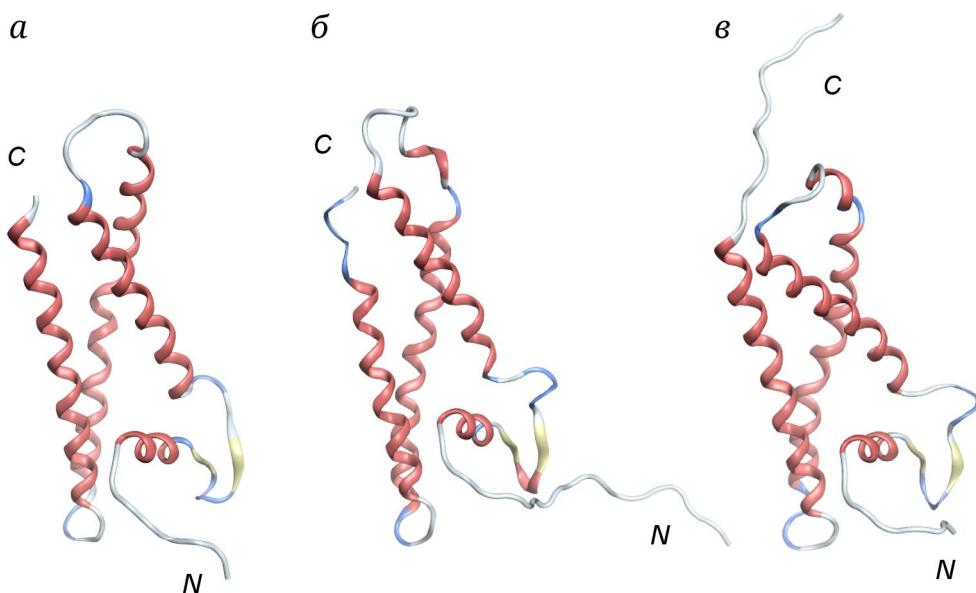


Рис. 6. Репрезентативные трехмерные структуры молекул NEP (a), NEP-N (б) и NEP-C (в), полученные в результате моделирования (200 нс) методом МД. Указано положение N- и C-концевых областей

Поскольку такая укладка противоречит экспериментальным данным, свидетельствующим о неупорядоченности структуры N-концевой части NEP, была предпринята попытка разрушить вторичную структуру в той части белка, которая соответствует неупорядоченному домену (1–63 а.о.). Для этого повышали температуру системы до 500 К, а затем проводили моделирование при этой температуре в течение 20 нс, зафиксировав координаты упорядоченной части (64–121 а.о.). Оказалось, что, в целом, α -спирали в области 1–63 а.о. обладают достаточно высокой стабильностью. Однако при нагреве наблюдается начало $\alpha \rightarrow \beta$ -перехода, характерного для амилоидных белков: между остатками 17–20 и 22–25 образовывалась β -складка [53].

Реконструированная модель природного белка NEP (рис. 6, a) была использована в качестве стартовой для получения структуры модифицированных форм NEP-N и NEP-C, несущих концевые

аффинные His₆-содержащие фрагменты. Результаты моделирования в течение 200 нс (рис. 6) демонстрируют, что все три изоформы белка достаточно стабильны, о чем свидетельствуют относительно низкие значения среднеквадратической флюктуации (RMSF) и среднеквадратического отклонения (RMSD) (табл. 1). При этом наибольшую подвижность демонстрировали аффинные теги. Так, значения RMSD были существенно выше для модифицированных форм NEP по сравнению с природной формой (рис. 6; табл. 1, строки 1–3). Это связано с присутствием неструктурированного аффинного тега, который вносит наибольший вклад в наблюдаемые различия. Следует отметить, что значения RMSD, подсчитанные для области 1–121 а.о., у NEP и NEP-N одинаковые, а у NEP-C даже ниже, чем у природной формы, что говорит о некотором стабилизирующем эффекте C-концевой His₆-последовательности на пространственную структуру белка NEP-C (табл. 1, строки 1, 4 и 5).

Таблица 1. Значения RMSD для структур вариантов белка NEP, полученных методом МД

Белок	Анализируемый фрагмент, а.о.	Число анализируемых конформаций	RMSD, Å; среднеквадратичное отклонение
NEP	1–121, весь белок	45	1,7
NEP-N	1–132, весь белок	83	3,3
NEP-C	1–132, весь белок	42	2,4
NEP-N	1–121, фрагмент	83	1,7
NEP-C	1–121, фрагмент	42	1,36

Данные МД подтвердили наличие β -шпильки в области 17–25 а.о. у всех трех изоформ (рис. 6). Присутствие N-концевого аффинного тега у N-NEP в несколько раз повышало вероятность ее формирования.

Таким образом, результаты моделирования методом МД трех вариантов белка NEP не выявили существенного влияния присоединенных концевых фрагментов на общую (основную) структуру белка, что соответствует полученным ранее данным по круговому дихроизму [31]. Однако наблюдаемые некоторые различия в подвижности этих фрагментов могут оказывать влияние на формирование надмолекулярных структур, в частности, на самосборку белка. О возможности агрегации по амилоидному типу всех трех белковых изоформ свидетельствует обнаруженная при моделировании тенденция к переходу α -спиралей в β -структуру в N-концевой части белка.

Возможные механизмы агрегации. Как уже упоминалось, наблюдаемые нами различия в эффективности агрегации и морфологии образующихся продуктов могут быть связаны с различными путями формирования последних. Рассмотрим возможные механизмы образования тех или иных агрегатов и потенциальное влияние концевых добавок в случае NEP.

Мицеллоподобные агрегаты, известные также как «олигомеры», «мицеллы» и «амилофериоиды», описаны для различных амилоидогенных белков [44, 54, 55]. Их образование связано с амфифильной природой белковых молекул [56]. В случае NEP такой амфифильный домен локализован в C-концевой части (см. рис. 1, a), благодаря чему все варианты белка способны генерировать мицеллоподобные сферические агрегаты. Наибольшую эффективность в их образовании демонстрирует мутантный вариант NEP-С. Это, вероятно, связано с влиянием полигистидин-содержащего фрагмента, присоединенного к C-концу, который может (локально) изменять геометрию молекулы или способствовать дополнительным межмолекулярным взаимодействиям.

Гибкие фибриллярные структуры, известные как протофибриллы (включающие варианты «бусы на нити» и «червеобразные фибриллы»), считаются предшественниками зрелых амилоидных фибрилл [47]. Механизм формирования этих протофибрилл до конца не ясен. Такие протофибриллы состоят из «бусин» диаметром от 2,5 до 6 нм. Предполагается, что они формируются путем агрегации мелких олигомеров [40, 57, 58], о чем также свидетельствуют близкие размеры олигомеров и «бусин». Недавно были представлены убедительные доказательства протекания такого процесса для белка ORF6 коронавируса SARS-CoV-2 [59].

Жесткие палочкообразные фибриллы высотой ~5 нм, обнаруживаемые в растворах всех трех белковых препаратов, могут соответствовать зрелым амилоидам [42, 46]. Как правило, образование таких идет по механизму «нуклеации», который предполагает относительно медленное формирование в растворе олигомерного ядра-затравки (скорость-лимитирующая стадия) с последующей быстрой элонгацией фибриллы за счет последовательного присоединения мономеров из раствора [46, 60]. В случае белка NEP-С, для которого характерна высокая эффективность агрегации, такие палочкообразные агрегаты появляются на более ранних этапах выдерживания белка, чем в случае других вариантов белка. А их общее содержание и линейные размеры становятся существенно больше. Это указывает на то, что образование амилоидов в этом случае может идти и по альтернативному пути, когда в качестве интермедиатов выступают сферические (мицеллоподобные) агрегаты и/или образуемые ими протофибриллы [46, 49, 60]. Так, высокая концентрация белка в крупных мицеллоподобных агрегатах может способствовать быстрому образованию первичных амилоидных ядер (ускоренная нуклеация) с последующей ускоренной элонгацией фибрилл как за счет утилизации материала самих мицелл, так и за счет присоединения молекул белка из раствора [61]. С другой стороны, образующиеся в большом количестве протофибриллы могут трансформироваться в зрелые амилоиды либо за счет конформационной перестройки белковых молекул и постепенным уплотнением (компактизацией) фибрилл [42, 48], либо в результате закручивания двух и более протофибрилл друг относительно друга [46]. В пользу этого говорит то, что высота (диаметр – ~5 нм) палочкообразных агрегатов (зрелых амилоидов) почти в 2 раза превышает диаметр червеобразных протофибрилл (~2,5–3,5 нм; рис. 4, в и г).

Присоединенный к C-концу His₆-содержащий фрагмент в наибольшей степени влияет на кинетику агрегации и морфологию образующихся наночастиц, что связано с тем, что C-концевой домен белка, по-видимому, является ключевым для формирования агрегатов. При этом усиление агрегационных свойств может происходить как за счет локального изменения конформации белка, так и в результате появления дополнительных контактов между белковыми молекулами. В то же время важную роль при образовании высокоструктурированных агрегатов может играть общая геометрия белковой молекулы, а именно соотношение размеров и взаимное расположение доменов (гидрофильных/гидрофобных, структурированных/неструктурированных и др.). На это косвенно указывают некоторые эффекты,

наблюдаемые для ряда известных амилоидогенных белков. В частности, вариант бета-амилоидного пептида $\text{A}\beta$ -42, имеющий на C -конце два дополнительных аминокислотных остатка, агрегирует с большей скоростью, чем вариант $\text{A}\beta$ -40 [62]. Более того, агрегационные свойства $\text{A}\beta$ -42 еще больше усиливаются в результате дополнительного присоединения к C -концу фрагмента, содержащего His_6 [63]. Важность геометрических факторов подтверждается также выявленной корреляцией между числом повторяющихся остатков глутамина в составе некоторых ассоциированных с нейродегенеративными заболеваниями белков (хантингтина, атаксинов и др.) и их агрегационными свойствами [64].

Немногочисленные и достаточно противоречивые данные о влиянии позиции и размеров полигистидиновых тегов в составе некоторых рекомбинантных белков на их склонность к самоассоциации также могут свидетельствовать о роли именно соотношения размеров определенных доменов, участвующих в самосборке. В частности, в работе Ayoub et al. [30] для двух мембранных белков AdiC и протеородопсина было показано, что присоединение полигистидинового тега способствует олигомеризации белков, причем эта тенденция усиливается с увеличением размера присоединенного фрагмента. Аналогичные эффекты наблюдались и для капсидного белка вируса ящура [29], а также белка аквапорина AqpZ [28]. Причем в этих двух последних случаях положение полигистидин-содержащего фрагмента (на N - или C -конце) не оказывало значительного влияния на эффективность самосборки белков. Однако имеются работы, где склонность к агрегации зависит от положения тега. Например, в случае рекомбинантных вариантов аденилосукцинат-синтетазы *Helicobacter pylori* [24], пневмококкового поверхностного белка SP0845 [27] и фрагмента меразоитного белка MSP1 малярийного плазмодия [26] N -концевое положение тега (в отличие от C -концевого) способствует агрегации. В одной из недавних работ, посвященной детальному исследованию влияния позиции и размеров различных встроенных участков на агрегацию и другие свойства ряда белков (sfGFP , mCherry и ADH), показано, что такое влияние чрезвычайно индивидуально и не позволяет вывести четкие закономерности [25]. Тем не менее все эти данные

не противоречат высказанной в настоящей работе гипотезе о том, что изменение геометрических параметров (линейный размер, объем) белковых доменов, вызванное встраиванием дополнительных фрагментов, приводит к тем или иным эффектам. Исследование особенностей структуры конкретного белка позволит лучше понять, как можно целенаправленно воздействовать на его свойства, включая агрегационные.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе было впервые продемонстрировано влияние His_6 -содержащих аффинных модулей (тегов) на агрегацию вирусного белка NEP в зависимости от их локализации на N - или C -конце. Установлено, что белок, содержащий такой модуль на C -конце, вблизи амилоидогенной области NEP , обнаруживает более высокую склонность к агрегации, в том числе амилоидного типа, что делает этот вариант белка очень удобной моделью для изучения различных аспектов амилоидообразования. Высказаны также гипотезы о возможном влиянии дополнительно присоединяемых участков на эффективность агрегации и морфологию образующихся агрегатов.

Вклад авторов. О.Н. Королева и В.Л. Друца – концепция и руководство работой; Н.В. Кузьмина и Е.В. Дубровин – проведение экспериментов; А.П. Толстова – моделирование методом молекулярной динамики; все авторы – обсуждение результатов исследования; О.Н. Королева, Е.В. Дубровин, А.П. Толстова – написание текста; В.Л. Друца – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2022-264) (уникальная научная установка «Сканирующий ион-проводящий микроскоп с конфокальным модулем», регистрационный номер 2512530).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gao, S., Wang, S., Cao, S., Sun, L., Li, J., Bi, Y., et al. (2014) Characteristics of nucleocytoplasmic transport of H1N1 influenza A virus nuclear export protein, *J. Virol.*, **88**, 7455-7463, <https://doi.org/10.1128/JVI.00257-14>.
2. Patel, H., and Kukol, A. (2019) Prediction of ligands to universally conserved binding sites of the influenza a virus nuclear export protein, *Virology*, **537**, 97-103, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.08.013>.

3. Gong, W., He, X., Huang, K., Zhang, Y., Li, C., Yang, Y., Zou, Z., and Jin, M. (2021) Interaction of NEP with G protein pathway suppressor 2 facilitates influenza A virus replication by weakening the inhibition of GPS2 to RNA synthesis and ribonucleoprotein assembly, *J. Virol.*, **95**, JVI.00008-21, <https://doi.org/10.1128/jvi.00008-21>.
4. Zhang, B., Liu, M., Huang, J., Zeng, Q., Zhu, Q., Xu, S., and Chen, H. (2022) H1N1 influenza A virus protein NS2 inhibits innate immune response by targeting IRF7, *Viruses*, **14**, 2411, <https://doi.org/10.3390/v14112411>.
5. Teo, Q. W., Wang, Y., Lv, H., Mao, K. J., Tan, T. J. C., Huan, Y. W., Rivera-Cardona, J., Shao, E. K., Choi, D., Dargani, Z. T., Brooke, C. B., and Wu, N. C. (2024) Deep mutational scanning of influenza A virus NEP reveals pleiotropic mutations in its N-terminal domain, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2024.05.16.594574>.
6. Golovko, A. O., Koroleva, O. N., Tolstova, A. P., Kuz'mina, N. V., Dubrovin, E. V., and Drutsa, V. L. (2018) Aggregation of influenza A virus nuclear export protein, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1411-1421, <https://doi.org/10.1134/S0006297918110111>.
7. Koroleva, O. N., Kuz'mina, N. V., Dubrovin, E. V., and Drutsa, V. L. (2024) Atomic force microscopy of spherical intermediates on the pathway to fibril formation of influenza A virus nuclear export protein, *Microsc. Res. Technique*, **87**, 1131-1145, <https://doi.org/10.1002/jemt.24499>.
8. Gorai, T., Goto, H., Noda, T., Watanabe, T., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Takano, R., Neumann, G., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2012) F₁F₀-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, <https://doi.org/10.1073/pnas.1114728109>.
9. Willbold, D., Strodel, B., Schröder, G. F., Hoyer, W., and Heise, H. (2021) Amyloid-type protein aggregation and prion-like properties of amyloids, *Chem. Rev.*, **121**, 8285-8307, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00196>.
10. Hassan, M. N., Nabi, F., Khan, A. N., Hussain, M., Siddiqui, W. A., Uversky, V. N., and Khan, R. H. (2022) The amyloid state of proteins: a boon or bane? *Int. J. Biol. Macromol.*, **200**, 593-617, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.115>.
11. Hammarström, P., and Nyström, S. (2023) Viruses and amyloids – a vicious liaison, *Prion*, **17**, 82-104, <https://doi.org/10.1080/19336896.2023.2194212>.
12. Gondelaud, F., Lozach, P.-Y., and Longhi, S. (2023) Viral amyloids: new opportunities for antiviral therapeutic strategies, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **83**, 102706, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102706>.
13. Geng, H., Subramanian, S., Wu, L., Bu, H.-F., Wang, X., Du, C., De Plaen, I. G., and Tan, X.-D. (2021) SARS-CoV-2 ORF8 forms intracellular aggregates and inhibits IFNy-induced antiviral gene expression in human lung epithelial cells, *Front. Immunol.*, **12**, 679482, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.679482>.
14. Charnley, M., Islam, S., Bindra, G. K., Engwirda, J., Ratcliffe, J., Zhou, J., Mezzenga, R., Hulett, M. D., Han, K., Berryman, J. T., and Reynolds, N. P. (2022) Neurotoxic amyloidogenic peptides in the proteome of SARS-CoV2: potential implications for neurological symptoms in COVID-19, *Nat. Commun.*, **13**, 3387, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30932-1>.
15. Bhardwaj, T., Gadhave, K., Kapuganti, S. K., Kumar, P., Brotzakis, Z. F., Saumya, K. U., Nayak, N., Kumar, A., Joshi, R., Mukherjee, B., Bhardwaj, A., Thakur, K. G., Garg, N., Vendruscolo, M., and Giri, R. (2023) Amyloidogenic proteins in the SARS-CoV and SARS-CoV-2 proteomes, *Nat. Commun.*, **14**, 945, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36234-4>.
16. Morozova, O. V., Manuvera, V. A., Barinov, N. A., Subcheva, E. N., Lakyushkin, V. S., Ivanov, D. A., Lazarev, V. N., and Klinov, D. V. (2024) Self-assembling amyloid-like nanostructures from SARS-CoV-2 S1, S2, RBD and N recombinant proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **752**, 109843, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109843>.
17. Vidic, J., Richard, C.-A., Péchoux, C., Da Costa, B., Bertho, N., Mazerat, S., Delmas, B., and Chevalier, C. (2016) Amyloid assemblies of influenza A virus PB1-F2 protein damage membrane and induce cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, **291**, 739-751, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652917>.
18. Kikkert, M. (2020) Innate immune evasion by human respiratory RNA viruses, *J. Innate Immun.*, **12**, 4-20, <https://doi.org/10.1159/000503030>.
19. Shalzhyan, A. A., Zabrodskaya, Y. A., Baranovskaya, I. L., Sergeeva, M. V., Gorshkov, A. N., Savin, I. I., Shishlyannikov, S. M., Ramsay, E. S., Protasov, A. V., Kukhareva, A. P., and Egorov, V. V. (2021) Old dog, new tricks: influenza A virus NS1 and *in vitro* fibrillogenesis, *Biochimie*, **190**, 50-56, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.07.005>.
20. Cheung, P.-H. H., Lee, T.-W. T., Kew, C., Chen, H., Yuen, K.-Y., Chan, C.-P., and Jin, D.-Y. (2020) Virus subtype-specific suppression of MAVS aggregation and activation by PB1-F2 protein of influenza A (H7N9) virus, *PLOS Pathog.*, **16**, e1008611, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008611>.
21. Léger, P., Nachman, E., Richter, K., Tamietti, C., Koch, J., Burk, R., Kummer, S., Xin, Q., Stanifer, M., Bouloy, M., Boulant, S., Kräusslich, H.-G., Montagutelli, X., Flamand, M., Nussbaum-Krammer, C., and Lozach, P.-Y. (2020) NSs amyloid formation is associated with the virulence of Rift Valley fever virus in mice, *Nat. Commun.*, **11**, 3281, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17101-y>.

22. Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., and Stüber, D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent, *Nat. Biotechnol.*, **6**, 1321-1325, <https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>.
23. Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C., and DeLucas, L. J. (2007) His-tag impact on structure, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **63**, 295-301, <https://doi.org/10.1107/S0907444906052024>.
24. Mišković, M. Z., Wojtyś, M., Winiewska-Szajewska, M., Wielgus-Kutrowska, B., Matković, M., Domazet Jurašin, D., Štefanić, Z., Bzowska, A., and Lešići Ašler, I. (2024) Location is everything: influence of his-tag fusion site on properties of adenylosuccinate synthetase from *Helicobacter pylori*, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 7613, <https://doi.org/10.3390/ijms25147613>.
25. Karan, R., Renn, D., Allers, T., and Rueping, M. (2024) A systematic analysis of affinity tags in the haloarchaeal expression system, *Haloferax volcanii* for protein purification, *Front. Microbiol.*, **15**, 1403623, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1403623>.
26. Khan, F., Legler, P. M., Mease, R. M., Duncan, E. H., Bergmann-Leitner, E. S., and Angov, E. (2012) Histidine affinity tags affect MSP1₄₂ structural stability and immunodominance in mice, *Biotechnol. J.*, **7**, 133-147, <https://doi.org/10.1002/biot.201100331>.
27. Singh, M., Sori, H., Ahuja, R., Meena, J., Sehgal, D., and Panda, A. K. (2020) Effect of N-terminal poly histidine-tag on immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* surface protein SP0845, *Int. J. Biol. Macromol.*, **163**, 1240-1248, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.056>.
28. Mohanty, A. K., and Wiener, M. C. (2004) Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position, *Protein Express. Purif.*, **33**, 311-325, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.10.010>.
29. Sánchez, J. M., Carratalá, J. V., Serna, N., Unzueta, U., Nolan, V., Sánchez-Chardi, A., Voltà-Durán, E., López-Laguna, H., Ferrer-Miralles, N., Villaverde, A., and Vazquez, E. (2022) The poly-histidine Tag_{H6} mediates structural and functional properties of disintegrating, protein-releasing inclusion bodies, *Pharmaceutics*, **14**, 602, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030602>.
30. Ayoub, N., Roth, P., Ucurum, Z., Fotiadis, D., and Hirschi, S. (2023) Structural and biochemical insights into His-tag-induced higher-order oligomerization of membrane proteins by cryo-EM and size exclusion chromatography, *J. Struct Biol.*, **215**, 107924, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2022.107924>.
31. Golovko, A. O., Koroleva, O. N., and Drutsa, V. L. (2017) Heterologous expression and isolation of influenza A virus nuclear export protein NEP, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1529-1537, <https://doi.org/10.1134/S0006297917120124>.
32. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
33. Yaminsky, I., Akhmetova, A., and Meshkov, G. (2018) Femtoscan online software and visualization of nano-objecs in high-resolution microscopy, *Nanoindustry*, **11**, 414-416, <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2018.11.6.414.416>.
34. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583-589, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
35. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., and Lindahl, E. (2015) GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, **1-2**, 19-25, <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
36. Huang, J., and MacKerell, A. D. (2013) CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data, *J. Comput. Chem.*, **34**, 2135-2145, <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>.
37. Hamrang, Z., Rattray, N. J. W., and Pluen, A. (2013) Proteins behaving badly: emerging technologies in profiling biopharmaceutical aggregation, *Trends Biotechnol.*, **31**, 448-458, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.05.004>.
38. Wang, W., and Roberts, C. J. (2018) Protein aggregation – mechanisms, detection, and control, *Int. J. Pharmaceut.*, **550**, 251-268, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.043>.
39. Müller, D. J., and Dufrêne, Y. F. (2008) Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology, *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 261-269, <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.100>.
40. Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (1999) Amyloid β -protein fibrillogenesis: structure and biological activity of protofibrillar intermediates, *J. Biol. Chem.*, **274**, 25945-25952, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25945>.
41. Goldsbury, C., Frey, P., Olivieri, V., Aebi, U., and Müller, S. A. (2005) Multiple assembly pathways underlie amyloid- β fibril polymorphisms, *J. Mol. Biol.*, **352**, 282-298, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.029>.
42. Brown, J. W. P., Meisl, G., J. Knowles, T. P., K. Buell, A., M. Dobson, C., and Galvagnion, C. (2018) Kinetic barriers to α -synuclein protofilament formation and conversion into mature fibrils, *Chem. Commun.*, **54**, 7854-7857, <https://doi.org/10.1039/C8CC03002B>.

43. Singh, J., Sabareesan, A. T., Mathew, M. K., and Udgaonkar, J. B. (2012) Development of the structural core and of conformational heterogeneity during the conversion of oligomers of the mouse prion protein to worm-like amyloid fibrils, *J. Mol. Biol.*, **423**, 217-231, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.040>.
44. Diociaiuti, M., Bonanni, R., Cariati, I., Frank, C., and D'Arcangelo, G. (2021) Amyloid prefibrillar oligomers: the surprising commonalities in their structure and activity, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6435, <https://doi.org/10.3390/ijms22126435>.
45. Cao, Y., Adamcik, J., Diener, M., Kumita, J. R., and Mezzenga, R. (2021) Different folding states from the same protein sequence determine reversible vs irreversible amyloid fate, *J. Am. Chem. Soc.*, **143**, 11473-11481, <https://doi.org/10.1021/jacs.1c03392>.
46. Taylor, A. I. P., and Staniforth, R. A. (2022) General principles underpinning amyloid structure, *Front. Neurosci.*, **16**, 878869, <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.878869>.
47. Akarsu, H., Burmeister, W. P., Petosa, C., Petit, I., Müller, C. W., Ruigrok, R. W. H., 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, <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg449>.
48. Ulamec, S. M., Brockwell, D. J., and Radford, S. E. (2020) Looking beyond the core: the role of flanking regions in the aggregation of amyloidogenic peptides and proteins, *Front. Neurosci.*, **14**, 611285, <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.611285>.
49. Morel, B., and Conejero-Lara, F. (2019) Early mechanisms of amyloid fibril nucleation in model and disease-related proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1867**, 140264, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140264>.
50. Pietrek, L. M., Stelzl, L. S., and Hummer, G. (2023) Structural ensembles of disordered proteins from hierarchical chain growth and simulation, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **78**, 102501, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102501>.
51. Pietrek, L. M., Stelzl, L. S., and Hummer, G. (2020) Hierarchical ensembles of intrinsically disordered proteins at atomic resolution in molecular dynamics simulations, *J. Chem. Theory Computat.*, **16**, 725-737, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00809>.
52. Alderson, T. R., Pritišanac, I., Kolarić, Đ., Moses, A. M., and Forman-Kay, J. D. (2023) Systematic identification of conditionally folded intrinsically disordered regions by AlphaFold2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2304302120, <https://doi.org/10.1073/pnas.2304302120>.
53. Ding, F., Borreguero, J. M., Buldyrey, S. V., Stanley, H. E., and Dokholyan, N. V. (2003) Mechanism for the α -helix to β -hairpin transition, *Proteins Struct. Funct. Bioinform.*, **53**, 220-228, <https://doi.org/10.1002/prot.10468>.
54. Matsumura, S., Shinoda, K., Yamada, M., Yokojima, S., Inoue, M., Ohnishi, T., Shimada, T., Kikuchi, K., Masui, D., Hashimoto, S., Sato, M., Ito, A., Akioka, M., Takagi, S., Nakamura, Y., Nemoto, K., Hasegawa, Y., Takamoto, H., Inoue, H., et al. (2011) Two distinct amyloid β -protein (A β) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology, and toxicity analyses, *J. Biol. Chem.*, **286**, 11555-11562, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.181313>.
55. Ahmed, I., and Jones, E. M. (2019) Importance of micelle-like multimers in the atypical aggregation kinetics of N-terminal serum amyloid A peptides, *FEBS Lett.*, **593**, 518-526, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13334>.
56. Lombardo, D., Kiselev, M. A., Magazù, S., and Calandra, P. (2015) Amphiphiles self-assembly: basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches, *Adv. Condensed Matter Physics*, **2015**, e151683, <https://doi.org/10.1155/2015/151683>.
57. Modler, A., Fabian, H., Sokolowski, F., Lutsch, G., Gast, K., and Damaschun, G. (2004) Polymerization of proteins into amyloid protofibrils shares common critical oligomeric states but differs in the mechanisms of their formation, *Amyloid*, **11**, 215-231, <https://doi.org/10.1080/13506120400014831>.
58. Hill, S. E., Robinson, J., Matthews, G., and Muschol, M. (2009) Amyloid protofibrils of lysozyme nucleate and grow via oligomer fusion, *Biophys. J.*, **96**, 3781-3790, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.044>.
59. Nishide, G., Lim, K., Tamura, M., Kobayashi, A., Zhao, Q., Hazawa, M., Ando, T., Nishida, N., and Wong, R. W. (2023) Nanoscopic elucidation of spontaneous self-assembly of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) open reading frame 6 (ORF6) protein, *J. Phys. Chem. Lett.*, **14**, 8385-8396, <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.3c01440>.
60. Lee, C.-T., and Terentjev, E. M. (2017) Mechanisms and rates of nucleation of amyloid fibrils, *J. Chem. Physics*, **147**, 105103, <https://doi.org/10.1063/1.4995255>.
61. Sabaté, R., and Estelrich, J. (2005) Evidence of the existence of micelles in the fibrillogenesis of β -amyloid peptide, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 11027-11032, <https://doi.org/10.1021/jp050716m>.
62. Selkoe, D. J., and Podlisny, M. B. (2002) Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease, *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, **3**, 67-99, <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.3.022502.103022>.

63. Jia, L., Wang, W., Sang, J., Wei, W., Zhao, W., Lu, F., and Liu, F. (2019) Amyloidogenicity and cytotoxicity of a recombinant C-terminal His₆-tagged A β ₁₋₄₂, *ACS Chem. Neurosci.*, **10**, 1251-1262, <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00333>.
64. Adegbuyiro, A., Sedighi, F., Pilkington, A. W., Groover, S., and Legleiter, J. (2017) Proteins containing expanded polyglutamine tracts and neurodegenerative disease, *Biochemistry*, **56**, 1199-1217, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00936>.

THE EFFECT OF C- AND N-TERMINAL POLYHISTIDIN TAG ON AGGREGATION OF INFLUENZA A VIRUS NUCLEAR EXPORT PROTEIN

O. N. Koroleva¹, N. V. Kuzmina², A. P. Tolstova³, E. V. Dubrovin^{4,5*}, and V. L. Drutsa⁶

¹ *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

² *Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia*

³ *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

⁴ *Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: dubrovin@polly.phys.msu.ru*

⁵ *National University of Science and Technology MISIS, 119049, Moscow, Russia*

⁶ *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia*

The nuclear export protein (NEP) of the influenza A virus, being one of the key components of the virus life cycle, is a promising model for studying the characteristics of formation of amyloids by viral proteins. Using atomic force microscopy, comparative studies of the aggregation properties of recombinant NEP variants, including the protein of natural structure, as well as modified variants with N- and C-terminal affinity His₆-tags, were carried out. All protein variants under physiological conditions are capable of forming aggregates of various morphologies: micelle-like nanoparticles, flexible protofibrils, rigid amyloid fibrils, etc. The His₆-tag attached to the C-terminus has the greatest effect on the aggregation kinetics and morphology of nanoparticles, which indicates the important role of the C-terminal domain in the process of protein self-assembly. Molecular dynamics simulation hasn't revealed the substantial influence of His₆-containing fragments on the protein structure but demonstrated some variations in the mobility of these fragments that may explain the observed differences in the aggregation kinetics of different NEP variants. Hypothetical mechanisms for the formation and interconversion of various aggregates are considered.

Keywords: influenza A virus, nuclear export protein NEP, protein aggregation, poly(His)-tags, atomic force microscopy