

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА СВЯЗЫВАНИЯ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ Lc-LTP2 С ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ И ЛИЗОЛИПИДАМИ

Д.Н. Мельникова, М.А. Никитина, Т.В. Овчинникова

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Москва, Россия,

Растительные липид-транспортирующие белки (LTP) являются небольшими катионными многофункциональными белками. Характерной особенностью LTP является наличие в структуре гидрофобной впадины, благодаря которой они могут обратимо связывать и переносить широкий спектр гидрофобных лигандов, в том числе некоторые лекарственные вещества. Гидрофобная впадина LTP имеет два входа, различающихся по размерам. На сегодняшний день механизм связывания с липидами остается до конца не изученным.

В рамках данной работы в качестве модельного белка был выбран Lc-LTP2 чечевицы, на примере которого была изучена роль Lys61 и Lys81, расположенных у противоположенных входов в гидрофобную впадину белка, в связывании различных гидрофобных лигандов. Первым этапом работы было компьютерное моделирование комплексов белка дикого типа и его мутантных аналогов с лизолипидами (LMPC, LMPG, LPPC, LPPG), а также с насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами с разной длиной ацильной цепи (C12:0, C14:0, C18:0, C18:1, C18:2, C22:0). Этот метод основан на поиске глобального минимума свободной энергии. Он позволяет предсказать наиболее выгодную с энергетической точки зрения конформацию лиганда в полости белка при формировании липид-белкового комплекса. Было показано, что в отличие от дикого типа мутантные аналоги K61A, K81A, K61A/K81A не образуют комплексы с лизолипидами, а K81A также и жирными кислотами.

Следующим этапом работы было получение рекомбинантных аналогов мутантных белков. Для этой цели с помощью полноразмерной амплификации базовой экспрессирующей конструкции pET-His8-TrxL-Lc-LTP2 с использованием инвертированной ПЦР и мутагенизирующих праймеров были введены замены Lys61 и Lys81 на аланин. На основе полученных плазмид и штамма *E.coli* BL-21 (DE3) были разработаны системы для гетерологической экспрессии мутантных аналогов Lc-LTP2. Была проведена оптимизация состава питательной среды, температуры и других условий экспрессии, что позволило достичь удовлетворительных выходов гибридных белков. Целевые белки были получены с использованием аффинной хроматографии, реакции расщепления гибридных белков бромцианом, повторной аффинной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ.

Далее с помощью флуоресцентной спектроскопии была исследована их способность связывать лиганды. Было показано, что мутантные аналоги Lc-LTP2 обладают «избирательной» способностью связывать жирные кислоты и лизолипиды, при этом их связывающая способность меньше по сравнению с диким типом. Мутантный аналог K61A не эффективно связывал все тестируемые жирные кислоты. Исключением являются элаидиновая (C18:1 trans-) и линолевая кислоты (C18:2). В отличие от мутантных аналогов с единичными заменами K61V / K81A эффективнее связывался с жирными кислотами. K81A, в свою очередь, успешно связывал только стеариновую (C18:0) и линолевую (C18:2) кислоты, и не связывал все тестируемые лизолипиды.

В результате работы было показано, что исследуемые мутантные аналоги связывают весь спектр лигандов хуже, чем дикий тип белка. Однако существует определенная закономерность в изменении связывающей способности в зависимости от внесенных мутаций. Так, одиночная замена Lys61 оказала более существенное влияние на связывание жирных кислот, в то время как замена Lys81 сильно повлияла на связывание лизолипидов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (проект № 22–25–00527).