

УДК 577.112.4

**РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ЛИПИД – ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЧЕВИЦЫ Lc-LTP2 ДЛЯ ПОИСКА КЛЮЧЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В СВЯЗЫВАНИИ ЛИГАНДОВ*****А.Е. Потапов, И.В. Богданов, Т.В. Овчинникова, Д.Н. Мельникова****Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

Одной из актуальных задач современной медицины является поиск новых лекарственных форм, позволяющих проводить терапию с наименьшим количеством побочных эффектов. Среди достаточно широкого списка форм носителей в выигрышном свете представляются белки-транспортёры, характеризующиеся низкой токсичностью, высокой загрузкой лекарственного вещества, хорошей биосовместимостью, способностью к контролируемому и пролонгированному высвобождению лекарств. Растительные липид-транспортирующие белки (ЛТР) являются новым, не изученным в этом направлении классом белков-транспортёров. Характерной особенностью ЛТР является наличие в структуре гидрофобной впадины в форме туннеля, благодаря которой они могут связывать и переносить широкий спектр лигандов, в том числе некоторые лекарственные вещества.

В рамках данной работы в качестве модельного белка использовали липид-транспортирующий белок чечевицы (Lc-LTP2), на примере которого была изучена роль Lys61 и Lys81 в связывании различных гидрофобных лигандов. Lys81 расположен рядом с «нижним» входом гидрофобной впадины и предположительно может быть одной из аминокислот, которые формируют сайт взаимодействия с мембраной. Lys61 находится у «верхнего» входа и потенциально может участвовать, как в связывании лигандов, так и в удержании их в полости белка. В качестве лигандов были выбраны насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с разной длиной ацильной цепи (лауриновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и бегеновая), а также лизолипиды (LMPC, LMPG, LPPC, LPPG).

Методом молекулярного докинга было показано, что при замене Lys61 и Lys81 на аланин способность мутантных аналогов Lc-LTP2 связывать жирные кислоты осталась практически без изменений по сравнению с диким типом, но была утрачена в случае лизолипидов. Далее с использованием инвертированной ПЦР и мутагенизирующих праймеров для введения замен Lys61 и Lys81 на аланин была произведена полноразмерная амплификация базовой экспрессирующей конструкции pET-His8-TrxL-Lc-LTP2. На основе полученной плазмиды и штамма E.coli BL-21 (DE3) была разработана система для гетерологической экспрессии мутантных аналогов Lc-LTP2 (K61A), Lc-LTP2 (K81A), Lc-LTP2 (K61A/K81A).

С помощью флуоресцентной спектроскопии было показано, что все три мутантных аналога Lc-LTP2 с большей специфичностью связывали стеариновую кислоту по сравнению с диким типом, однако для олеиновой кислоты наблюдается противоположный эффект. Вероятно, при изменении размера гидрофобной впадины за счет введенных мутаций более компактная по размеру олеиновая кислота не может удерживаться внутри молекулы белка. Для лизолипидов было показано, что мутантные аналоги Lc-LTP2 связывали все эти лиганды хуже по сравнению с диким типом, а Lc-LTP2(K81A) не связывал LMPC и LPPC.

Для исследования влияния введенных точечных замен на способность Lc-LTP2 взаимодействовать с мембраной, были получены однокомпонентные липосомы, состоящие из POPG и POPC. В качестве маркера разрушения мембраны был выбран анионный краситель кальцеин. В ходе эксперимента было показано, что замены K61A и K81A по отдельности практически не влияют на снижение процесса разрушения заряженных мембран. Только при двойной замене K61A/K81A происходит значительное снижение способности белка разрушать мембраны. Вероятно, только при одновременной замене 2-х ключевых аминокислот Lys61 и Lys81 взаимодействие с поверхностью мембраны уменьшается. Т.к. не только процесс захвата липида из мембраны, в котором участвует Lys81, но и удерживание его в полости белка, в котором участвует Lys61, позволяет белку разрушать целостность липидного слоя.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано ключевое значение Lys81 в связывании с лизолипидами, а также вместе с Lys61 во взаимодействии с мембраной. Полученные данные делают возможным регулирование специфичности белка в отношении различных лигандов и расширяют сведения о механизме связывания липид-транспортирующих белков.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22–25–00527)*