

Termodynamiczne i strukturalne następstwa substytucji reszt aminokwasowych w rejonie kieszeni wiążącej β -laktoglobuliny

β -laktoglobulina (BLG) jest głównym białkiem serwatkowym mleka, m.in. krowiego. Charakteryzuje się specyficzną strukturą trzeciorzędową, której kluczowy element stanowi baryłka β . Wnętrze baryłki jest miejscem wiązania ligandów hydrofobowych i amfifilowych. Na wielkość powinowactwa ligandów do białka wpływ mają pętle otaczające miejsce wiązania. Substytucje reszt aminokwasowych znajdujących się w pętlach mogą z jednej strony prowadzić do uzyskania wariantów białka o zastosowaniu praktycznym, a z drugiej pomóc w lepszym poznaniu procesu wiązania ligandów przez BLG. Celem niniejszej pracy było zrozumienie roli, jaką w procesie wiązania odgrywają reszty leucyny w pozycjach 39 i 87 oraz reszty lizyny w pozycjach 60, 69 i 70. Aby cel ten osiągnąć, zaprojektowano zestaw wariantów BLG z następującymi substytucjami aminokwasowymi: L39A, L39S, L39F, L39Y, L39I, L87A, L87S, L87I, K60A oraz K69A/K70A.

Pomiary dichroizmu kołowego wykazały, że wprowadzone substytucje modyfikują strukturę białka jedynie w niewielkim stopniu oraz że badane warianty pozostają stabilne w temperaturze, w której zaplanowano dalsze badania. Substytucje nie powodują też dużych zmian stałej dimeryzacji, co pokazano z wykorzystaniem izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC).

Wariant podstawowy BLG (WT) charakteryzuje się niższą stałą asocjacji ligandów w pH poniżej 7. Jest to spowodowane blokowaniem dostępu do miejsca wiązania przez jedną z otaczających je pętli. Wcześniejsze badania wykazały, że substytucja L39Y prowadzi do wzrostu stałej asocjacji w pH 6,5, tak że osiąga ona wartość zbliżoną to tej w pH 7,5. Substytucje wprowadzone w pozycji 39 miały na celu pomóc w zrozumieniu tego efektu. Wyniki badań wiązania dodecylosiarczanu sodu (SDS) przeprowadzone metodą ITC pokazały, że wzrost stałej asocjacji w pH 6,5 ma miejsce dla wszystkich badanych wariantów z substytucjami w pozycji 39, a także dla wariantów L87A i L87S. Wariant L87A charakteryzuje się nawet wyższą stałą asocjacji w pH 6,5 niż 7,5. Dla wariantu L87I efekt substytucji jest natomiast niewielki. Parametry termodynamiczne wskazują, że z wyjątkiem wariantu L39F mechanizm

wiązania różni się w zależności od pH, nawet jeżeli stałe asocjacji są zbliżone. Można zatem sądzić, że wprowadzone substytucje wpływają na pozycję pętli.

Substytucje K60A oraz K69A/K70A miały na celu pomóc w odpowiedzi na pytanie o istotność oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy substytuowanymi resztami a naładowanym ligandem. Na podstawie pomiarów ITC potwierdzono silniejsze wiązanie do BLG WT liganda naładowanego ujemnie (SDS) niż liganda naładowanego dodatnio (chlorek dodecylotrimetyloamoniowy, DTAC). Pokazano, że stała asocjacji SDSu do BLG jest wyższa w obecności reszt lizyny w pozycjach 60, 69 i 70 niż w przypadku wariantów K60A i K69A/K70A. DTAC silniej wiąże się natomiast do wariantów K60A i K69A/K70A niż do wariantu WT. Wyniki te wskazują na znaczenie oddziaływań elektrostatycznych. Siła jonowa ma niewielki wpływ na stałą asocjacji obu badanych ligandów. Gdyby za wiązanie odpowiadały głównie oddziaływania elektrostatyczne, wzrost siły jonowej spowodowałby ich osłabienie w stopniu prowadzącym do znacznych zmian stałej asocjacji. Tak się nie dzieje, co jest zgodne z ogólnie przyjętym poglądem, że to oddziaływania hydrofobowe odgrywają główną rolę w procesie wiązania ligandów przez BLG.

Podsumowując, na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że reszty leucyny w pozycjach 39 i 87 mają kluczowe znaczenie dla istnienia różnicy pomiędzy stałymi asocjacji SDSu do BLG w pH 6,5 i 7,5 oraz że oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy resztami lizyny w pozycjach 60, 69 i 70 a naładowanymi ligandami odgrywają znaczącą, choć nie główną rolę w procesie wiązania.