

Влияние лиганда на стабильность и процессы фолдинга двухдоменных лиганд-связывающих белков

Степаненко Ольга В., Кузнецова И.М., Туроверов К.К., Скогнамиглио В., Стаяно М., Д'Ауриа С.

аспирант, сотрудники

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия; Институт биохимии белков, Неаполь, Италия.

E-mail: sov@mail.cytspb.rssi.ru, kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Целью работы являлось сравнительное изучение процессов сворачивания–разворачивания глутамин-связывающего белка (GlnBP) и его комплекса с глутамином и D-галактозо/D-глюкозо-связывающего белка (GGBP) и его комплекса с D-глюкозой из *Escherichia coli* под действием гуанидингидрохлорида и температуры. Оба белка относятся к обширной группе лиганд-связывающих белков, содержащихся в периплазме бактерий, основная функция которых заключается в связывании различных биологических молекул (сахаров, аминокислот, пептидов и т.д.) и неорганических ионов, и их транспорте в клетку. Хотя эти белки существенно различаются по размеру и аминокислотной последовательности, все они имеют сходную пространственную структуру: два глобулярных домена связаны шарнирной областью, а в щели между ними расположен лиганд-связывающий центр. Связывание лиганда приводит к частичному закрытию щели. Конформационные изменения, происходящие с белками при связывании лиганда, делают GlnBP и GGBP хорошими кандидатами на роль чувствительных элементов при разработке биосенсоров. Исследования выполнены методами собственной УФ-флуоресценции белков, флуоресценции АНС и кругового дихроизма в дальней и ближней УФ-областях спектра. Белки GGBP и GlnBP имеют приблизительно одинаковые величины свободной энергии и в обоих случаях комплексообразование делает белок более термостабильным. При этом было показано, что характер разворачивания GGBP и GlnBP существенно различается. Совокупность данных собственной флуоресценции белка, флуоресценции АНС и данных КД в дальней УФ области, а также использование параметрического представления флуоресцентных данных позволило предположить трех-стадийный процесс разворачивания как GlnBP, так и комплекса GlnBP с глутамином под действием GdnHCl с образованием двух промежуточных состояний I_1 и I_2 . В присутствии глутамин структура GlnBP становится не только более термостабильной, но также более устойчивой к денатурирующему действию GdnHCl, т.е. переход $N \leftrightarrow I_1$ происходит при более высокой концентрации GdnHCl, а процессы $N \leftrightarrow I_1$, $I_1 \leftrightarrow I_2$ и $I_2 \leftrightarrow U$ происходят в более узкой области концентраций GdnHCl. Несмотря на сложный характер процесса разворачивания GlnBP, он полностью обратим. В то же время все экспериментальные данные, полученные методом собственной УФ флуоресценции и КД в дальней УФ области, касающиеся разворачивания GGBP и комплекса GGBP с D-глюкозой под действием GdnHCl, а так же использование эффективного подхода для выявления скрытых (практически не проявляющихся на стационарных зависимостях) промежуточных состояний, основанного на построении параметрических зависимостей между любыми двумя экстенсивными характеристиками, свидетельствуют об одностадийном процессе разворачивания как GGBP, так и комплекса GGBP с D-глюкозой, хотя связывание лиганда делает GGBP более устойчивым к денатурирующему действию GdnHCl. Возможно, причина этих различий состоит в наличии в структуре GGBP иона Ca^{2+} , который, как известно, может играть стабилизирующую роль в структуре белка. Интересно отметить, что структура свободного GGBP (в отсутствие лиганда) также существует в закрытом состоянии, в отличие от GlnBP, для которого структура в отсутствие лиганда является открытой.

Работа поддержана грантом РФФИ 06-04-48231, Программой МКБ РАН и Программой "Ведущие научные школы РФ" (НШ -9396.2006.4).