



PL9800947

BADANIA NMR PROCESU DENATURACJI BIAŁKA WIĄZĄCEGO RYBOFLAWINĘA. Rękas<sup>†</sup>, J.S. Blicharski<sup>\*\*</sup>, Z. Żak<sup>†</sup><sup>†</sup> Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków,<sup>\*\*</sup> Instytut Fizyki UJ, Kraków**WSTĘP**

Białko wiążące ryboflawinę z białka jaja kurzego (RBP) spełnia specyficzną funkcję w procesie rozrodo umożliwiając transport i magazynowanie witaminy B<sub>2</sub> (ryboflawiny) niezbędnej dla rozwijającego się zarodka.

Cząsteczka RBP zbudowana jest z jednego łańcucha polipeptydowego złożonego z 219 aminokwasów. Ma ona 9 wiązań dwusiarczkowych wewnątrzłańcuchowych. Wiązania te utrzymują strukturę przestrzenną białka i powodują jego dużą odporność na wysoką temperaturę<sup>1</sup>. Denaturacja cieplna zachodzi między 120-130°C. Wolne grupy sulfhydrylowe nie występują. Całkowita redukcja wiązań dwusiarczkowych białka pociąga za sobą zmianę konformacji natywnej cząsteczki, przez co traci ona zdolność wiązania ryboflawiny.<sup>2,3</sup> Jednak absolutnie konieczny dla utrzymania prawidłowej konformacji miejsca wiążącego jest pojedynczy mostek dwusiarczkowy zlokalizowany we wnętrzu szczeliny lub na jej obrzeżu<sup>4</sup>.

Białko wiążące ryboflawinę jest białkiem globularnym; składa się z hydrofilowej kory i hydrofobowego wnętrza. Na powierzchni cząsteczki znajduje się szczelina, będąca centrum wiążącym ryboflawinę.

Wcześniejsze doświadczenia z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni i ramanowskiej dowiodły, że po związaniu ryboflawiny RBP wykazuje wzrost struktury  $\alpha$ -helisy o 30-50%<sup>5</sup>. O większym upakowaniu holoproteiny świadczą również badania NMR<sup>6</sup> obejmujące pomiary relaksacyjne w różnych temperaturach i pH, które wykazały znacznie bardziej ograniczoną ruchliwość cząsteczek wody w kompleksie niż w apoproteinie.

Z powodu nieudanych dotychczas prób wykrystalizowania RBP metodą dyfrakcji rentgenowskiej nie może tu znaleźć zastosowania, dlatego jednym z głównych nurtów badań nad strukturą tego białka pozostają metody MRJ.

Celem badań jest określenie zmian strukturalnych RBP towarzyszących rozrywaniu mostków dwusiarczkowych poprzez badanie widm <sup>1</sup>H - NMR wysokiej zdolności rozdzielczej otrzymanych dla tego białka.

**E K S P E R Y M E N T**

Przeprowadzono redukcję wiązań -S-S- apoproteidu (wyzolowanego z jaj kur rasy Leghorn<sup>7</sup>) za pomocą  $\beta$ -merkaptoetanolu, a następnie zablokowano wolne grupy -SH poprzez ich acetylację.

Zmierzono aktywność poddanego denaturacji białka jako zdolność wiązania ligandu przez RBP metodą miareczkowania fluorymetrycznego apoproteidu ryboflawiną. Pomiaru dokonano przy użyciu spektrofluorymetru wyposażonego w układ termostatuujący. Temperatura wynosiła 25 ± 0.5 °C.

Widma próbek białka natywnego i stopniowo denaturowanego przez rozzerwanie wiązań dwusiarczkowych (próbki I - III) zostały zmierzone na spektrometrze Bruker AM 400 (400 MHz) i AMX 600 (600 MHz), zaś dwuwymiarowe - na spektrometrze AMX 600 (600 MHz).

Sygnał swobodnej precesji uzyskiwano poddając próbkę działaniu pojedynczego impulsu  $\pi/2$ . Pomiar był prowadzony w temperaturze 300.00 ± 0.02 K.

## W Y N I K I

Wydajność denaturacji białka za pomocą rozrywania mostków dwusiarczkowych oznaczono jako obniżenie aktywności wiązania ryboflawiny w próbkach denaturowanych względem próbki kontrolnej. Wyniki przedstawia tabela:

PRÓBKA	ZACHOWANA AKTYWNOŚĆ (%)	RZECZYWISTY STOPIEŃ DENATURACJI
I	72.4	0.276
II	52.8	0.472
III	20.2	0.798

Elektroforeza próbek białka poddanego redukcji wykazała znaczną heterogenność badanych preparatów w porównaniu z kontrolną - tym większą im większy był stopień denaturacji białka w danej próbce. Przyczyną tej heterogenności jest agregacja molekuł białka. Polimery ulegają częściowemu rozpadowi w obecności 0.1% SDS, co wskazuje, że silami łączącymi je są również wiązania kowalencyjne.

Rysunki 1 - 4 przedstawiają 1-D i 2-D widma apoproteidu rozpuszczonego w D<sub>2</sub>O.

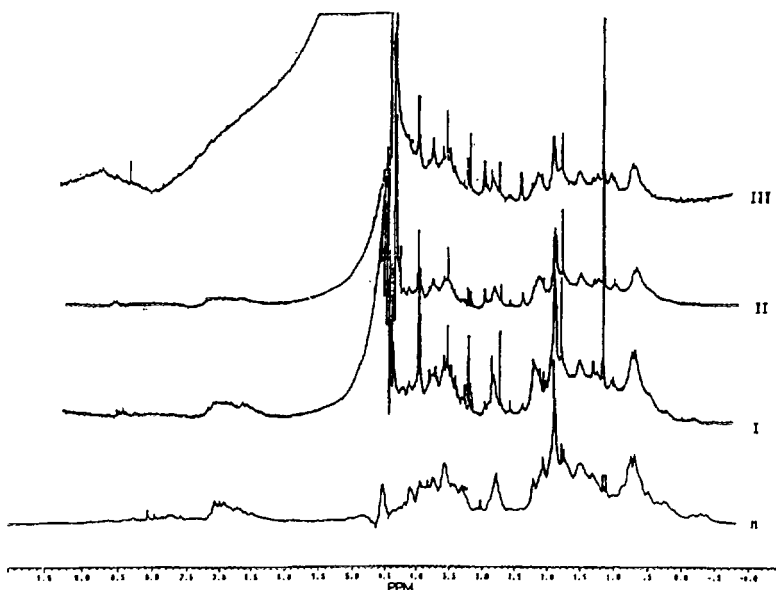
## W N I O S K I

- Spadek aktywności RBP poddanego redukcji dwusiarczków może być skutkiem nie tylko zmian konformacyjnych, lecz również agregacji molekuł białka, która zmniejsza dostępność centrów wiążących dla cząsteczek ryboflawiny.
- Mostki dwusiarczkowe są bardzo istotne dla utrzymania przestrzennej struktury białka. Ich zniszczenie powoduje daleko idące zmiany polegające na rozwinięciu łańcucha białkowego i wyeksponowaniu hydrofobowych reszt (normalnie zlokalizowanych we wnętrzu cząsteczki) do rozpuszczalnika.
- Na skutek denaturacji RBP spowodowanej zniszczeniem dwusiarczków zanikają oddziaływania grup -CH<sub>3</sub> i >CH<sub>2</sub> bocznych łańcuchów Leu, Ile i Val z układami aromatycznymi Phe i Trp.
- Zwiększa się znacznie ruchliwość reszt cysteiny i tryptofanu oraz następuje wyeksponowanie ich do rozpuszczalnika, o czym świadczy fakt, że większość łańcuchów bocznych tych aminokwasów znajduje się w identycznym otoczeniu.
- Wyżej opisane efekty mogą świadczyć o zachodzeniu zmian konformacji centrum wiążącego ryboflawinę, ponieważ po redukcji dwusiarczków różnice widmowe obserwuje się przede wszystkim dla linii od aminokwasów budujących to miejsce.
- Aminokwasy zawierające wolne grupy -NH<sub>2</sub> znajdują na powierzchni białka natywnego, gdyż nie zaobserwowano zmian ich otoczenia podczas denaturacji.
- Mostki dwusiarczkowe prawdopodobnie nie są najistotniejszym czynnikiem decydującym o właściwej konformacji miejsca wiążącego ryboflawinę. Jednak to przypuszczenie powinno być poparte dodatkowymi badaniami nad stabilnością oddziaływań ryboflawiny z białkiem w wyższych temperaturach (istotne są tu zwłaszcza wiązania wodorowe i interakcja z układem indolowym tryptofanu).

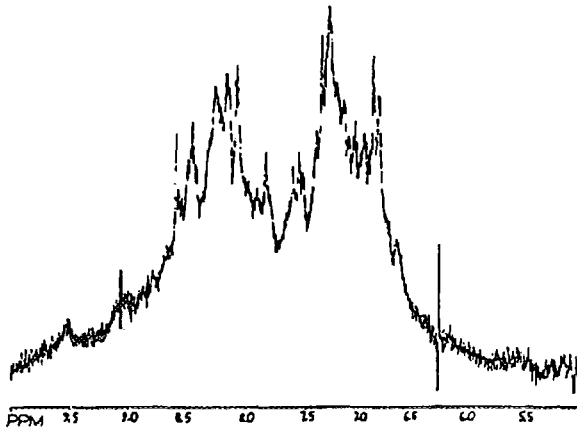
Z przeprowadzonych badań możliwe jest wysnucie jedynie ogólnych wniosków, gdyż, nawet przy zastosowaniu tak wysokiej rozdzielczości, na jaką pozwala spektrometr pracujący przy 600 MHz przydatność tej metody ograniczona jest masą cząsteczkową białka. Masa 32 kD plasuje się w pobliżu górnej granicy stosowalności spektroskopii wysokorozdzielczej MRJ.

## LITERATURA

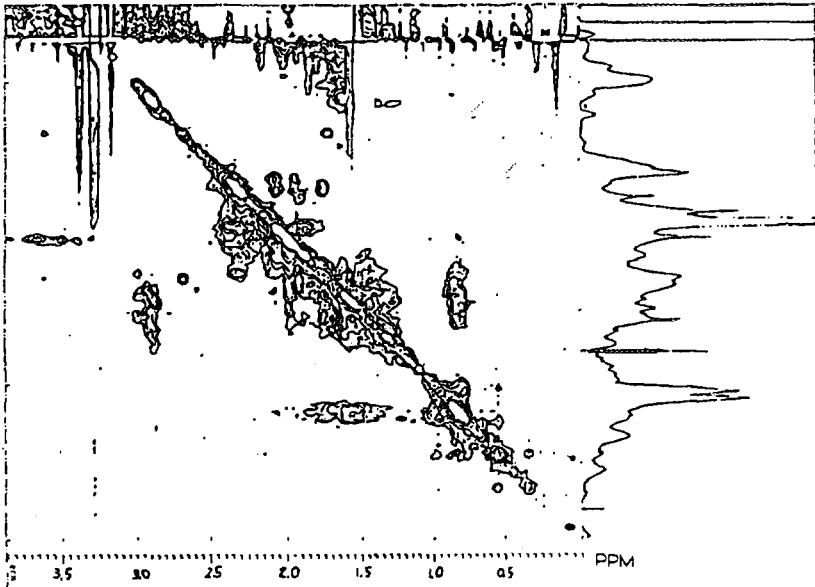
1. Rhodes, M.B., Bennett N., Feeney R.E., 1959. The flavoprotein- apoprotein system of egg white. *J.Biol.Chem.* 234: 2054-60.
2. Phillips J.W., 1969; Praca doktorska, Pennsylvania State University.
3. Murthy U.S., Podder S.K., Adiga P.R., 1976.; *Biochim.Biophys Acta* 434:69-81.
4. Kozik A. 1982. Disulfide bonds in egg-white riboflavin binding protein.; *Eur.J.Biochem.* 121:395-400.
5. Zak Z., Mańkiewicz I., Pytasz G. 1977. Riboflavin - apoprotein interaction studied by infrared and Raman spectroscopy. *Flavins and Flavoproteins*, red. W. Ostrowski, 8:39-50.
6. Blicharska B., Sagnowski S., Steczko J., Ostrowski W. 1977. Relaxation and wide-line Nuclear Magnetic Resonance of egg-yolk flavoprotein.; w *Flavins and Flavoproteins. Physicochemical Properties and Function*; str 51-61.
7. Farrel H.M.Jr., Malette M.F., Buss E.G., Clagett C.O. 1969; *Biochim.Biophys. Acta* 191: 433-42.



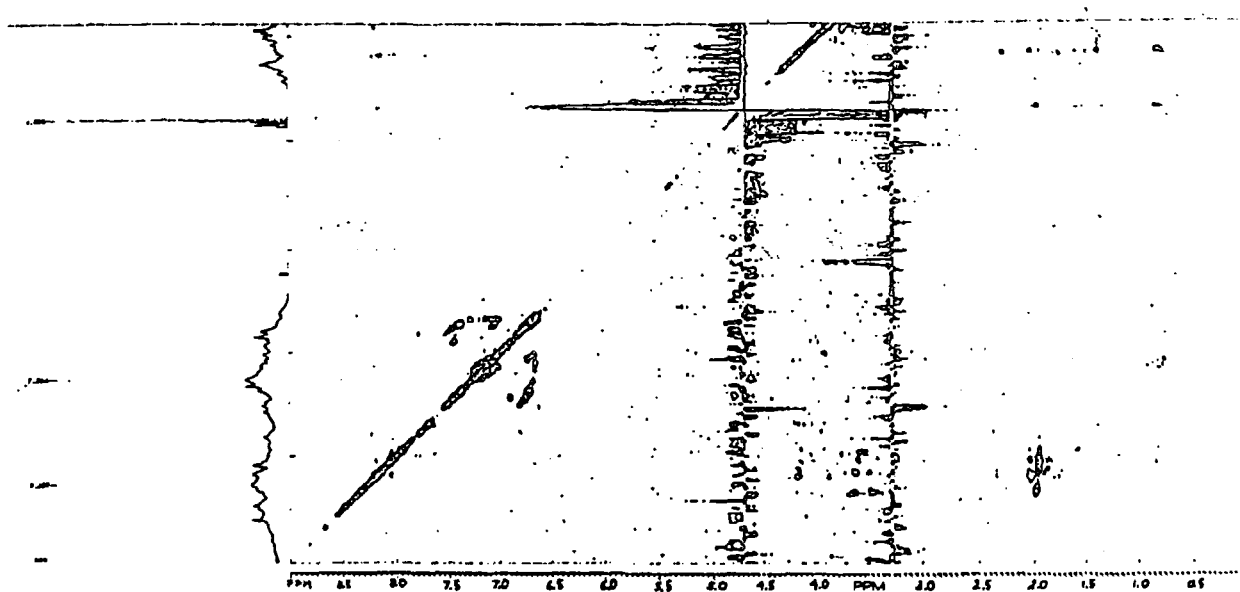
Rys. 1. Widma białka: natywnego (n) i kolejnych stopni redukcji (I-III)



Rys.2. Widmo regionu aromatycznego  $\text{I >NH/-NH}_2$  białka natywnego w  $\text{D}_2\text{O}$



Rys.3. Widmo NOESY regionu hydrofobowego natywnego RBP



Rys.4. Widmo NOESY natywnego białka rozpuszczonego w  $D_2O / H_2O$