

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МЕМБРАННЫХ ПРОТЕИНОВ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ РЕЗОНАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

П.В. Назаров¹, В.В. Апанасович¹, М.В.Репич¹, Р.В. Хесселинк², М.А. Хэмминга²,

¹ *Кафедра системного анализа, Белорусский Государственный Университет, пр. Скорыны 4, 220050, Минск, Беларусь. Fax: 2789345, e-mail: nazarov@bsu.by*
² *Laboratory of Biophysics, Wageningen University, Dreijenlaan 3, 6703 HA, Wageningen, The Netherlands, fax: +31 317 482044, e-mail: marcus.hemminga@wur.nl*

Разработка эффективных лекарственных препаратов на сегодняшний день невозможна без детальной информации о структуре и функциях мембранных протеинов (МП). Наиболее приемлемым способом изучения мембран и мембранных протеинов является метод флуоресцентной резонансной спектроскопии. В работе предложен подход к анализу флуоресцентных данных, основанный на имитационном моделировании структуры МП и фотофизических процессов в них.

Введение. Мембранные протеины выполняют целый ряд биологических функций, включая клеточное дыхание, передачу сигнала, молекулярный и ионный перенос. Однако, определение структуры мембранных протеинов все ещё проблематично: из более чем 15000 известных структур протеинов порядка 50 относятся к мембранным [1]. Сложность и хрупкость системы мембрана-протеин в значительной степени препятствуют применению стандартных методов изучения протеинов, таких как рентгеновская кристаллография и ЯМР [2]. Эти факторы вынуждают искать другой подход для изучения мембранных протеинов.

Успешной альтернативой вышеназванным методами является метод флуоресцентной спектроскопии резонансного переноса энергии (ФСРПЭ) [2; 3; 4; 5], позволяющий получать информацию о структуре в диапазоне 10-100 Å, что является достаточным для изучения геометрии мембранных протеинов и их комплексов. ФСРПЭ применялась для оценки внутренних и межмолекулярных расстояний в макромолекулярных системах, в частности – протеинов [5]. Однако использование ФСРПЭ сопряжено со значительными сложностями при анализе данных. Хотя аналитические решения для однородного планарного распределения доноров и акцепторов были получены ещё два десятилетия назад [6], сложность системы мембрана-протеин в значительной степени ограничивает возможности аналитической интерпретации данных [7]. В то же время, известно, что имитационное моделирование фотофизических процессов в экспериментальной системе является мощным инструментом, позволяющим анализировать даже чрезвычайно сложные системы. Мето-

дология имитационного моделирования для анализа данных ФСРПЭ была описана в работах Яцкова [8], Берни [7], Назарова [9].

Методология анализа данных с помощью моделирования была применена для получения информации о поведении двух мембранных протеинов: оболочечного протеина бактериофага M13 [10] и Vph1 домена вакуольной АТФазы остеокластов. Изучение поведения последнего играет принципиальную роль при разработке новых лекарственных препаратов против остеопороза.

Спектроскопия резонансного переноса энергии. Идея ФСРПЭ, базирующаяся на диполь-дипольном безизлучательном переносе энергии, первоначально была разработана Фёрстером [4] и в дальнейшем усовершенствована Страйером [5]. Изучаемые макромолекулы (в нашем случае – мембранные протеины) помечаются флуоресцентными метками двух типов: доноры и акцепторы [3], причем в качестве донора и/или акцептора зачастую используют естественные аминокислотные остатки протеинов – Трп и Туг [2]. Спектр испускания донора и спектр поглощения акцептора должны перекрываться. Доноры возбуждаются внешним источником света, как правило, низкоинтенсивным лазером. Возбужденная молекула донора может дезактивировать двумя путями: испустив кванта света либо передав энергию акцептору посредством диполь-дипольного безизлучательного переноса. На основании информации о флуоресценции донора и/или акцептора делают вывод о величине эффективности переноса энергии, которая несет информацию о пространственном распределении меток [3; 6; 8; 9].

Методика определения параметров. Метод идентификации параметров систем с помощью имитационного моделирования был разработан для определения физических и химических параметров сложных систем, которые не могут быть полностью описаны аналитическими выражениями. Суть метода состоит в следующем. Строится имитационная модель экспериментальной системы. Проводя ряд экспериментов над системой, получают набор экспериментальных данных. Делается предположение о значениях искомым параметров, которые подаются на вход имитационной модели. Смоделированные данные сравниваются с экспериментальными. На основании сравнения алгоритм оптимизации корректирует входные параметры. Если ошибка расхождения данных не превышает допустимого значения, алгоритм оптимизации заканчивает свою работу. Входные параметры модели на последнем шаге являются оценкой искомым параметров системы [9].

Получение структурной информации о протеине бактериофага M13. Для проверки работоспособности разработанной методики был исследован основной оболочечный протеин бактериофага M13 (M13 major coat protein), поражающего *E. coli*. Этот не-

большой протеин состоит из 50 аминокислотных остатков (рис. 1). Большая часть протеина, внедренного в клеточную мембрану *E. coli*, находится в форме α -спирали (соответствующие аминокислотные остатки подчеркнуты). Поведение протеина было широко изучено в мембранных системах биофизическими методами [10; 11; 12; 13; 14], что позволяет проводить сравнение результатов анализа с ранее опубликованными данными. В качестве донора в системе использовался Trp в позиции 26, а акцептора – AEDANS [11]. Для прикрепления акцептора к определенным позициям были созданы мутанты протеина, содержащие Cys в позициях 7, 13, 16, 24, 38, 46. Протеин внедрялся в липидный слой, состоящий из DOPC:DOPG в соотношении 1:4 [9; 11; 14].

Была построена упрощенная структурная модель M13 м.с.р., в виде двух гибко связанных доменов в виде α -спиралей (рис. 1). С-домен представляет собой трансмембранную часть протеина, N-домен более подвижен и расположен на поверхности мембраны. [12; 14]. Кроме того, в модели присутствовали флуоресцентные метки. По получаемым в опытах спектрам возбуждения на длине волны флуоресценции акцептора делался вывод об эффективности переноса энергии в системе.

В результате фитинга моделью были получены следующие значения пространственных параметров протеина.

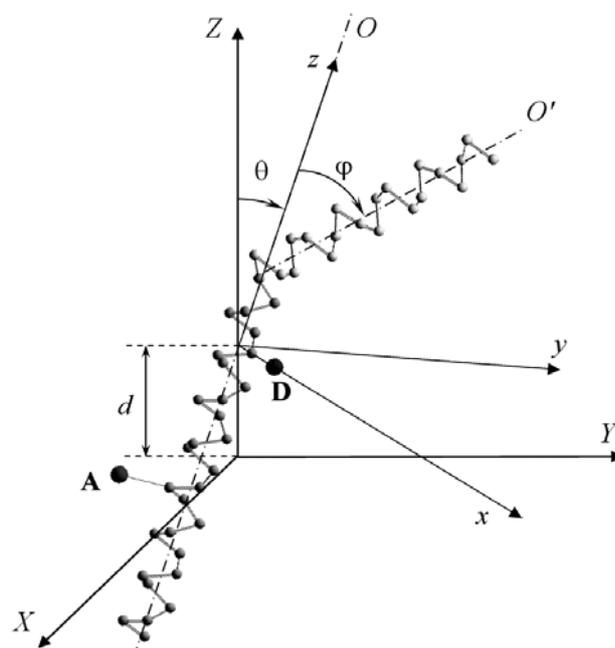


Рис. 1. Упрощенная структурная модель M13 м.с.р. На рисунке (X, Y, Z) – система координат связанная с мембраной (ось Z – нормаль к ней); (x, y, z) – система координат связанная с протеином; A, D – флуоресцентные метки; d – глубина протеина; θ – наклон трансмембранной части; φ – наклон N-домена.

Таблица 1. Пространственные параметры M13 м.с.р.

Параметр	Найденное значение	Значение в литературе
Наклон трансмембранной части, θ	$25 \pm 7^\circ$	23° , Koehorst [14]
Глубина нахождения Trp(26), d	$8 \pm 1 \text{ \AA}$	9 \AA , Koehorst [14]
Наклон N-домена протеина, φ	$73 \pm 4^\circ$	–
Вероятность образования протеин-протеиновых комплексов, k	0.03 ± 0.02	~ 0 , Fernandes [13]

Ингибирование вакуольной АТФазы остеокластов. Вакуольные АТФазы (рис. 2А) являются каналами передачи протонов через биомембраны различных клеток и их органелл. Их функция состоит в повышении кислотности внутренней или внешней клеточной среды в процессах лиганд-рецепторной диссоциации, нацеливания ферментов, резорбции костной ткани. В последнем случае повышенная активность В-АТФазы остеокластов может привести к широко распространенному заболеванию остеопорозом. Это делает актуальным поиск и анализ поведения специфических ингибиторов В-АТФазы остеокластов.

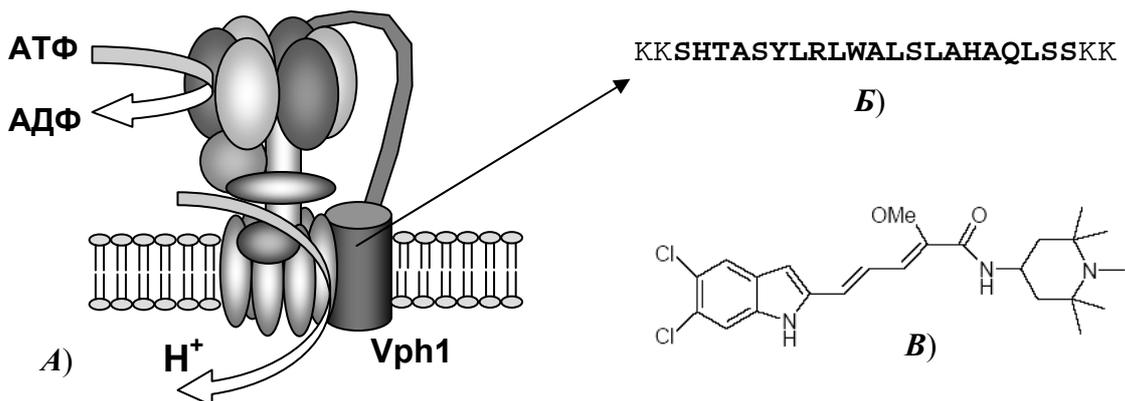


Рис. 2. Вакуольная АТФаза и Vph1 субъединица (А), исследуемый пептид S1 – часть Vph1 (Б), ингибитор (В)

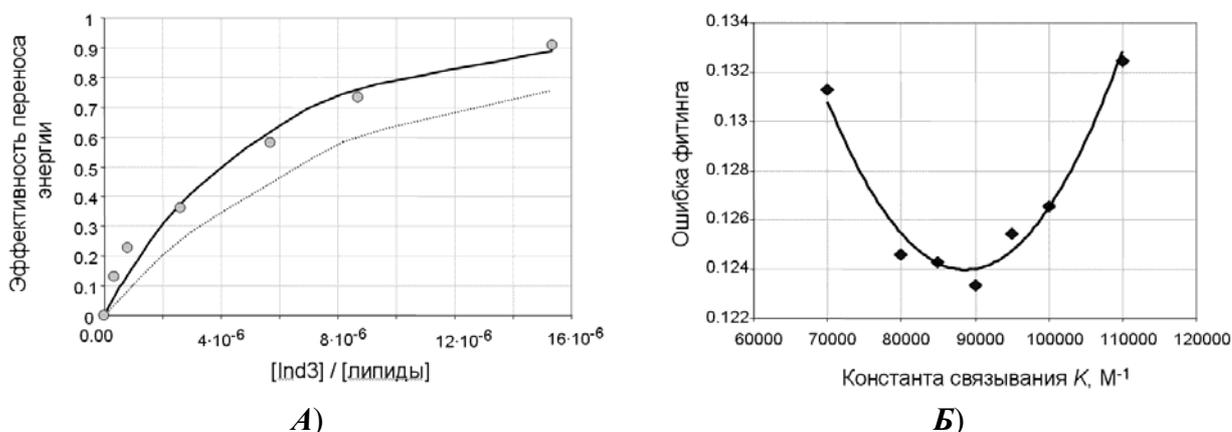


Рис. 3. Эффективность переноса энергии (А): экспериментальные значения (○), смоделированные значения при $K=0 \text{ M}^{-1}$ (---) и смоделированные значения при $K=87000 \text{ M}^{-1}$ (—). На рисунке (Б) представлен вид ошибки при подгонке константы связывания: рассчитанные значения (◆) и аппроксимация вида ошибки (—).

В данной работе исследовалось взаимодействие потенциального ингибитора ряда индола Ind-3 (рис. 2Б) с Vph1 субъединицей В-АТФазы. Нами рассматривался трансмембранный пептид S1 – функциональная часть Vph1 субъединицы. При изучении методом резонансного переноса энергии в качестве донора использовался Тгр, в качестве акцептора – индольная часть Ind-3. Найденное расстояние Фёрстера для этой донор-акцепторной пары

составило $\sim 33\text{\AA}$. Как и в случае с M13 т.с.р. пептиды S1 внедрялись в липидные везикулы DOPC:DOPG. При добавлении к раствору везикул ингибитор, будучи слабо полярным, переходит внутрь мембраны.

Из экспериментов были получены значения эффективности переноса энергии для различных концентраций ингибитора (рис 3А). Был осуществлен фитинг моделью, причем подгоняемым параметром являлась константа связывания ингибитора с пептидом. Найденное значения константы связывания $K = 87000 \pm 3000 \text{ M}^{-1}$. Для иллюстрации точности определения параметров был построен график зависимости отклонения смоделированной эффективности переноса энергии от экспериментальной (рис 3Б).

Выводы. Предложенный метод анализа данных флуоресцентного эксперимента позволяет определять физические параметры сложных биомолекулярных систем – мембран с внедренными протеинами. Методика позволила получить информацию о конформации и олигомеризации вирусного протеина бактериофага M13 в модельных мембранах. С помощью разработанных моделей и методов проведен анализ связываемости вакуольной АТФазы остеокластов с ингибитором индольного ряда. Показана потенциальная применимость ингибитора. Следует отметить, что разработанные модели и методика могут быть легко адаптированы и к другим мембранным протеинам.

Литература

1. Arora A, Tamm L.K. *Curr. Opin. Struct. Biol*, **11**, 540 (2001).
2. dos Remedios CG, Moens PDJ. *J. Struct. Biol*, **115**, 175, (1995)
3. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.
4. Förster, T. *Ann. Phys*, **2**, 55, (1948)
5. Stryer, L. *Annu. Rev. Biochem*, **47**, 819, (1978).
6. Davenport L, Dale R.E, Bisby H.R, Cundall R.B. *Biochemistry*, **24**, 4097, (1985).
7. Berney C, Danuser G. *Biophys. J.* **84**, 3992, (2003).
8. Yatskou M.M., Donker H., Novikov E.G., Koehorst R.B.M., van Hoek A., Apanasovich V.V., Schaafsma T.J. *J. Phys. Chem. A*, **105**, 9498, (2001).
9. Nazarov P.V., Apanasovich V.V, Lutkovski V.M, Yatskou M.M, Koehorst R.B.M, Hemminga M.A. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **44**, 568, (2004).
10. Meijer A.B, Spruijt R.B, Wolfs C.J.A.M, Hemminga M.A. *Biochemistry*, **40**, 5081, (2001).
11. Spruijt, R. B., Meijer A.B, Wolfs C.J.A.M, Hemminga M.A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1509**, 311, (2000).
12. Stopar D., Spruijt R.B, Wolfs C.J.A.M, Hemminga M.A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1594**, 54, (2002).
13. Fernandes F, Loura LMS, Koehorst RBM, Spruijt RB, Hemminga MA, Prieto M. *Biophys. J.* **87**, 344, (2004).
14. Koehorst R.B.M , Spruijt R.B, Vergeldt F.J, Hemminga M.A. *Biophys. J.* **87**, 1445, (2004).