



МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МЕМБРАННЫХ ПРОТЕИНОВ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ РЕЗОНАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

П. В. Назаров*, М. А. Хэмминга**, В. В. Апанасович*

** Кафедра системного анализа,
Белорусский Государственный
Университет
пр. Скорыны 4, 220050,
Минск, Беларусь.
fax: 2789345, e-mail: nazarov@bsu.by*

*** Laboratory of Biophysics,
Wageningen University
Dreijenlaan 3, 6703 HA,
Wageningen, The Netherlands.
fax: +31 317 482044,
e-mail: marcus.hemminga@wur.nl*



Мембранные протеины



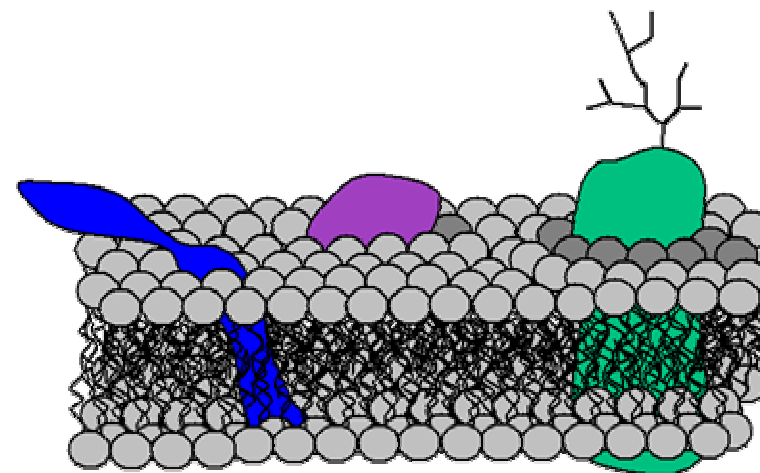
Актуальность

Мембранные протеины участвуют в большинстве жизненно важных биохимических и биофизических реакций клеток. Поэтому разработка эффективных лекарственных препаратов невозможна без детальной информации о структуре и функциях мембранных протеинов.

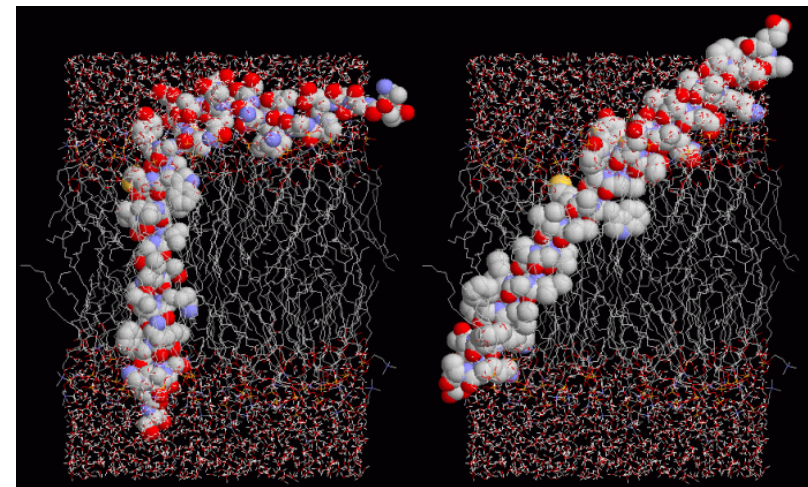
Изучение мембранных протеинов

Система протеины-биомембрана является чрезвычайно хрупкой и в то же время сложной. Эти особенности не позволяют использовать для изучения структур мембранных протеинов такие стандартные подходы как рентген- и электронная спектроскопия, ЯМР.

Одним из наиболее чувствительных способов изучения мембран и мембранных протеинов по праву считается метод флуоресцентной резонансной спектроскопии, не вносящий значительных искажений в исследуемую систему.



Мембрана с внедренными протеинами



Различные конформации мембранного протеина бактериофага M13



Спектроскопия резонансного переноса энергии

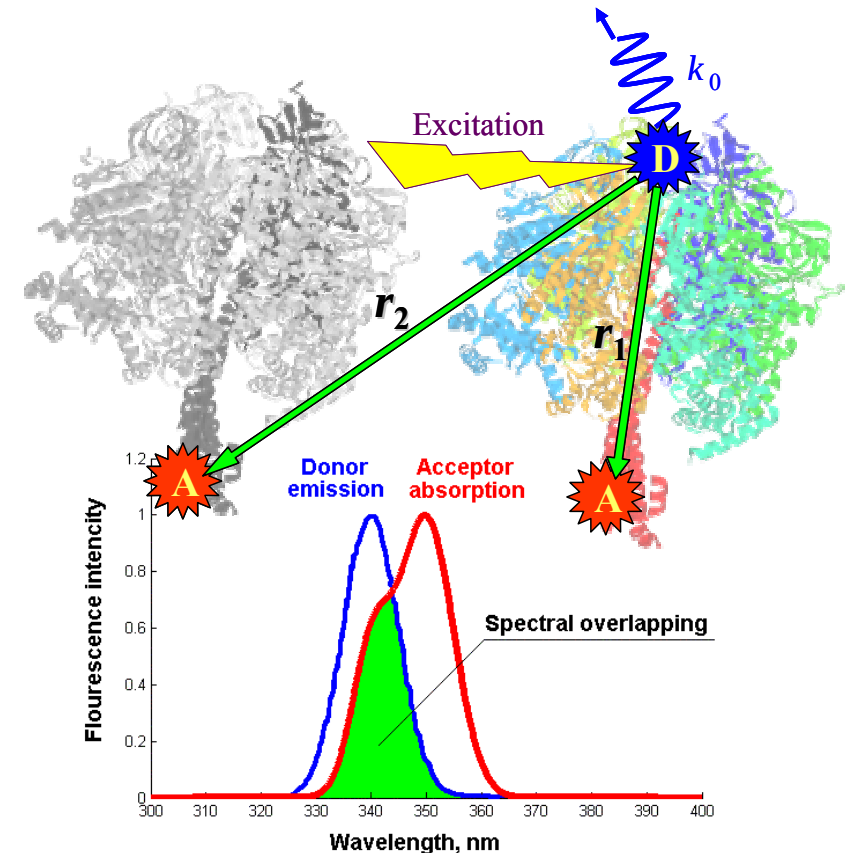


Флуоресцентная спектроскопия резонансного переноса энергии (FRET) основана на эффекте безизлучательного переноса возбуждения по механизму Фёрстера [2]. Она является важнейшим инструментом при изучении меж и внутри молекулярных расстояний в сложных биомолекулярных образованиях.

В изучаемую систему вводят флуоресцентные метки 2х типов: доноры (**D**) и акцепторы (**A**). **D** возбуждаются внешним источником и передают возбуждение **A**. **Эффективность переноса энергии** (ЭПЭ) обратно пропорциональна 6-й степени расстояния между **D** и **A** (1). Расстояние в **DA** паре, при котором ЭПЭ равна 50% называют *дистанцией Фёрстера* R_0 (1,2) [1].

Наблюдая флуоресценцию **D** либо **A** (в виде кривых затухания флуоресценции (2) либо спектров) делают вывод о геометрии системы: внутримолекулярных расстояниях (10÷100Å), распределении молекул в пространстве и т.д.

Экстракция пространственных параметров из данных флуоресцентного эксперимента весьма сложна, поскольку не существует аналитических выражений описывающих математическую модель процесса переноса в общем случае [1,3].



Эффективность (вероятность) переноса энергии

$$E = \sum_i (R_0/r_i)^6 / \left[1 + \sum_i (R_0/r_i)^6 \right] \quad (1)$$

Флуоресценция донора

$$F_D^{(A)}(t) = F_0 \cdot e^{-k_D t + G(R_0, \{r_i\}, k_D, t)} \quad (2)$$



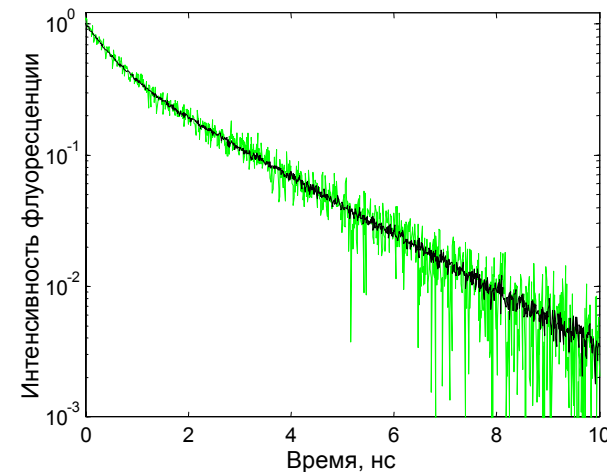
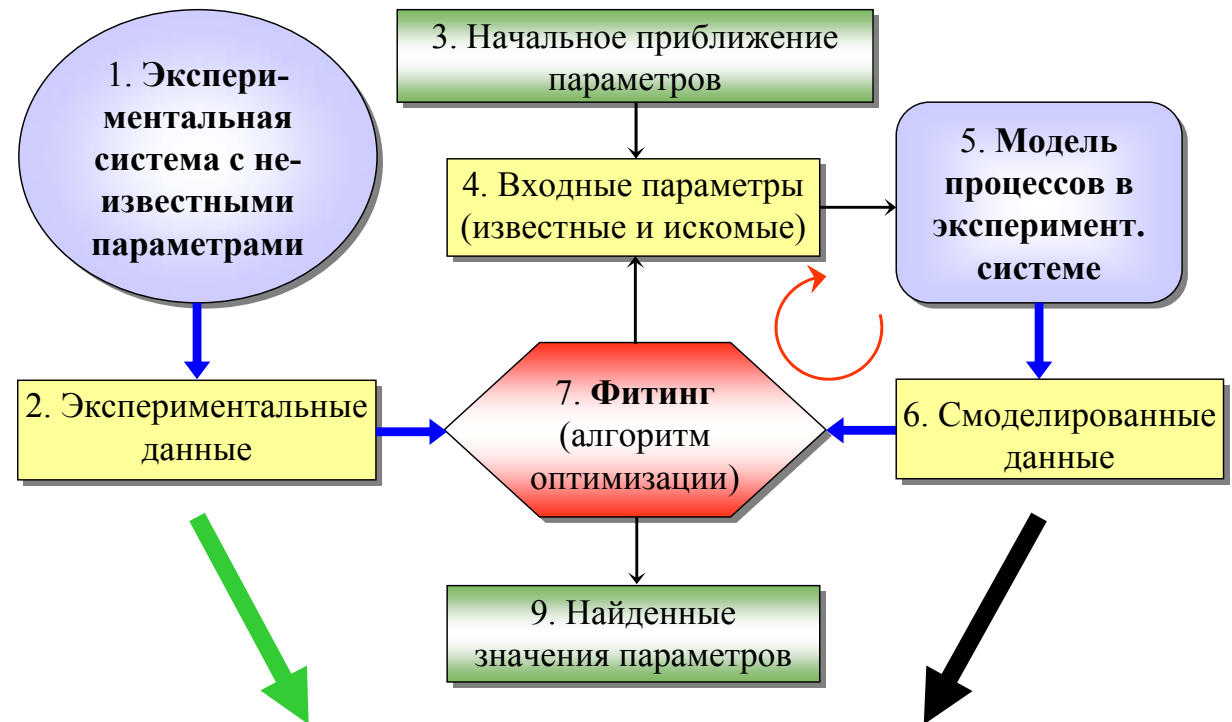
Анализ данных с помощью имитационного моделирования



Для детального анализа данных предложен метод, основанный на **моделировании фотофизических процессов** в изучаемой системе. В этом методе параметры имитационной модели подбираются таким образом чтобы приблизить данные получаемые путем моделирования к экспериментальным.

Метод остаётся работоспособным даже при анализе чрезвычайно **сложных биомолекулярных систем**. Одной из наиболее важных черт метода является то, что он даёт возможность работать напрямую с **физическими параметрами** [3].

Описанный в данной работе подход был применен для изучения топологии вирусного протеина бактериофага М13, а также для определения константы связывания вакуольной АТФазы остеокластов с ингибитором ряда индола.





Изучение вирусного протеина бактериофага M13



Экспериментальная система

Исследовался трансмембранный протеин бактериофага M13 (*M13 major coat protein*) состоящий из 50 аминокислотных остатков [4].

При исследовании создавались Cys-мутанты M13 тср, маркируемые флуоресцентной меткой AEDANS (акцептор). В качестве донора им использовался Trp(26).

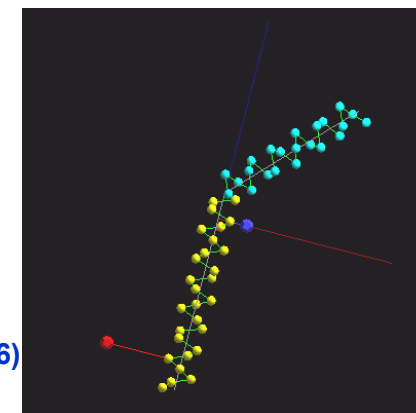
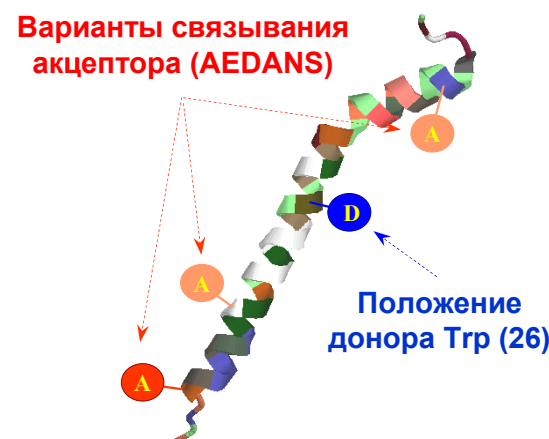
Протеины внедрялись в мембрану состоящую из липидов DOPC:DOPG в соотношении 4:1.

Найденные параметры

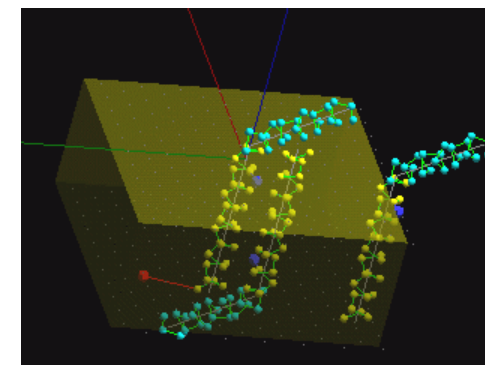
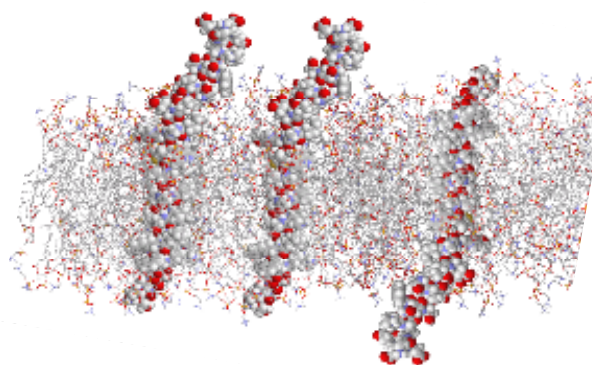
- Положение протеина в мембране
 - Trp (26) находится на расстоянии $9 \pm 1 \text{ \AA}$ от центра мембраны.
 - наклон оси трансмембранной части составляет $\sim 25 \pm 5^\circ$.
- Геометрия протеина
 - наклон верхнего домена $70 \pm 5^\circ$.
 - позиция перегиба 19 ± 1 .
- Вероятность объединения протеинов в олигомеры или кластеры – $3 \pm 2\%$

Пространственные модели

AEGDDPAKAAAFNSLQASATE-
-YIGYAWAMVVVIVGATIGIKLFFKKFTSKAS



Протеин M13 и его пространственная модель



Мембрана и её пространственная модель

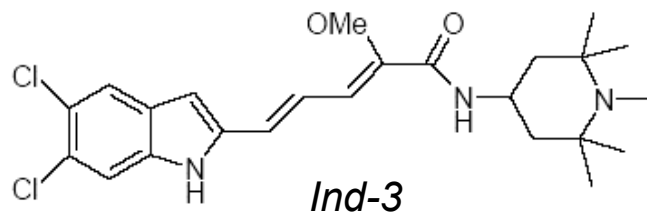


Вакуольная АТФаза остеокластов

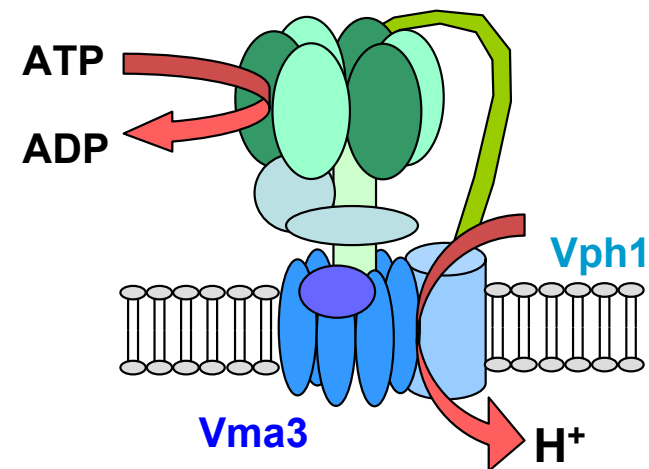


Вакуольные АТФазы являются каналами передачи протонов через биомембраны различных клеток и их органелл. Их функция состоит в повышении кислотности внутренней или внешней клеточной среды в процессах лиганд-рецепторной диссоциации, нацеливания ферментов, резорбции костной ткани. В последнем случае повышенная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

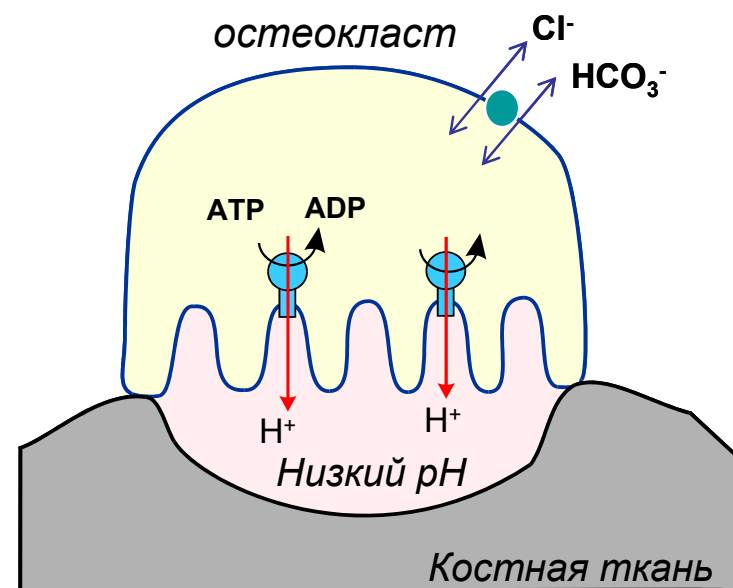
В данной работе исследовалось взаимодействие потенциального ингибитора ряда индола (Ind-3) с Vph1 субюнитом данного протеина. При изучении методом резонансного переноса энергии Trp одного из трансмембранных участков Vph1 использовался в качестве донора, а индольная часть Ind-3 – в качестве акцептора. Найденное R_0 для этой DA пары составило $\sim 33 \text{ \AA}$.



Потенциальный ингибитор В-АТФазы остеокластов



Вакуольная АТФаза остеокластов



Остеокласт на костной ткани



Изучение связываемости Ind-3 с цепочкой Vph1 вакуольной АТФ-азы остеокластов



Экспериментальная система

Трансмембранный пептид S1 (часть Vph1)

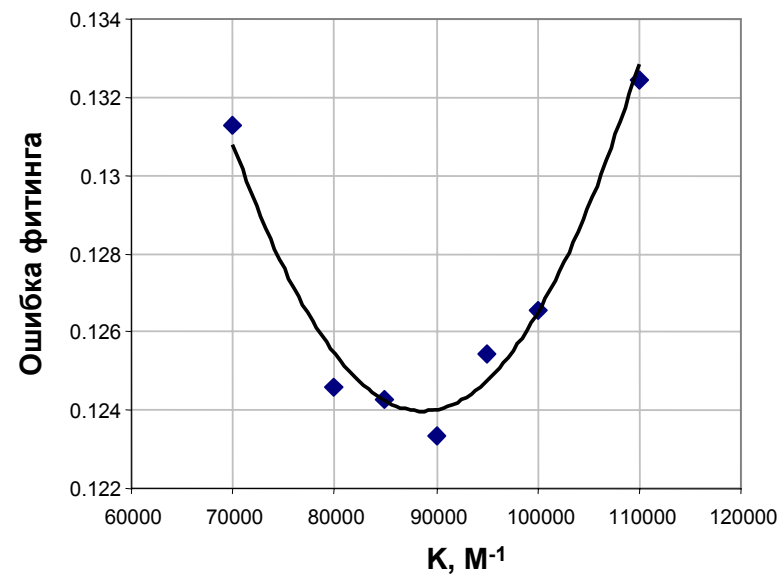
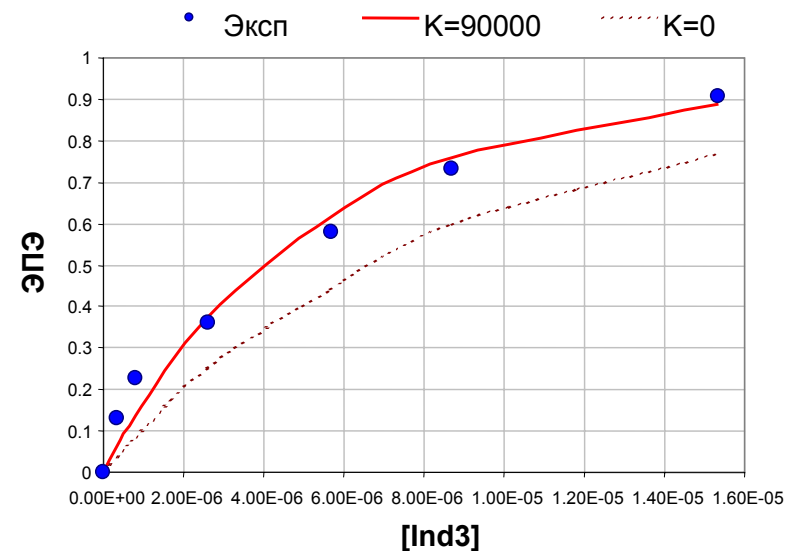
KKSHTASYLRLWALS^WLAHAQLSSKK

внедрялся в везикулы (модель мембраны) состоящие из липидов DOPC:DOPG в соотношении 4:1. К полученному раствору липидных везикул добавлялся ингибитор Ind-3. Будучи слабо полярным он переходил внутрь липидного слоя. При возбуждении Trp(12) наблюдался перенос энергии Trp → Ind-3.

Константа связывания

С помощью фитинга смоделированной и экспериментальной эффективности переноса энергии (рис) была найдена константа связывания ингибитора Ind-3 с частью Vph1 субюнита В-АТФазы остеокластов

$$K = 87000 \pm 3000 \text{ M}^{-1}.$$





Выводы



- Предложенный метод анализа данных флуоресцентного эксперимента позволяет определять физические параметры сложных биомолекулярных систем – мембран с внедренными протеинами.
- Была получена информация о конформации и олигомеризации вирусного протеина бактериофага М13 в модельных мембранах.
- С помощью разработанных моделей и методов проведен анализ связываемости вакуольной АТФазы остеокластов с ингибитором индольного ряда. Показана потенциальная применимость ингибитора.

Литература

1. Lakowicz JR. 1999. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
2. Forster T. 1948. Intermolecular energy migration and fluorescence. Ann. Phys. 2:55-75.
3. Nazarov PV, Apanasovich VV, Lutkovski VM, Yatskou MM, Koehorst RBM, Hemminga MA. 2004. Artificial neural network modification of simulation-based fitting: application to a protein-lipid system. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 44:568-574.
4. Spruijt RB, Meijer AB, Wolfs CJAM, Hemminga MA. 2000. Localization and rearrangement modulation of the N-terminal arm of the membrane-bound major coat protein of bacteriophage M13. Biochim. Biophys. Acta 1509:311-323.