

Квантово-химические расчеты тиофлавина Т, специфического зонда на амилоидные фибриллы



В.И. Степура¹, А.А. Маскевич¹, В.А. Кузьмицкий², К.К. Туроверов³, И.М. Кузнецова³

¹Гродненский госуниверситет им. Янки Купалы, Гродно, Беларусь;

²Институт молекулярной и атомной физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Упорядоченная агрегация белков с образованием амилоидных фибрилл (Рис.1) и накопление их в различных тканях и органах приводит к возникновению ряда тяжелых заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания Альцгеймера и Паркинсона, катаракта, злокачественная миелома, прионные болезни и др. Для детекции образования амилоидных фибрилл широко используется тиофлавин Т (ThT) [1,2], образующий интенсивно флуоресцирующий комплекс с амилоидными фибриллами (Рис.2).

С целью выяснения механизма существенного возрастания интенсивности флуоресценции ThT при связывании с амилоидными фибриллами были проведены квантово-химические расчеты молекулы зонда в основном и возбужденном электронных состояниях.

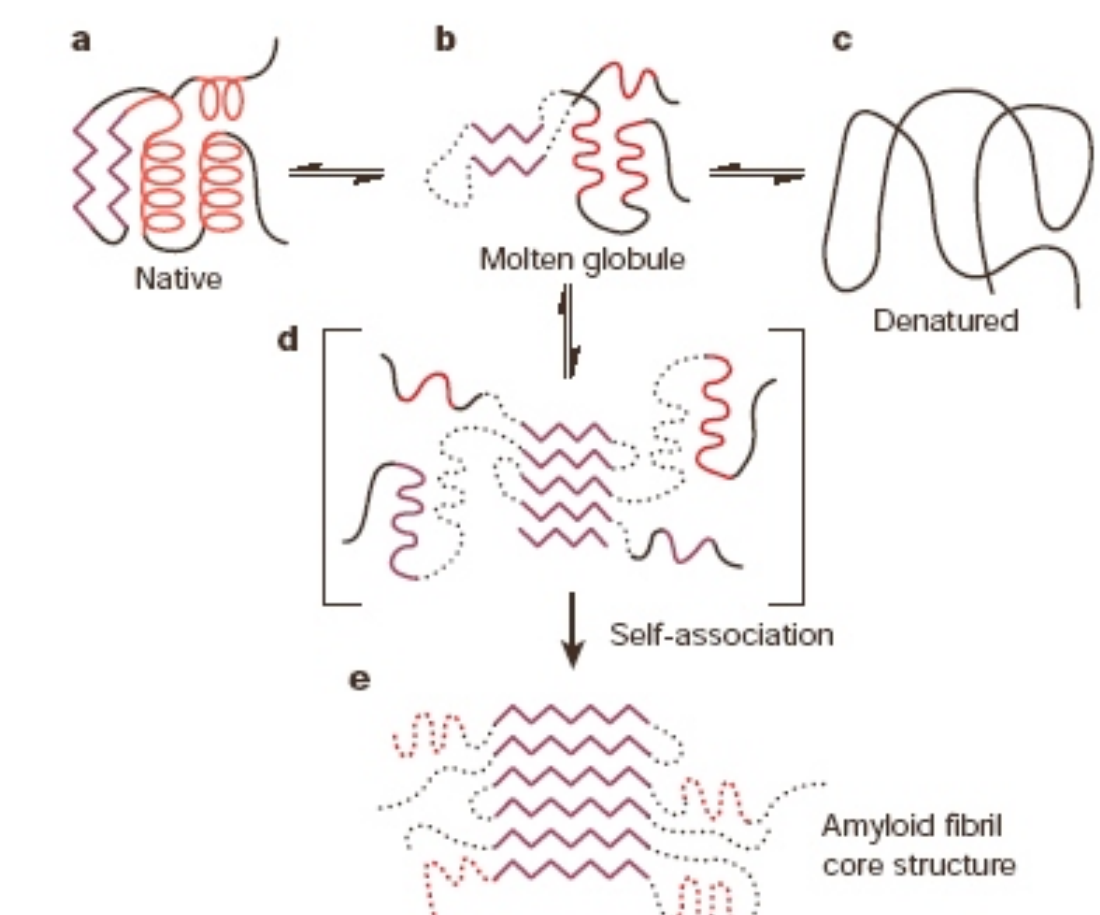


Рис.1. Схема образования амилоидных фибрилл [3]. а - нативное состояние белка, б - белок в форме расплавленной глобулы, с - денатурированный белок, д- внутрибелковая ассоциация фрагментов с -складчатой структурой, е- межбелковая ассоциация с образованием амилоидных фибрилл

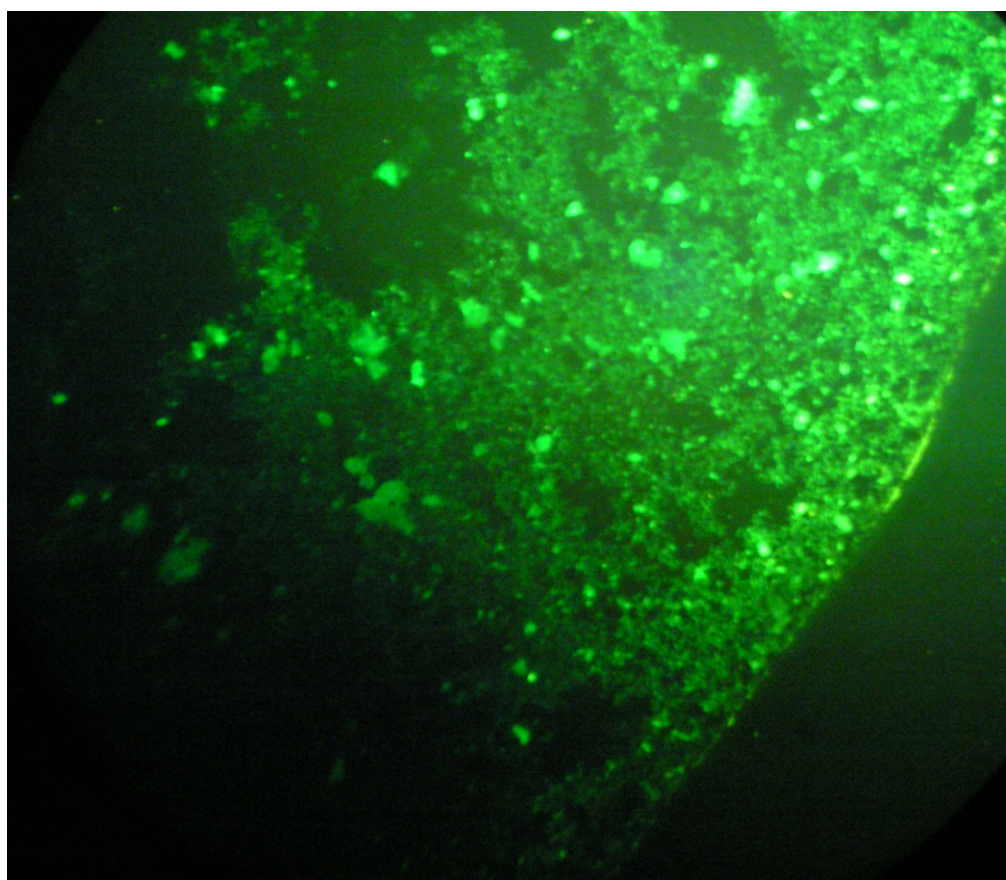


Рис.2. Конфокальное флуоресцентное изображение амилоидных фибрилл, окрашенных тиофлавином Т, на поверхности стекла

Полуэмпирические (AM1,PM3) и *ab initio* расчеты выполнялись с использованием пакета квантово-химических программ GAMESS-US [4]. Определение энергии возбужденных состояний, вероятности переноса заряда и силы осциллятора электронных переходов были выполнены с использованием пакета программ, разработанных одним из авторов (Кузьмицкий В.А.).

В молекуле ThT можно выделить три фрагмента: бензтиазольное кольцо (фрагмент I), бензольное кольцо (фрагмент II) и диметиламино группу (фрагмент III) (рис. 3А) с достаточно жесткой геометрической структурой. Конформация молекулы может быть определена двумя торсионными углами (N5-C6-C12-C13) и (C14-C15-N18-C19), задающими соответственно ориентации фрагмента II относительно фрагмента I и фрагмента III относительно фрагмента II (рис. 3В).

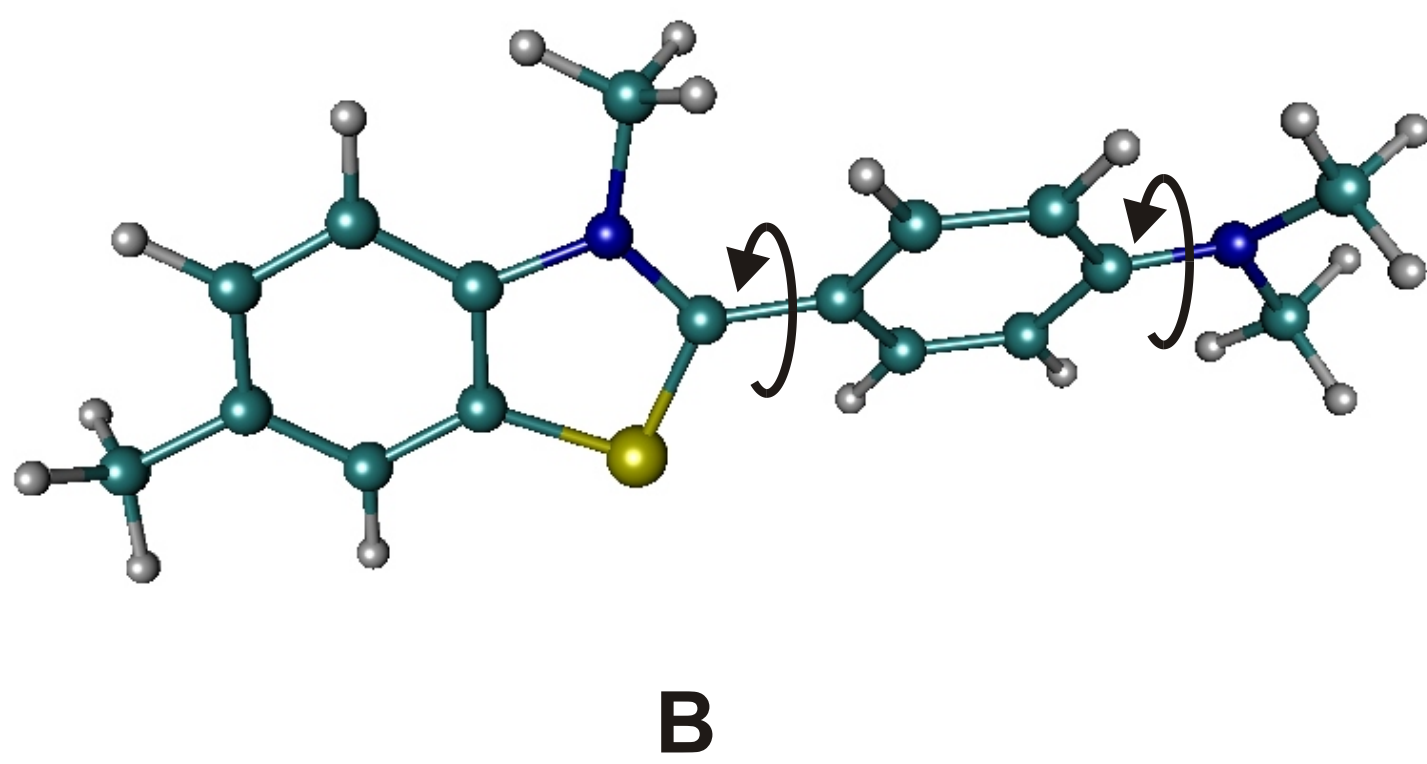
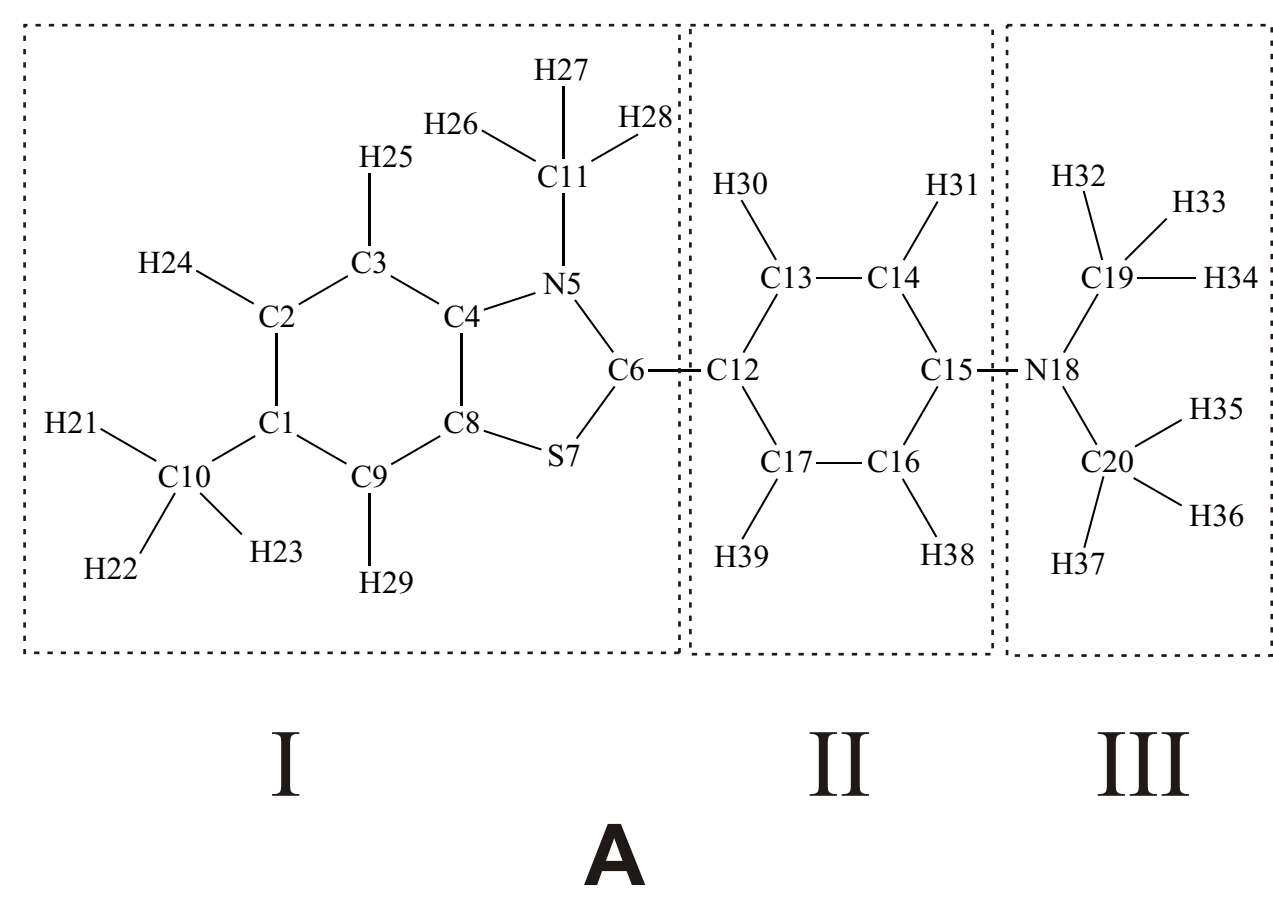


Рис. 3. Структура молекулы тиофлавина Т. А - структурная формула с нумерацией атомов. Штриховыми линиями указаны фрагменты молекулы. В- трехмерное изображение молекулы с указанием углов и .

На основании расчетов полуэмпирическими методами AM1 и PM3 была определена зависимость энергии основного состояния E_{S_0} (,) молекулы ThT (Рис. 4). Расчеты показывают, что в состоянии S_0 угол между плоскостями бензтиазольного и бензольного колец составляет ~ 37 градусов (Рис. 4,5), а фрагменты II и III копланарны. Энергетический барьер между соседними минимумами потенциальной поверхности E_{S_0} (,) при изменении угла невелик и составляет $E \sim 700 \text{ см}^{-1} - 1000 \text{ см}^{-1}$ (в зависимости от метода расчета) (Рис. 5). Аналогичная величина энергетического барьера, отвечающего вращению диметиламинной группы, в три-четыре раза выше $\sim 2800 \text{ см}^{-1}$ (Рис. 4).

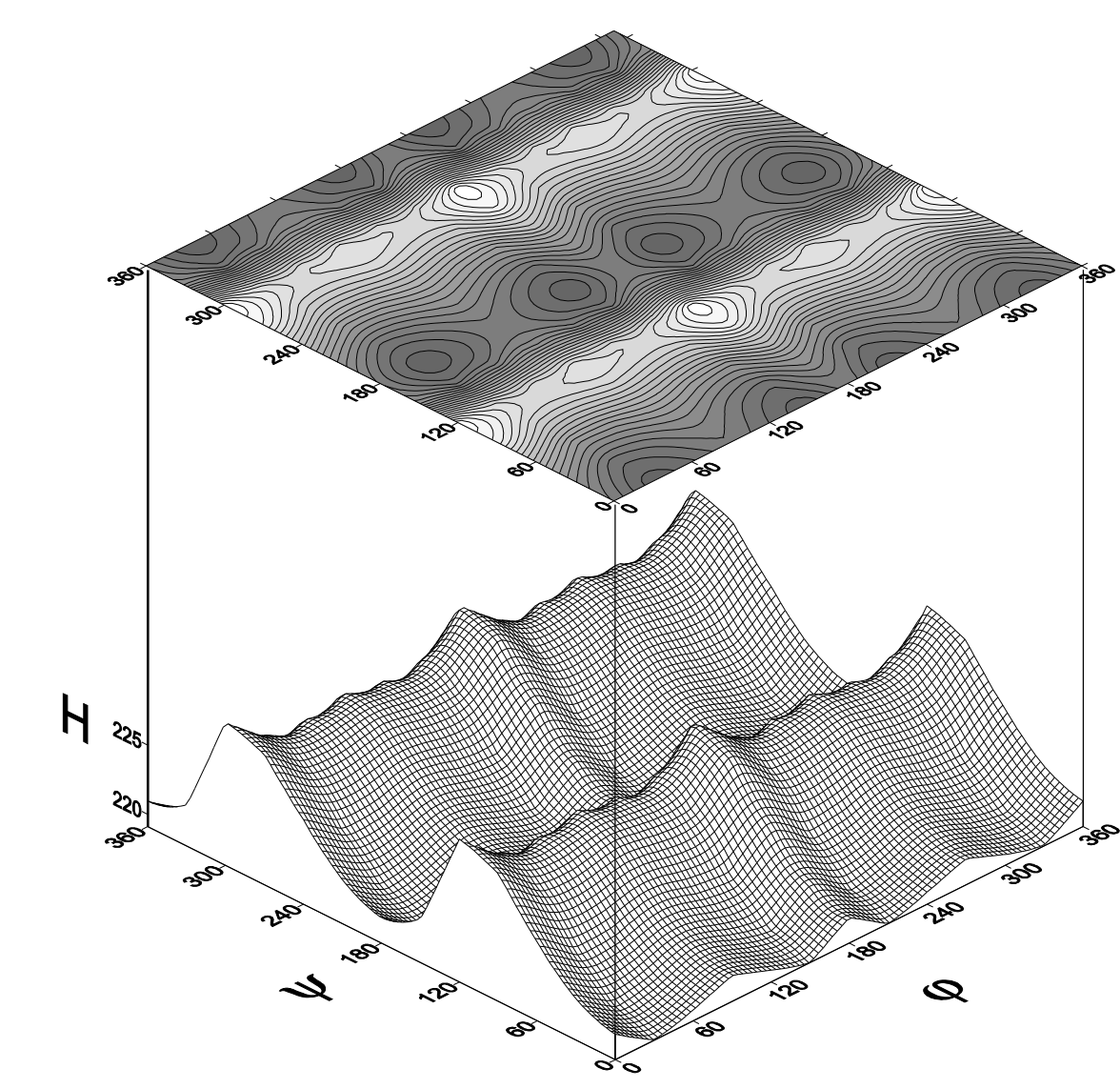


Рис. 4. Зависимость энергии основного E_{S_0} состояния ThT от углов и . Расчет методом AM1.

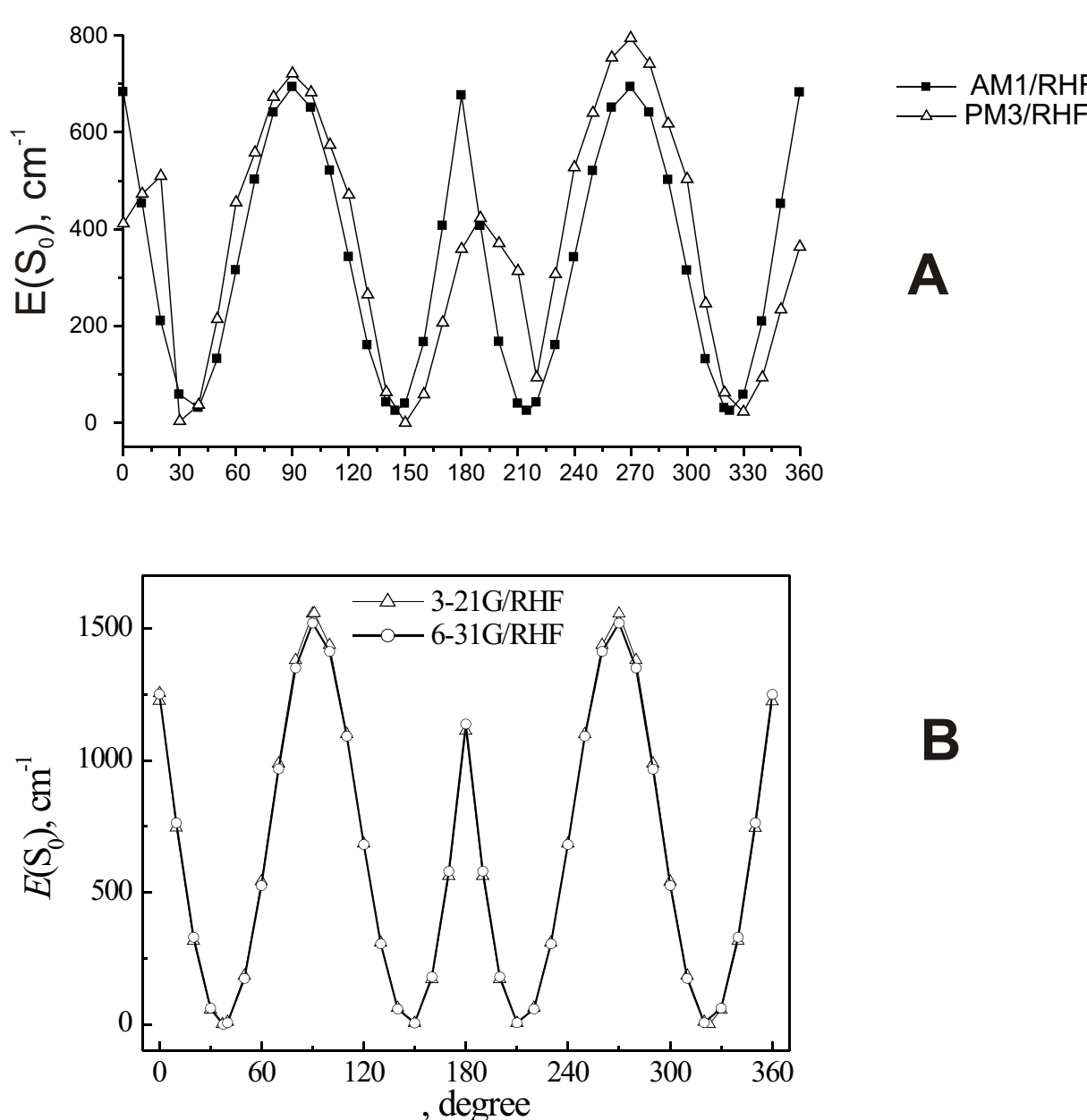


Рис. 5. Зависимость энергии основного E_{S_0} состояния ThT от угла . А - Расчет методами AM1 и PM3. В - расчет *ab initio* в базисах 3-21G и 6-31G.

Было обнаружено, что при переходе ThT в возбужденное состояние происходит внутримолекулярный перенос заряда между фрагментами I и II молекулы (Рис.6,9), а энергия франк-кондоновского состояния $E_{S_1^{(norm)}}$ в зависимости от угла имеет минимум вблизи 90 градусов (Рис. 7). На основании этого можно сделать предположение о том, что после перехода в возбужденное состояние $S_1^{(norm)}$ молекула будет испытывать конформационную перестройку (торсионную релаксацию), сопровождающуюся изменением угла от 37 до 90°. При этом образующееся состояние характеризуется практически нулевым значением осциллятора электронного перехода (Рис.8), т.е. является нефлуоресцирующим.

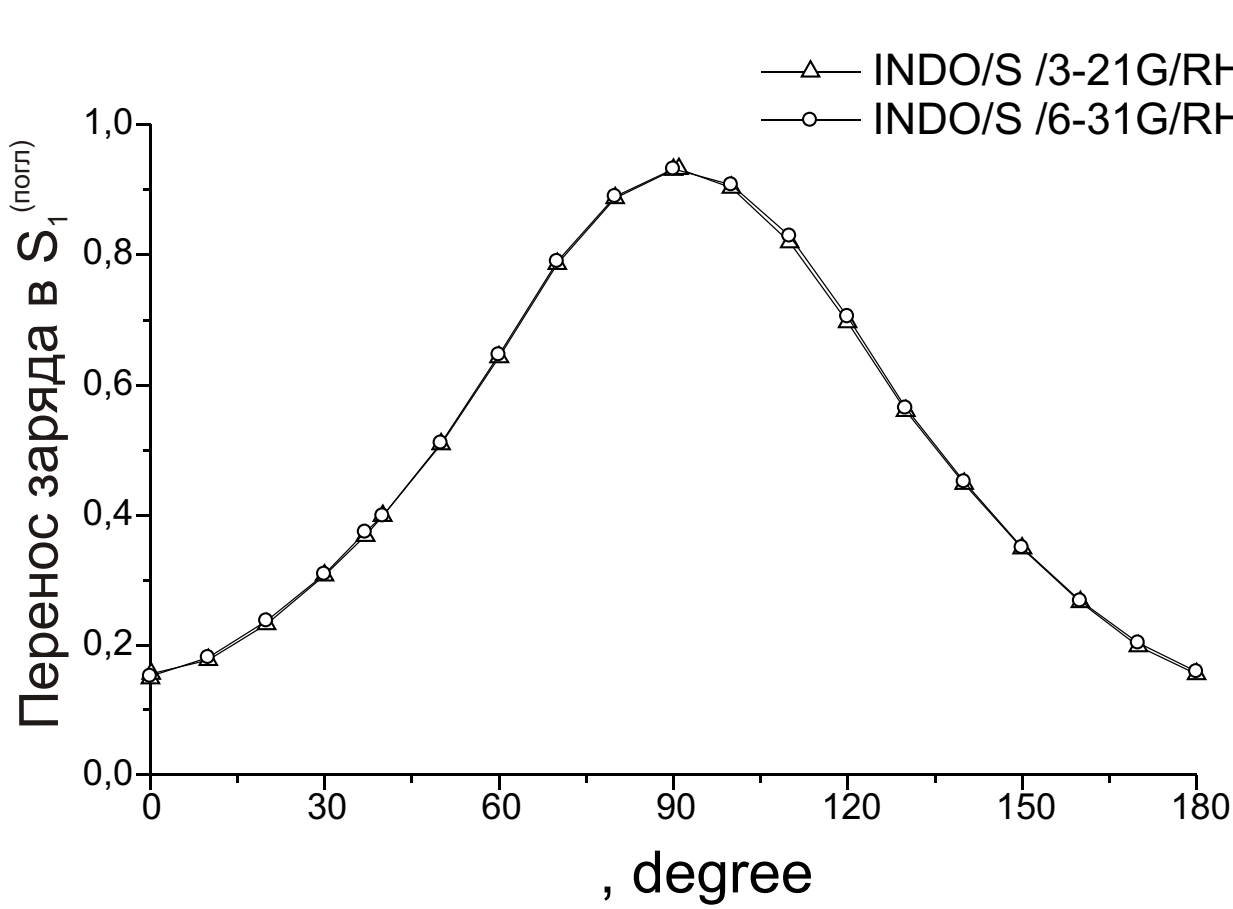


Рис. 6. Зависимость доли заряда, перенесенного при фотовозбуждении между фрагментами I и (II+III), от . Расчет методом Indo/S. Геометрия основного S_0 состояния оптимизирована *ab initio* методом.

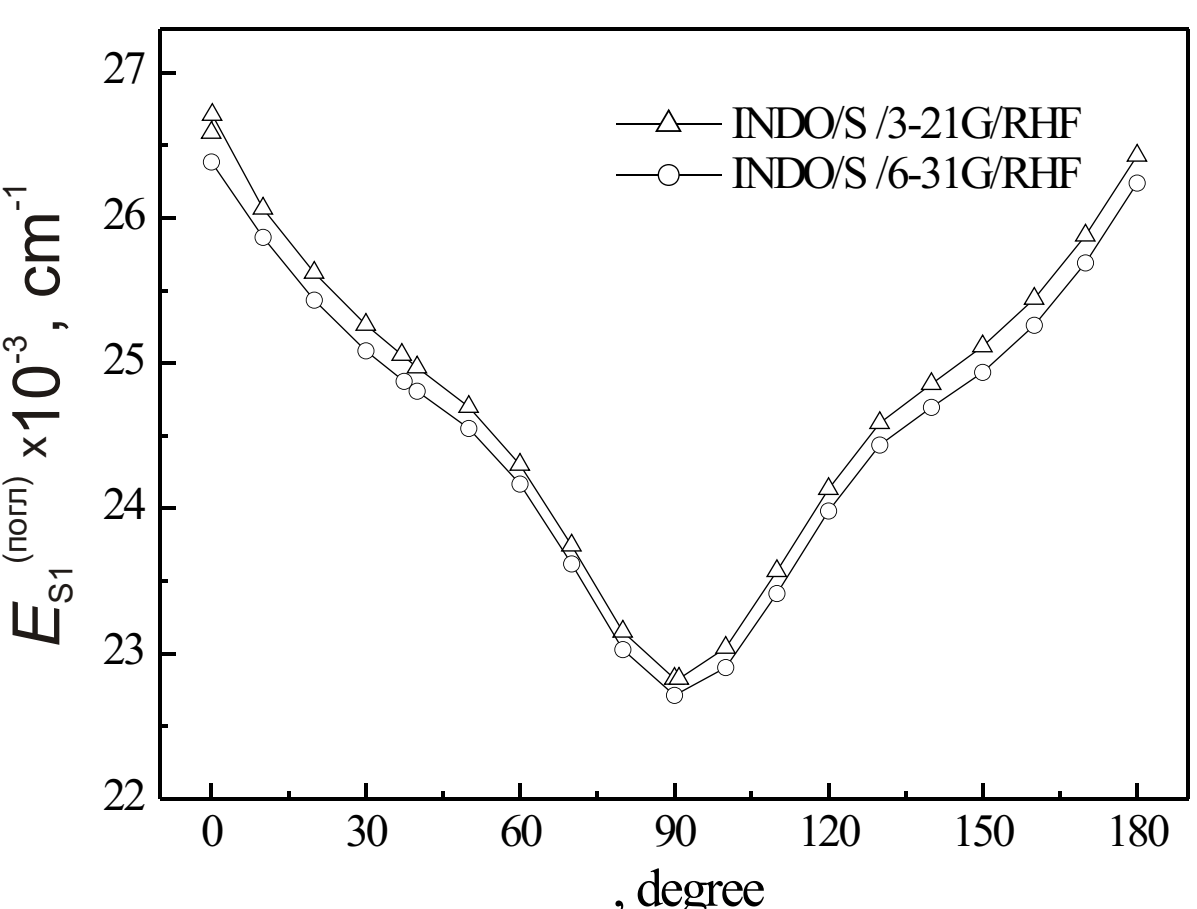


Рис. 7. Зависимость энергии возбужденного $E_{S_1^{(norm)}}$ франк-кондоновского состояния ThT от . Расчет методом Indo/S. Геометрия основного S_0 состояния оптимизирована *ab initio* методом.

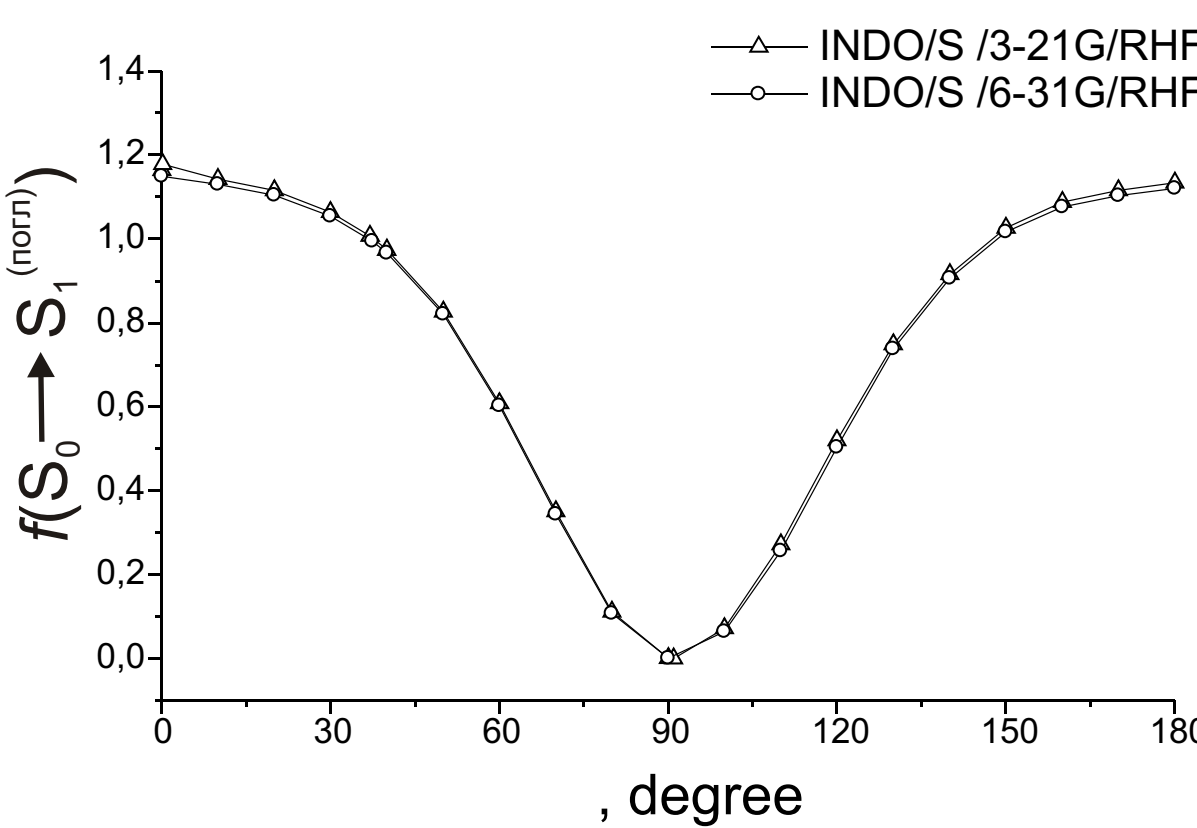


Рис. 8. Зависимость величины силы осциллятора электронного перехода $S_0 \rightarrow S_1^{(norm)}$ в ThT от угла . Расчет методом Indo/S. Геометрия основного S_0 состояния оптимизирована *ab initio* методом.

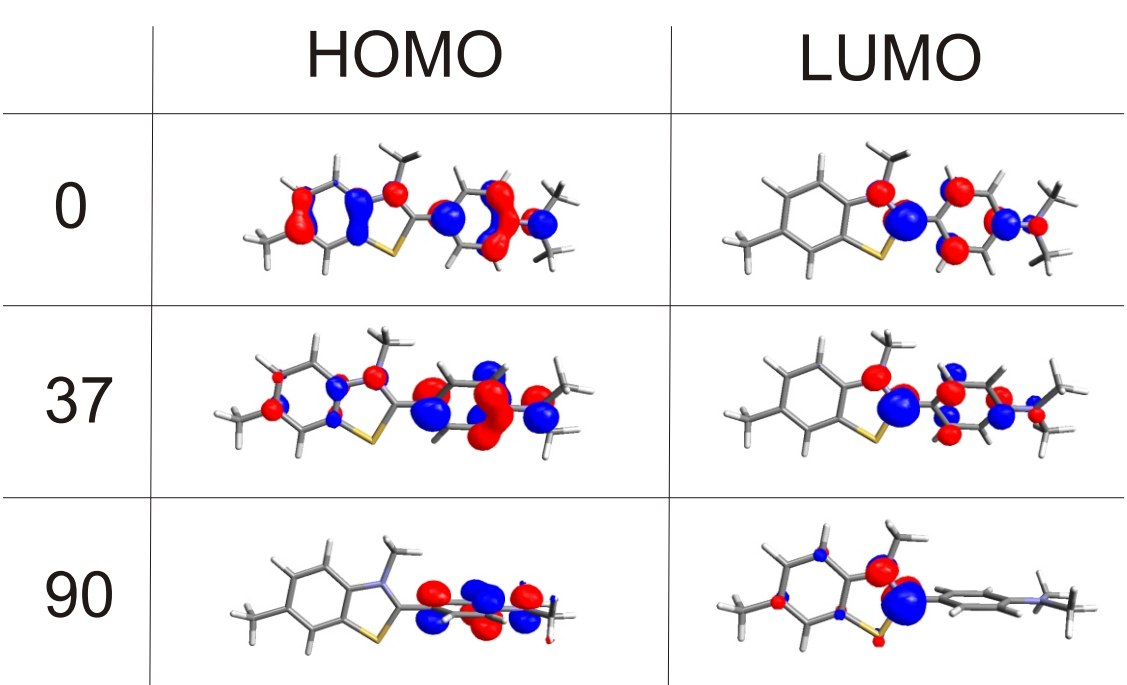


Рис.9. Форма граничных орбиталей (НОМО, LUMO) молекулы ThT для конформеров с различным углом . Геометрия конформеров в основном S_0 состоянии оптимизирована *ab initio* методом.

Процесс торсионной релаксации в возбужденном состоянии, приводящий к тушению флуоресценции ThT, будет являться эффективным в случае маловязких растворителей. Мы полагаем, что блокирование данного релаксационного процесса посредством увеличения вязкости (Таблица 1) или жесткости микроокружения (например, образование комплекса с амилоидными фибриллами) и является причиной роста интенсивности флуоресценции зонда.

Таблица 1. Зависимость квантового выхода флуоресценции ThT в 99% глицерине от θ /Т.

θ /Т, сР/К	0.29	0.56	1.2	2.78	7.42	17.99
η	0.024	0.034	0.055	0.1	0.201	0.29

Благодарности

Работа была выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (гранты X04P-169, Ф06-351 и X06P-115) и 06-04-81033 Бел_a

Литература

- [1]. H. LeVine III, Thioflavin T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution // Protein Science 2 (1993), 404-410.
- [2]. Воропай Е.С. и др. Спектральные свойства тиофлавина Т и его комплексов с амилоидными фибриллами // ЖПС 70 (2003), 767-773.
- [3]. D.J. Selkoe// Nature.- 2003.- V.426.- P.900-905.
- [4]. Schmidt M.W. et al. // J. Comput. Chem.- 1993.- V.14.- P.1347-1363.