

Применение спектрофлуориметра ChronosDFD с цифровой обработкой сигнала в частотной области (ISS, США) в биохимических исследованиях.

Аннотация статьи:

SOLUTION-BINDING AND MOLECULAR DOCKING APPROACHES COMBINE TO PROVIDE AN EXPANDED VIEW OF MULTIDRUG RECOGNITION IN THE MDR GENE REGULATOR BmrR

Drew Gunio, John Froehlig, Katerina Pappas, Uneeke Ferguson, Herschel Wade.

Journal of Chemical Information and Modeling, 2016, 56(2), 377-89.

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ С РАЗРЕШЕНИЕМ ВО ВРЕМЕНИ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ В СОЧЕТАНИИ РАСШИРЯЮТ ЗНАНИЯ О МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РЕГУЛЯТОРА ГЕНА МЛУ БЕЛКА BmrR

Широкомасштабное применение антибиотиков сопровождается повсеместным распространением бактерий, устойчивых к лекарственным препаратам, в том числе бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Среди механизмов, обеспечивающих устойчивость бактерий к антибиотикам, важную роль играют эффлюкс системы, обеспечивающий активный вывод чужеродных соединений из клетки. К настоящему времени установлено, что эффлюкс системы являются основной причиной множественной лекарственной устойчивости у многих патогенных бактерий, простейших и грибов, в том числе у таких как сальмонелла кишечная *Salmonella enterica*, синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa*, молочница *Candida albicans*, малярийный плазмодий *Plasmodium falciparum* и др..

Недавние исследования многоклеточных организмов показали, что широкая лекарственная устойчивость раковых клеток также может быть связана с эффлюкс системами. В формировании эффлюкс систем у многих видов ключевую роль играют белки АВС-транспортеры, которые экспортируют огромное количество субстратов за счет гидролиза АТФ. При этом механизмы взаимодействия между эффлюкс системами и чужеродными макромолекулами остаются малоизученными. Результаты исследований в этой области могут быть использованы для создания модуляторов и ингибиторов множественной лекарственной устойчивости. Одним из таких исследований является работа, проведенная группой американских исследователей из Университета Джона Хопкинса, занимающихся исследованиями белка BmrR из *Bacillus subtilis*.

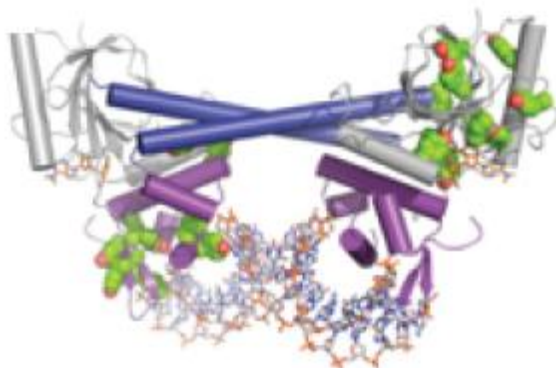


Рис. 1. Белок BmrR связывает молекулу ДНК. Фиолетовым цветом выделены ДНК-связывающие домены, синим — домены димеризации, серым — эффектор-связывающие домены.

Белок BmrR является одним из регуляторов множественной лекарственной устойчивости, участвующим в связывании и выводе из клетки липофильных катионов и других соединений. В своей работе исследователи сделали упор на исследование роли структуры лиганд-связывающего кармана, требований к структуре лигандов и других влияющих на связывание факторов. Исследователи использовали

лиганды из набора для диагностики МЛУ (различные антибиотики, противоопухолевые препараты, ингибиторы МЛУ и др.) и лиганды, не относящиеся к наборам для МЛУ.

В своей работе исследователи использовали различные методы исследования, в том числе измерение затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции с помощью **спектрофлуориметра ChronosDFD** компании **ISS**. В основе работы данного прибора — функция цифровой обработки сигналов в частотной области. Сигнал флуоресценции содержит основную частоту, повторяющую скорость работы лазера, и гармонические сигналы, отстающие по фазе. Математическая обработка полученного сигнала позволяет определить амплитуду и отставание по фазе для каждого компонента. По разности фаз между флуоресценцией и возбуждением на заданной частоте и по отношению амплитуд происходит вычисление времени жизни флуоресценции.

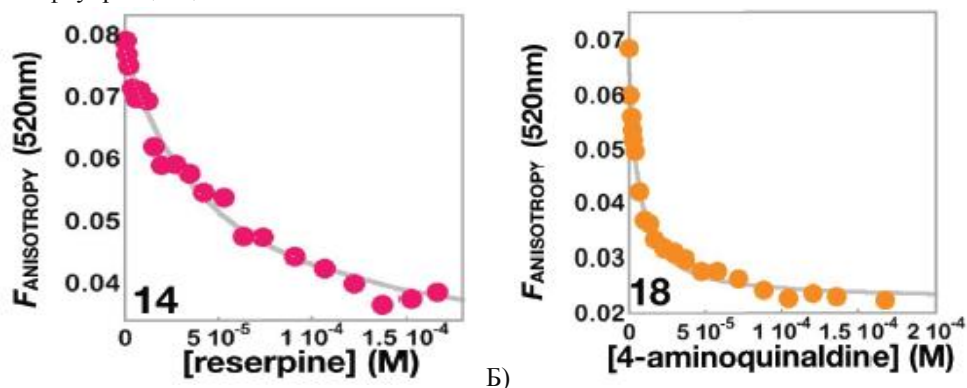


Рис. 2. Связывание ресерпина (А) и 4-аминоквиналидина (Б) с VmrR уменьшает анизотропию флуоресценции ($\lambda_{EX} = 495$ нм, $\lambda_{EM} = 525$ нм).

Флуоресценция белка VmrR обусловлена наличием одного остатка тирозина. В присутствии активаторов и других лигандов происходит частичное погашение флуоресценции тирозина. Полученные значения изменения интенсивности флуоресценции в присутствии лигандов с различными концентрациями были использованы для вычисления характеристик связывания и построения моделей устойчивых комплексов VmrR с липофильными катионами методом молекулярного докинга. Исследователи уверены, что их методы исследования могут быть в дальнейшем использованы при изучении других эффлюкс систем.

Подготовил Алексей Шнитко
ООО «НКЦ «ЛАБТЕСТ»
тел.: +7 495 605 35 07
факс: +7 495 605 39 44
a.shnitko@lab-test.ru
www.lab-test.ru