

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА



На правах рукописи

Метелешко Юлия Игоревна

**Молекулярное моделирование мутантных форм флуоресцентных белков
на основе LOV доменов с измененными спектральными свойствами**

1.4.4 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена в лаборатории квантовой химии и молекулярного моделирования на кафедре физической химии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

**Научный
руководитель**

– **Хренова Мария Григорьевна,**

доктор физико-математических наук, профессор РАН

**Официальные
оппоненты**

– **Коваленко Илья Борисович,**

доктор физико-математических наук, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра биофизики, проблемная лаборатория космической биологии, ведущий научный сотрудник

Свитанько Игорь Валентинович,

доктор химических наук, Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук, лаборатория молекулярного моделирования и направленного синтеза, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией

Шайтан Константин Вольдемарович,

доктор физико-математических наук, профессор, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра биоинженерии, профессор

Защита диссертации состоится «23» июня 2023 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета МГУ.014.3 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория СХА (преп.).

E-mail: mish@kinet.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.3/2553>

Автореферат разослан «__» мая 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.014.3,
кандидат химических наук

М.И. Шилина

Общая характеристика работы

Актуальность темы работы и степень ее разработанности.

Флуоресцентные белки активно применяются в клеточной и молекулярной биологии с последней четверти прошлого века, когда было продемонстрировано, что зеленый флуоресцентный белок GFP, найденный в медузе *Aequorea victoria*, может быть использован в качестве генетически кодируемой флуоресцентной метки. Это открыло новые возможности для неинвазивного исследования процессов, происходящих внутри клеток. Флуоресцентные белки стали использоваться для изучения взаимодействий между белками, их экспрессии, активности, локализации, а также для прямых измерений клеточных параметров. В дальнейшем были разработаны и другие GFP подобные белки с разными хромофорными группами, что позволило покрыть всю видимую область спектра.

Флуоресценция GFP и структурно похожих белков происходит за счет хромофора, который образуется из аминокислотных остатков в автокаталитической реакции с участием молекулярного кислорода. Отсутствие необходимости добавлять хромофор внутрь клетки извне является большим преимуществом этих белков по сравнению с низкомолекулярными флуоресцентными метками. Однако в некоторых случаях с этим связаны ограничения применимости GFP и ему подобных белков. В анаэробных условиях не происходит созревание хромофора, соответственно, флуоресценция не наблюдается. Другим недостатком белков семейства GFP является их относительно большие размер (приблизительно 240 аминокислотных остатков) и масса (около 25 кДа).

В 2007 году в качестве решения проблемы использования флуоресцентных белков в анаэробных условиях были предложены флуоресцентные белки, полученные из чувствительных к синему свету LOV доменов – *BsFbFP*, *PpFbFP*, *EcFbFP*. Эти белки в качестве хромофора связывают флавиномононуклеотид – низкомолекулярное соединение, широко распространенное в клетках различных организмов. Было показано, что предложенные варианты могут быть

эффективно использованы в качестве флуоресцентной метки как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Позже было разработано множество других флуоресцентных белков на основе LOV доменов, обладающих флуоресценцией, не зависящей от присутствия кислорода, а также меньшими по сравнению с GFP размерами и массой (около 110 аминокислотных остатков и 15 кДа), при помощи которых получилось преодолеть ограничения, свойственные GFP подобным белкам.

Однако несмотря на имеющееся разнообразие флуоресцентных белков на основе LOV доменов, они все имеют максимумы поглощения и испускания в очень узком диапазоне. Для расширения возможностей их применения необходимы варианты со смещенными полосами поглощения и испускания. Особый интерес представляют сдвиги максимумов флуоресценции в более длинноволновую область, в так называемое «окно прозрачности» биологических тканей.

На данный момент при помощи экспериментальных методов не удалось добиться значительных изменений в положении полос поглощения и флуоресценции у флуоресцентных белков на основе LOV доменов. Для описанных на сегодняшний день систем наибольшая разница между положениями максимумов полос составляет около 10 нм для поглощения и 15 нм для флуоресценции.

Таким образом, для поиска вариантов флуоресцентных белков на основе LOV доменов необходима помощь со стороны методов молекулярного моделирования. Их применение позволяет получить дополнительную информацию о структуре белка и происходящих в нем процессах, необходимую для рационального дизайна белков с требуемыми спектральными свойствами.

Цель данной работы – методами молекулярного моделирования исследовать структурные особенности и спектральные свойства флуоресцентных белков на основе LOV доменов и предложить способы получения новых флуоресцентных белков с батохромным сдвигом полос поглощения и флуоресценции.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Подбор компенсирующих мутаций для флуоресцентного белка iLOV-Q489K, приводящих к батохромному сдвигу в спектрах поглощения и флуоресценции.
2. Поиск новых хромофоров, способных связываться в хромофор-содержащей области белков семейства iLOV и обладающих батохромным сдвигом полос поглощения и флуоресценции относительно флавинмононуклеотида, а также подбор аминокислотных замен, стабилизирующих возбужденное состояние.
3. Расчет фотофизических свойств, необходимых для дизайна FRET-сенсоров на основе предложенных вариантов флуоресцентных белков.
4. Определение структурных и динамических параметров флуоресцентного белка YtvA-LOV и его вариантов rsLOV1 и rsLOV2, определяющих эффективность их фотопереключения.

Объектами исследования являются флуоресцентные белки семейства iLOV, включая варианты с аминокислотными заменами и другими хромофорами, а также флуоресцентные белки YtvA-LOV и его варианты rsLOV1 и rsLOV2. **Предметом исследования** являются структура, динамика и спектральные свойства выбранных флуоресцентных белков.

Научная новизна работы:

1. Установлено, что в белках семейства iLOV к батохромному сдвигу спектров поглощения и флуоресценции приводит образование водородной связи между положительно заряженной аминогруппой боковой цепи K489 или K392 и атомом N5 или O4 флавинмононуклеотида.
2. Предложены новые варианты флуоресцентных белков на основе iLOV с оригинальным или модифицированными хромофорами, обладающие значительными батохромными сдвигами полос поглощения и флуоресценции по сравнению с существующими флавинсодержащими флуоресцентными белками.

3. Показано, что подвижность спирали, участвующей в переносе сигнала к белку-эффектору, а также конформационный состав боковой цепи остатка глутамина Q123 хромофор-связывающего кармана определяют эффективность фотопереключения в белке YtvA-LOV и его вариантах rsLOV1 и rsLOV2.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные о структуре, электронных и динамических свойствах изучаемых флуоресцентных белков, а также детализация характеристик, основанных на электронной плотности в основном и возбужденном состояниях углубляет понимание молекулярных основ фотофизических свойств, проявляемых флавиносодержащими флуоресцентными белками. Результаты работы могут быть использованы для рациональной разработки и создания новых вариантов флуоресцентных белков на основе LOV доменов, которые будут расширять существующую палитру цветов.

Методология и методы исследования. При выполнении работы использовались современные методы молекулярного моделирования: метод молекулярной динамики и динамический сетевой анализ полученных траекторий, комбинированный метод квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ) с описанием квантовой подсистемы методом функционала электронной плотности, методы описания возбужденных состояний и электронных переходов, включая многоконфигурационный метод самосогласованного поля в полном пространстве активных орбиталей (CASSCF) с поправками по теории возмущений в варианте XMCQDPT2, метод конфигурационного взаимодействия с однократными и выборочными двукратными возбуждениями с поправкой по теории возмущений SOS-CIS(D) и нестационарный вариант метода функционала электронной плотности TDDFT.

Положения, выносимые на защиту:

1. Введение мутаций Q489K или V392K и компенсирующих аминокислотных замен в белок iLOV приводит к батохромным сдвигам в спектрах поглощения и флуоресценции за счет стабилизации

возбужденного электронного состояния хромофора, происходящей при добавлении положительного заряда вблизи атомов N5 или O4 флавинмононуклеотида, что позволяет расширить палитру цветов этих белков для многоцветной визуализации в клетках и тканях.

2. Замена в iLOV флавинмононуклеотида на его аналоги, обладающие батохромным сдвигом максимумов поглощения и испускания, приводит к соответствующим изменениям в спектрах поглощения и флуоресценции таких белков. Дальнейшая замена Q489K или V392K и введение компенсирующих мутаций приводят к дополнительному увеличению батохромного сдвига.
3. Увеличение эффективности фотопереключения в флавинсодержащих флуоресцентных белках rsLOV1 и rsLOV2 по сравнению с YtvA-LOV связано с увеличением подвижности и гибкости боковой цепи строго консервативного аминокислотного остатка Q123, находящегося в хромофор-содержащей области, а также подвижности спирали, участвующей в передаче сигнала к белку-эффектору.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных методов молекулярного моделирования и валидацией протоколов расчетов на системах, для которых имеются экспериментальные данные. Также достоверность представленных результатов подтверждается их публикацией в рецензируемых научных изданиях.

Апробация результатов. Основные результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях: XVII – XX ежегодных молодежных конференциях с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2017, 2018, 2019, 2020); I конференции с международным участием «Физическая химия в России и за рубежом: от квантовой химии до эксперимента» (Черноголовка, 2019); всероссийской конференции «Взаимосвязь ионных и ковалентных взаимодействий в дизайне молекулярных и наноразмерных

химических систем» ChemSci-2019 (Москва, 2019), 26 международной конференции «Математика, компьютер, образование» (Пушино, 2019), XXIV – XXVI международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2017, 2018, 2019).

Личный вклад автора состоит в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, выборе методов их решения, проведении вычислений методами молекулярной динамики, комбинированными методами квантовой механики и молекулярной механики, методами квантовой химии, анализе и интерпретации результатов, подготовке докладов и публикаций по теме работы. Все приведенные в диссертации результаты получены лично автором или при его непосредственном участии. В работах, опубликованных в соавторстве, вклад Метелешко Ю.И. является основополагающим.

Публикации. Основное содержание работы представлено в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.4 – «Физическая химия».

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания использованных методов (глава 2), изложения и обсуждения полученных результатов (глава 3), заключения, выводов, списка сокращений и введенных обозначений, списка цитируемой литературы и 4 приложений. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, содержит 72 рисунка, 23 таблицы и 85 библиографических ссылок.

Основное содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность работы, поставлены цели и задачи работы, показаны научная новизна работы, ее теоретическая и практическая значимость, приведены положения, выносимые на защиту, описаны апробация результатов и личный вклад автора.

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвященный LOV доменам и флавинсодержащим флуоресцентным белкам. В главе описаны функции LOV

доменов, их структура, подробно рассмотрены фотоцикл и влияние на него ряда точечных аминокислотных замен в LOV доменах различных организмов. Указаны направления практического применения белков, созданных на основе LOV доменов как с сохранившимся фотоциклом (оптогенетика и фотопереключаемые флуоресцентные белки), так с нарушенным циклом, зафиксированных в флуоресцентном состоянии (флавиносодержащие флуоресцентные белки и сенсоры на их основе), и обсуждены их достоинства и недостатки.

В **главе 2**, состоящей из 6 разделов, описаны методы и методики молекулярного моделирования, использованные в работе. В **разделе 2.1** описано построение моделей для флавиносодержащего флуоресцентного белка iLOV и всех остальных структур на его основе; для флуоресцентного белка YtvA-LOV и его фотопереключаемых вариантов rsLOV1, rsLOV2. В **разделе 2.2** описано применение метода молекулярной динамики для всех исследуемых систем. **Раздел 2.3** посвящен применению метода КМ/ММ для поиска равновесных геометрических параметров систем на основе белка iLOV. В **разделе 2.4** для этих систем рассмотрены подробности расчетов вертикальных энергий электронных переходов, возбуждения и испускания, многоконфигурационными методами с последующими поправками по теории возмущений. В **разделах 2.5 и 2.6** приведены подробности расчетов дипольных моментов перехода и зарядов на атомах.

Глава 3 состоит из 5 разделов и содержит описание полученных результатов и их обсуждение.

Раздел 3.1 посвящен разработке вариантов iLOV-Q489K с батохромным сдвигом полос поглощения и флуоресценции путем подбора компенсирующих мутаций. Ранее было предсказано, что в iLOV с заменой Q489K лизин в 489 позиции будет образовывать водородные связи с хромофором, тем самым стабилизировать электронную плотность в возбужденном состоянии, вызывая смещение максимумов полос поглощения и флуоресценции в красную область. Однако позже было экспериментально показано, что для данной мутантной

формы наблюдается слабый синий сдвиг спектральных полос, вызванный тем, что гибкая боковая цепь лизина предпочтительно находилась в конформации, в которой она отвёрнута от хромофора в раствор.

Чтобы зафиксировать боковую цепь лизина в положении, в котором положительно заряженная аминокгруппа будет взаимодействовать с флавином, необходимо подобрать компенсирующие мутации, которые посредством сети водородных связей будут удерживать ее рядом с хромофором, что и выполнялось в данном разделе.

В первую очередь было проверено, будут ли выбранные методы точно описывать исследуемые системы. Для белков с известными экспериментальными данными – iLOV и iLOV-Q489K – было рассмотрено поведение аминокислотных остатков в 489 позиции в молекулярно-динамических траекториях (рисунок 1).

Оказалось, что для варианта iLOV-Q489K водородные связи между положительно заряженной аминокгруппой лизина и флавином рвутся в самом начале траектории (после 3 нс), после чего боковая цепь лизина K489 принимает конформацию, в которой она направлена в раствор.

Для iLOV водородные связи между глутамином Q489 и флавином более стабильны и держатся на протяжении первых 9 нс траектории. Поэтому дальше для iLOV были рассмотрены оба конформера (iLOV-Q489_{in}, в котором присутствует водородная связь Q489 с флавином, и iLOV-Q489_{out}, в котором боковая цепь Q489 направлена от флавина), а для iLOV-Q489K – только конформер, в котором боковая цепь лизина направлена от хромофора (далее обозначен как iLOV-K489).

Методом КМ/ММ получены равновесные геометрические конфигурации для iLOV-Q489_{in}, iLOV-Q489_{out} и iLOV-K489 в основном электронном состоянии. Далее в рамках модели молекулярного кластера рассчитаны равновесные геометрические конфигурации в минимуме на поверхности возбужденного электронного состояния. В полученных стационарных точках на поверхностях потенциальной энергии были рассчитаны вертикальные энергии возбуждения

$S_{0,\min} \rightarrow S_1$ и испускания $S_{1,\min} \rightarrow S_0$. В таблице 1 приведены значения, полученные в расчетах методом XMCQDPT2, а также известные экспериментальные данные. Как видно, полученные длины волн хорошо совпадают с экспериментальными значениями.

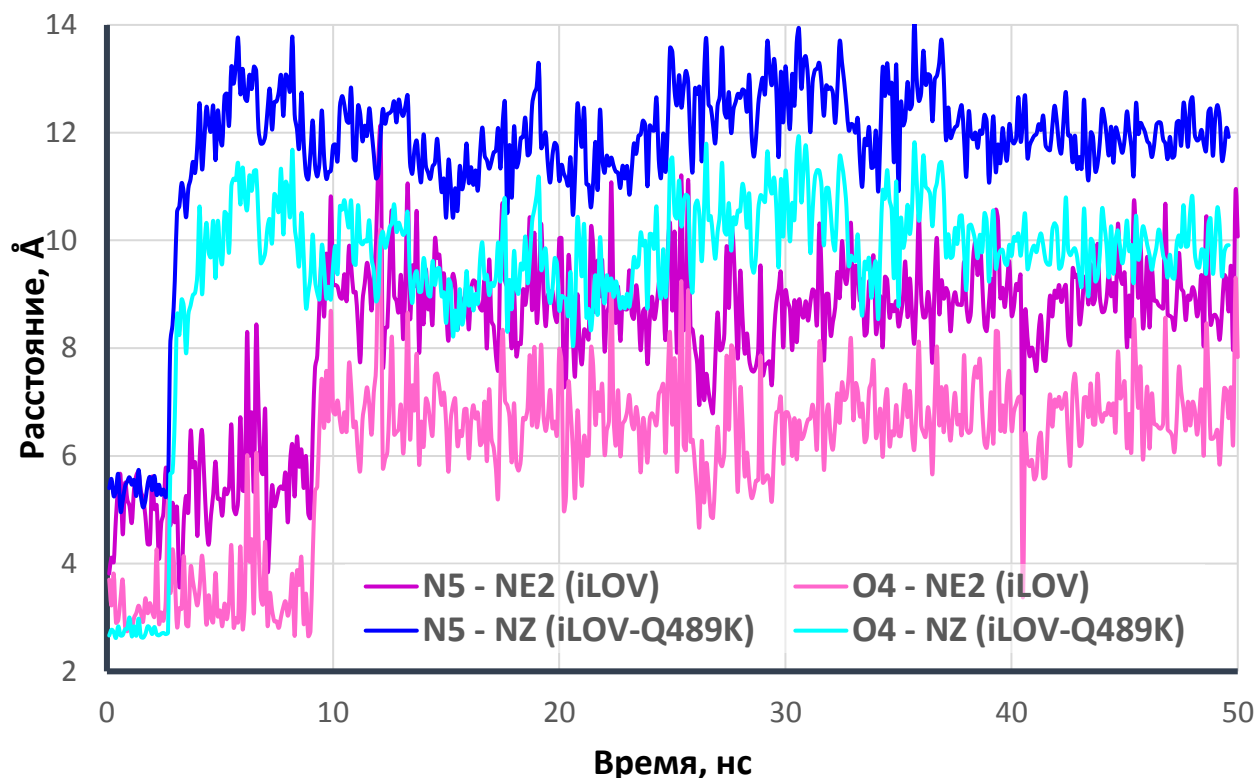


Рисунок 1. Изменение расстояний между атомами N5 и O4 хромофора и 489 аминокислотным остатком в молекулярно-динамических траекториях.

Таблица 1. Экспериментальные и рассчитанные длины волн (в нм) поглощения и испускания для iLOV и iLOV-Q489K. Расчеты проведены методом XMCQDPT2/sa-2CASSCF(12/12)/cc-pvdz.

Система	Возбуждение $S_{0,\min} \rightarrow S_1$	Испускание $S_{1,\min} \rightarrow S_0$	Источник
iLOV	447	497	Эксп. данные
iLOV-Q489K	440	489	Эксп. данные
iLOV-Q489 _{in}	441	491	Данная работа
iLOV-Q489 _{out}	439	496	Данная работа
iLOV-K489 (K489 _{out})	437	492	Данная работа

Чтобы подобрать компенсирующие мутации для iLOV-Q489K было проанализировано окружение внедренного в белок лизина и были выбраны

достаточно близкие к K489 позиции, в которые были произведены мутации на полярные аминокислоты (незаряженные или отрицательно заряженные) таким образом, чтобы они могли образовывать водородные связи с аминогруппой лизина и удерживать ее вблизи хромофора.

Более того, после рассмотрения окружения флавина был предложен вариант iLOV с заменой на лизин в 392 позицию вместо 489. Для такой мутантной формы также были подобраны компенсирующие мутации.

Всего было рассмотрено 14 систем с различными наборами мутаций:
 Q489K/V392S/F410E, Q489K/V392D/F410S/A426S, Q489K/F410E/F428T,
 Q489K/L470T, Q489K/L470N/G487S, Q489K/L470D/G487S,
 Q489K/L470S/G487S, Q489K/L470D/L472N, Q489K/L470N/L472D,
 Q489K/L470E/L472N, Q489K/I442T/V454T/L470D/L472S/G487S,
 Q489K/I442T/V454T/L470N/L472S/G487S, V392K/A426S, V392K/F410V/A426S.

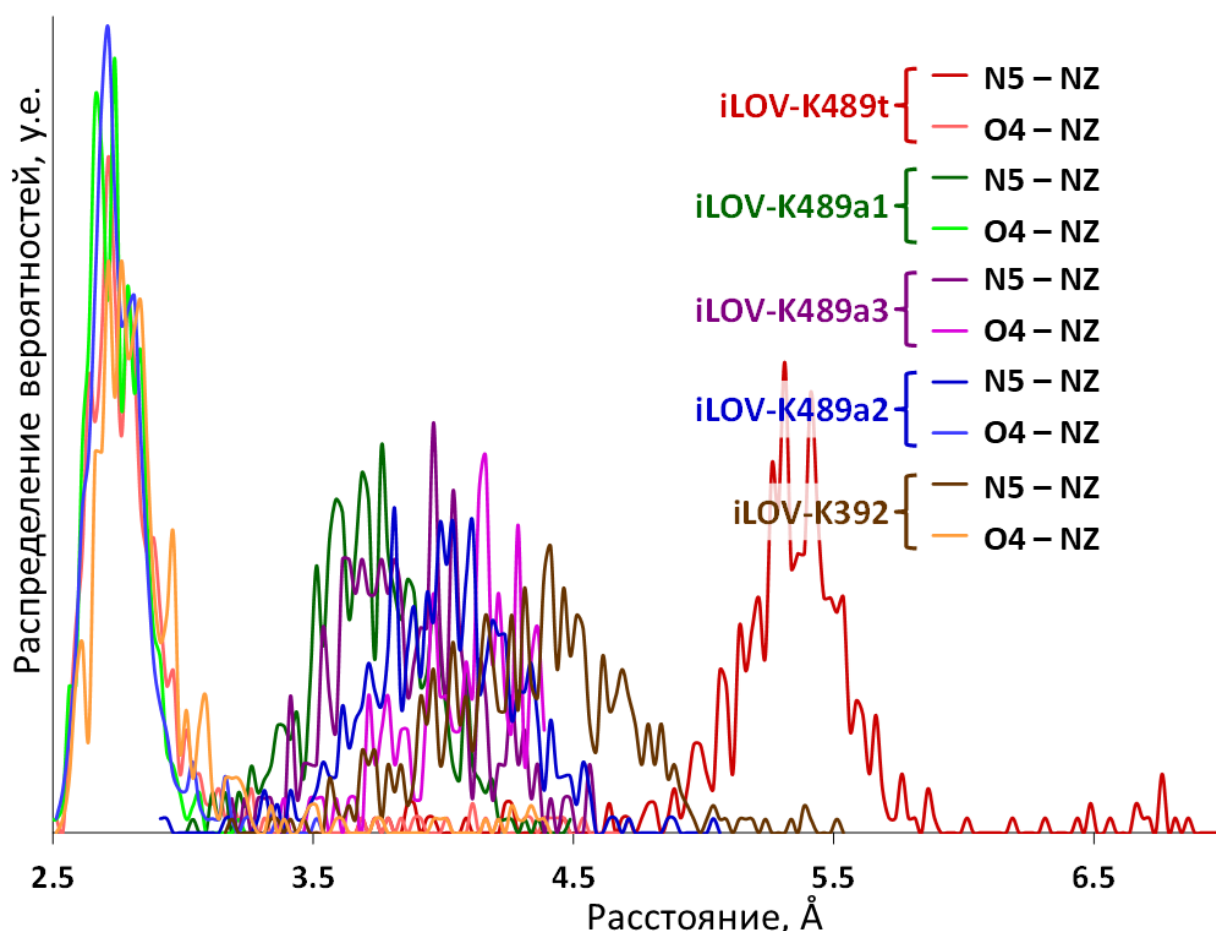


Рисунок 2. Вероятностное распределение расстояний в молекулярно-динамических траекториях для новых вариантов белка iLOV.

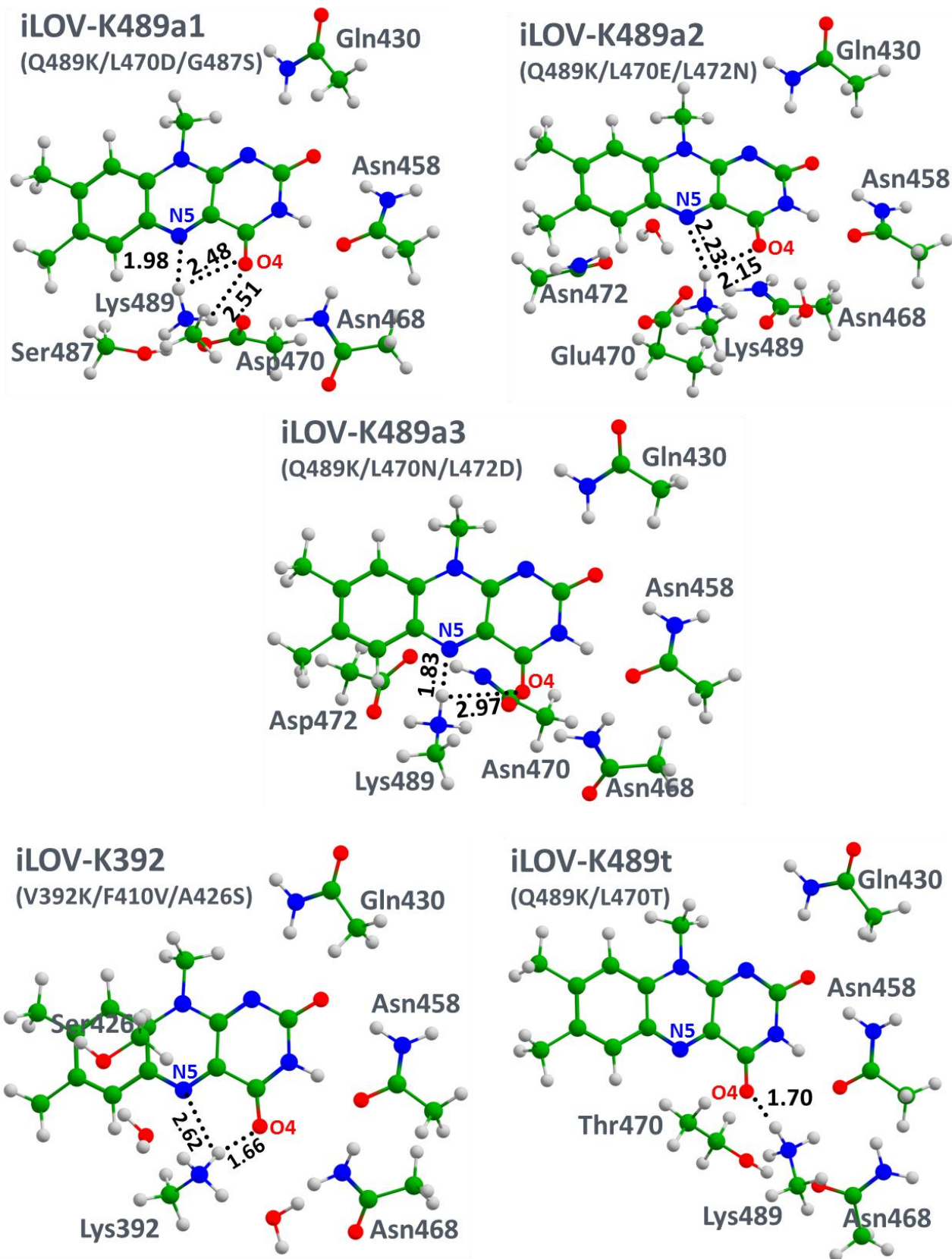


Рисунок 3. Квантовые подсистемы новых вариантов белка iLOV.

Для всех 14 систем сначала была проверена стабильность водородных связей при помощи метода молекулярной динамики. Для каждой модели были

посчитаны молекулярно-динамические траектории длительностью в 50 нс и было рассмотрено изменение расстояний N5-NZ и O4-NZ. Для дальнейшего исследования были отобраны только наиболее перспективные системы со стабильными водородными связями, в которых боковая цепь 392 или 489 лизина преимущественно заселяет конформер «in» (на рисунке 2 показано вероятностное распределение интересующих расстояний вдоль молекулярно-динамических траекторий).

Для отобранных систем были оценены вертикальные энергии возбуждения и испускания. Результаты приведены в таблице 2, а на рисунке 3 показаны молекулярные кластеры, для которых производился расчет и указаны краткие названия и соответствующие наборы замен.

Таблица 2. Вертикальные энергии возбуждения и испускания и соответствующие длины волн, рассчитанные методом XMCQDPT2/sa-2CASSCF(12/12)/cc-pvdz. Сдвиги рассчитаны относительно $iLOV_{out}$.

Система	$S_{0,min} \rightarrow S_1$		$S_{1,min} \rightarrow S_0$		
	Переход, эВ (λ , нм)	Сдвиг, эВ (λ , нм)	Стоксов сдвиг (эВ)	Переход, эВ (λ , нм)	Сдвиг, эВ (λ , нм)
$iLOV_{out}$	2.82 (439)	0	-0.32	2.50 (496)	0
$iLOV$ -K489	2.84 (437)	+0.02 (-2)	-0.32	2.52 (492)	0.02 (-4)
$iLOV$ -K489t	2.64 (469)	-0.18 (+30)	-0.31	2.33 (533)	-0.17 (+37)
$iLOV$ -K489a1	2.73 (455)	-0.09 (+16)	-0.23	2.50 (497)	0
$iLOV$ -K489a2	2.77 (447)	-0.05 (+8)	-0.30	2.47 (503)	-0.03 (+7)
$iLOV$ -K489a3	2.80 (443)	-0.02 (+4)	-0.37	2.43 (509)	-0.07 (+13)
$iLOV$ -K392	2.52 (492)	-0.30 (+53)	-0.17	2.35 (529)	-0.15 (+33)

Для белков группы $iLOV$ -K489a (общей чертой которых является то, что одна из компенсирующих мутаций содержит отрицательно заряженную аминокислоту) предсказаны наименьшие батохромные сдвиги в спектрах поглощения и флуоресценции. Более значительный сдвиг наблюдается для $iLOV$ -K489t, несмотря на то что для данного белка водородные связи между

лизином и хромофором образуются только с атомом O4. Наибольший сдвиг имеет iLOV-K392, у которого образуются водородные связи с обоими атомами (N5 и O4).

Таким образом, было показано, что использование отрицательно заряженных аминокислот в качестве компенсирующих мутаций существенно снижает влияние положительного заряда аминогруппы боковой цепи лизина на стабилизацию электронной плотности флавина в возбужденном состоянии (iLOV-K489a1, iLOV-K489a2, iLOV-K489a3), и что для получения батохромного сдвига в спектрах поглощения и флуоресценции в iLOV достаточно образования водородной связи между положительно заряженной аминогруппой боковой цепи лизина и атомом O4 флавина (iLOV-K489t), тогда как наличие водородной связи с атомом N5 дополнительно усиливает этот эффект (iLOV-K392).

Раздел 3.2 посвящен разработке вариантов iLOV-Q489K с батохромным сдвигом спектров поглощения и флуоресценции с модифицированным хромофором.

В качестве новых хромофоров были подобраны аналоги флавиномононуклеотида, обладающие смещенными по сравнению с ним в красную область спектра полосами поглощения и испускания – 8-аминофлавиномононуклеотид (максимум поглощения $\lambda_{a,max}=473$ нм, максимум испускания $\lambda_{F,max} = 533$ нм), 8-метиламинофлавиномононуклеотид ($\lambda_{a,max} = 488$ нм, $\lambda_{F,max} = 560$ нм) и 1-дезафлавиномононуклеотид ($\lambda_{a,max} = 537$ нм, $\lambda_{F,max} = 700$ нм).

Сначала были рассмотрены системы, состоящие из iLOV, в котором замещен только хромофор. Для них были приняты следующие обозначения: iLOV-a для iLOV с 8-аминофлавином, iLOV-m для iLOV с 8-метиламинофлавином и iLOV-d для iLOV с 1-дезафлавином.

Для каждой системы были получены молекулярно-динамические траектории длительностью в 50 нс. Так же, как и для iLOV, у всех рассматриваемых систем водородные связи Q489 с флавином рвутся в начале траекторий, хотя для iLOV-m и iLOV-d водородные связи Q489 с хромофором имеют тенденцию к спонтанному восстановлению. Тем не менее для описания

данных систем были выбраны конформеры «out», так как их заселенность существенно выше. Оцененные энергии возбуждения и испускания для данных систем приведены в таблице 3.

Таблица 3. Вертикальные энергии возбуждения и испускания и соответствующие длины волн, рассчитанные методом XMCQDPT2/sa-2CASSCF(12/12)/cc-pvdz для iLOV с модифицированными хромофорами. Вертикальные энергии возбуждения для iLOV-d рассчитаны методом XMCQDPT2/sa-2CASSCF(2/2)/cc-pvdz. Сдвиг рассчитывался относительно iLOV_{out}.

Система	$S_{0,\min} \rightarrow S_1$		$S_{1,\min} \rightarrow S_0$		
	Переход, эВ (λ , нм)	Сдвиг, эВ (λ , нм)	Стоксов сдвиг (эВ)	Переход, эВ (λ , нм)	Сдвиг, эВ (λ , нм)
iLOV _{out}	2.82 (439)	0	-0.32	2.50 (496)	0
iLOV-a	2.70 (450)	-0.12 (+11)	-0.43	2.27 (547)	-0.23 (+51)
iLOV-m	2.59 (478)	-0.23 (+39)	-0.40	2.19 (566)	-0.31 (+70)
iLOV-d	2.36 (526)	-0.46 (+82)	-0.63	1.73 (717)	-0.77 (+221)

Так же, как и для iLOV с оригинальным хромофором, основными мутациями, которые будут ответственны за получение красного сдвига в спектрах, были выбраны замены Q489K и V392K. Выбор компенсирующих мутаций проводился таким же образом, как и в разделе 3.1, однако с учетом сделанных выводов, а именно, что замена должна проводиться на полярную незаряженную аминокислоту, что несколько ограничивает возможный выбор. В некоторых случаях также были произведены замены на неполярные аминокислоты с целью установки стерических ограничений.

Всего было рассмотрено 17 мутантных форм: V392K/A426S, V392K/F410V/A426S, V392K/F410V/A426S/Q489A, Q489K/L470S/G487S, Q489K/L470T, Q489K/L470S/G487N, Q489K/L470T/L472T, Q489K/L470T/G487T для iLOV-a; V392K/F410V/A426S, Q489K/L470S/G487S, Q489K/L470T, Q489K/L470T/L472T для iLOV-m и V392K/F410V/A426S, Q489K/L470S/G487N, Q489K/L470T, Q489K/L470S/G487S, Q489K/L470T/L472T для iLOV-d.

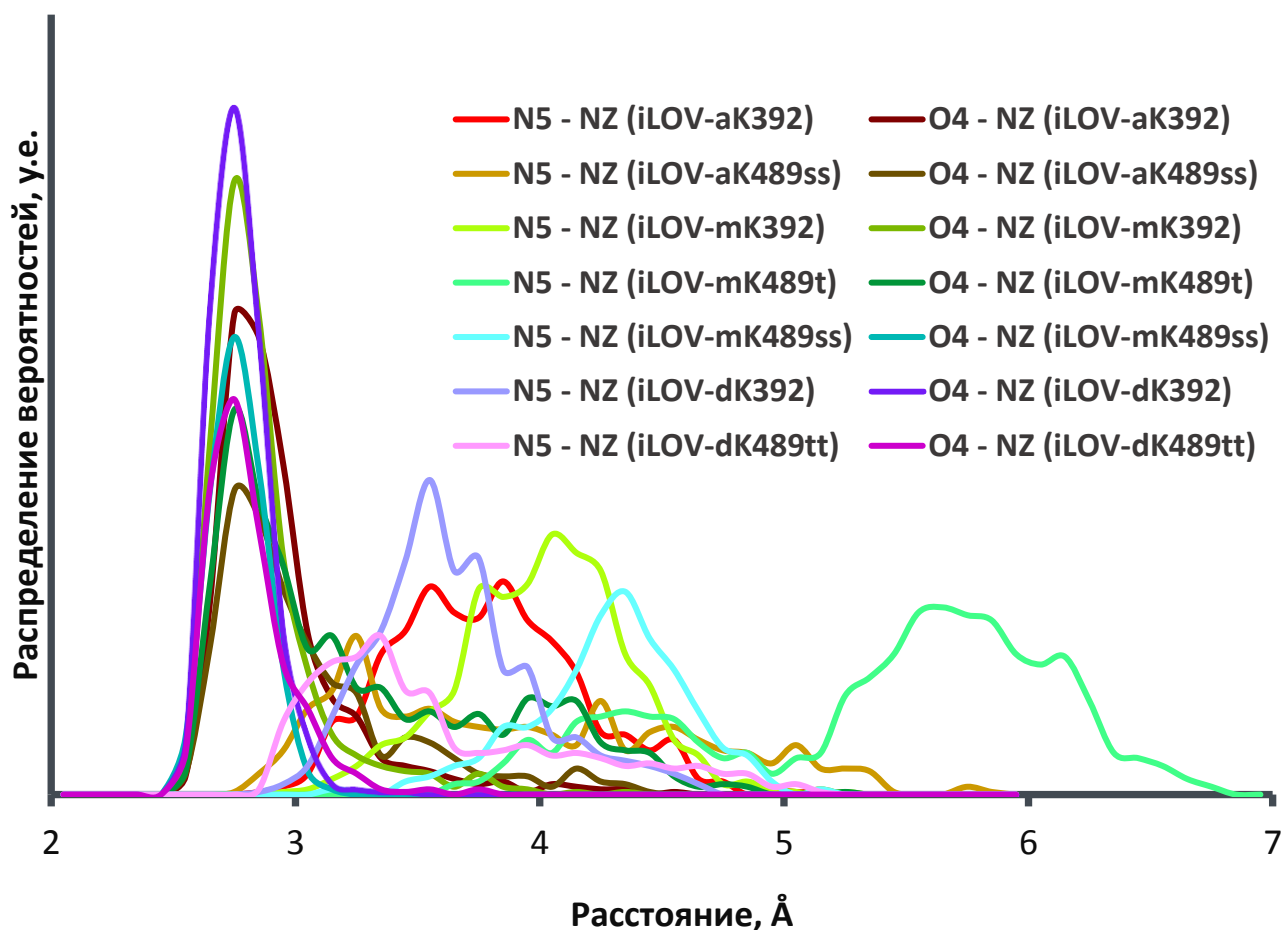


Рисунок 4. Вероятностное распределение расстояний в молекулярно-динамических траекториях для новых вариантов белка iLOV с модифицированным хромофором.

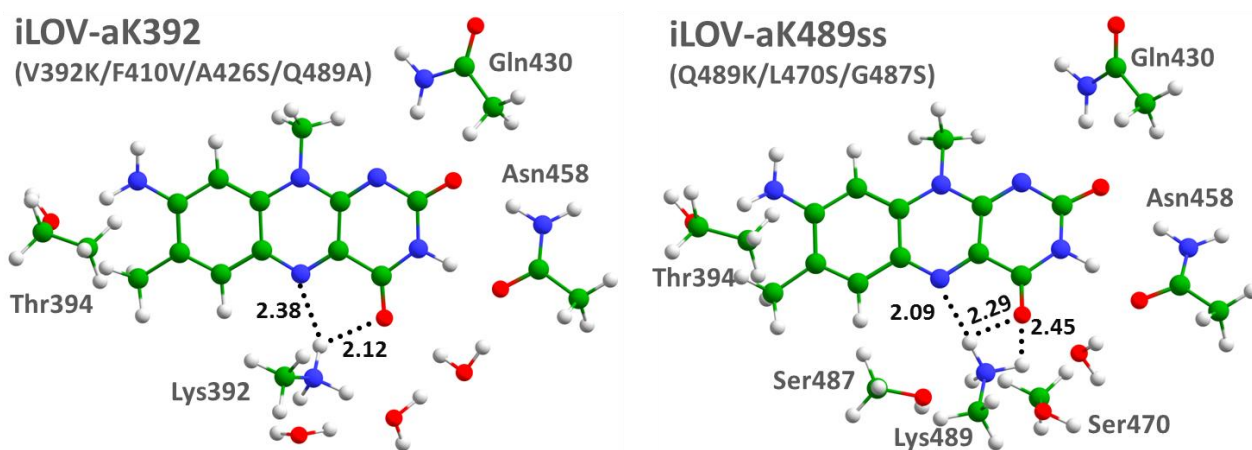


Рисунок 5. Квантовые подсистемы вариантов белка iLOV с 8-аминофлавином.

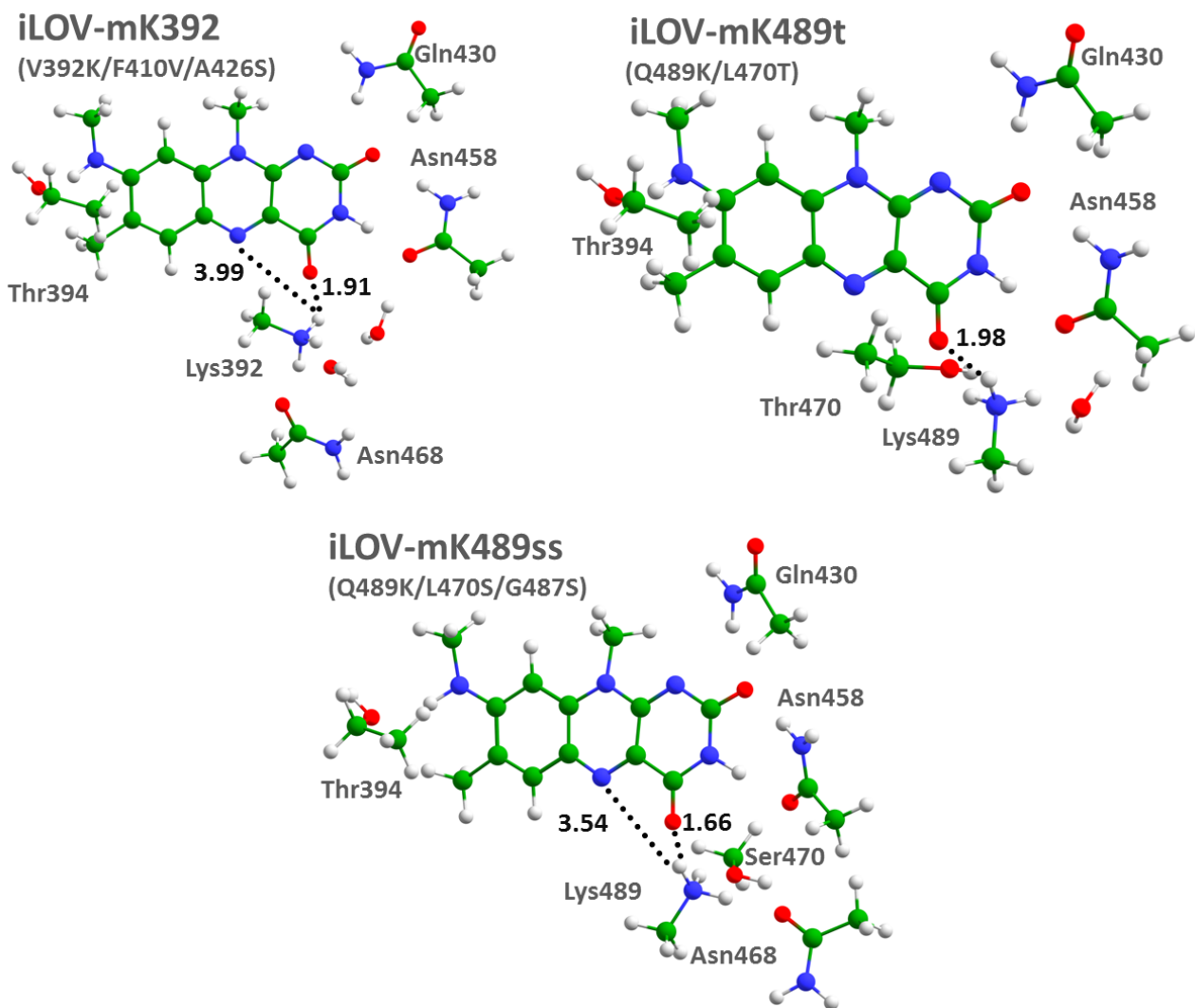


Рисунок 6. Квантовые подсистемы вариантов белка iLOV с 8-метиламинофлавином.

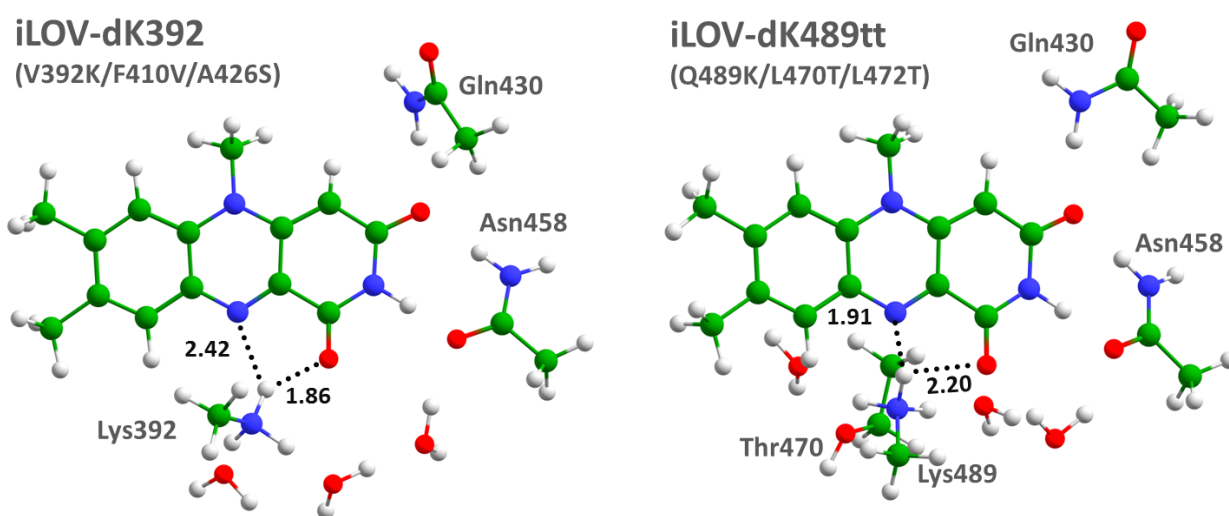


Рисунок 7. Квантовые подсистемы вариантов белка iLOV с 1-дезафлавином.

Для каждой системы были посчитаны молекулярно-динамические траектории длительностью в 50 нс. Из 17 исследованных систем были отобраны 7 со стабильными водородными связями между аминок группой лизина K392 или K489 и атомами N5 и/или O4 аналога флавина (рисунок 4).

Для этих систем были получены вертикальные энергии возбуждения и испускания (таблица 4). На рисунках 5-7 показаны молекулярные кластеры, для которых производился расчет, и указаны краткие названия систем и соответствующие им наборы мутаций.

Таблица 4. Вертикальные энергии возбуждения и испускания и соответствующие длины волн, рассчитанные методом XMCQDPT2/sa-2CASSCF(12/12)/cc-pvdz для вариантов белка iLOV с модифицированными хромофорами. Вертикальные энергии возбуждения для группы iLOV-d рассчитаны методом XMCQDPT2/sa-2CASSCF(2/2)/cc-pvdz. Сдвиг рассчитывался относительно iLOV_{out}.

Система	$S_{0,\min} \rightarrow S_1$		$S_{1,\min} \rightarrow S_0$		
	Переход, эВ (λ , нм)	Сдвиг, эВ (λ , нм)	Сток сов сдвиг (эВ)	Переход, эВ (λ , нм)	Сдвиг, эВ (λ , нм)
iLOV _{out}	2.82 (439)	0	-0.32	2.50 (496)	0
iLOV-aK392	2.42 (512)	-0.40 (+73)	-0.25	2.17 (570)	-0.33 (+74)
iLOV-aK489ss	2.36 (525)	-0.46 (+86)	-0.28	2.08 (595)	-0.42 (+99)
iLOV-mK392	2.49 (499)	-0.33 (+60)	-0.25	2.24 (553)	-0.26 (+57)
iLOV-mK489t	2.49 (499)	-0.33 (+60)	-0.19	2.30 (539)	-0.20 (+43)
iLOV-mK489ss	2.54 (488)	-0.28 (+49)	-0.32	2.22 (558)	-0.28 (+62)
iLOV-dK392	2.09 (592)	-0.73 (+153)	-0.62	1.47 (843)	-1.03 (+347)
iLOV-dK489tt	2.06 (602)	-0.76 (+163)	-0.62	1.44 (860)	-1.06 (+364)

Для вариантов iLOV с 8-аминофлавином полученные сдвиги относительно iLOV_{out} ожидаемо большие, чем для предложенных мутантных форм белка iLOV с оригинальным хромофором. В обеих системах водородные связи образуются как с атомом O4, так и с атомом N5 8-аминофлавина, что положительно влияет на величину сдвигов. Также на основе полученных значений можно предложить

FRET пары, в которых iLOV-а будет выступать донором энергии, а iLOV-аK392 или iLOV-аK489ss – акцептором.

Несмотря на то, что в водных растворах 8-метиламинофлавинов обладает большим красным сдвигом относительно флавина, чем 8-аминофлавинов, для iLOV-mK392, iLOV-mK489t и iLOV-mK489ss получены меньшие величины сдвигов, чем для iLOV-аK392 и iLOV-аK489ss. Это можно объяснить тем, что у систем с 8-аминофлавином присутствуют водородные связи и с O4, и с N5 атомами хромофора, а у систем с 8-метиламинофлавином – только с атомом O4.

Для систем с 1-дезафлавином получены наибольшие красные сдвиги энергий вертикальных электронных переходов относительно iLOV, что согласуется с тем, что максимум поглощения для 1-дезафлавина смещен почти на 100 нм в красную область по сравнению с флавином. Дополнительные 50-60 нм сдвига вызваны образованием водородных связей аминогруппы боковой цепи 392 или 489 лизина и с O4, и с N5 атомами 1-дезафлавина. Более того, у этих систем максимумы испускания лежат в «окне прозрачности», то есть в области, в которой свет легко проникает в животные ткани (650-900 нм).

В **разделе 3.3** определены фотофизические свойства для флуоресцентных белков на основе iLOV с батохромными сдвигами. Для iLOV с разными хромофорами и всех предложенных мутантных форм были получены дипольные моменты переходов, приведенные на рисунке 8.

Также для рассмотренных систем была найдена зависимость между изменением заряда на атоме O4 и смещением энергии вертикального $S_{0,\min}$ - S_1 перехода при введении точечных мутаций в белковую макромолекулу.

В **разделе 3.4** описывается моделирование структур обратимо переключаемых белков rsLOV1 и rsLOV2. Они были получены для использования в спектроскопии сверхвысокого разрешения из YtvA-LOV домена, и обладают повышенной яркостью и улучшенной кинетикой переключения между флуоресцентным и нефлуоресцентным состояниями по сравнению с диким типом. Для rsLOV1 и rsLOV2 известны только первичные последовательности аминокислотных остатков, а знание пространственной

структуры необходимо для анализа путей передачи сигнала при фотоиндуцированном возбуждении, поэтому в данном разделе решается задача построения трехмерных полноатомных структур rsLOV1 и rsLOV2.

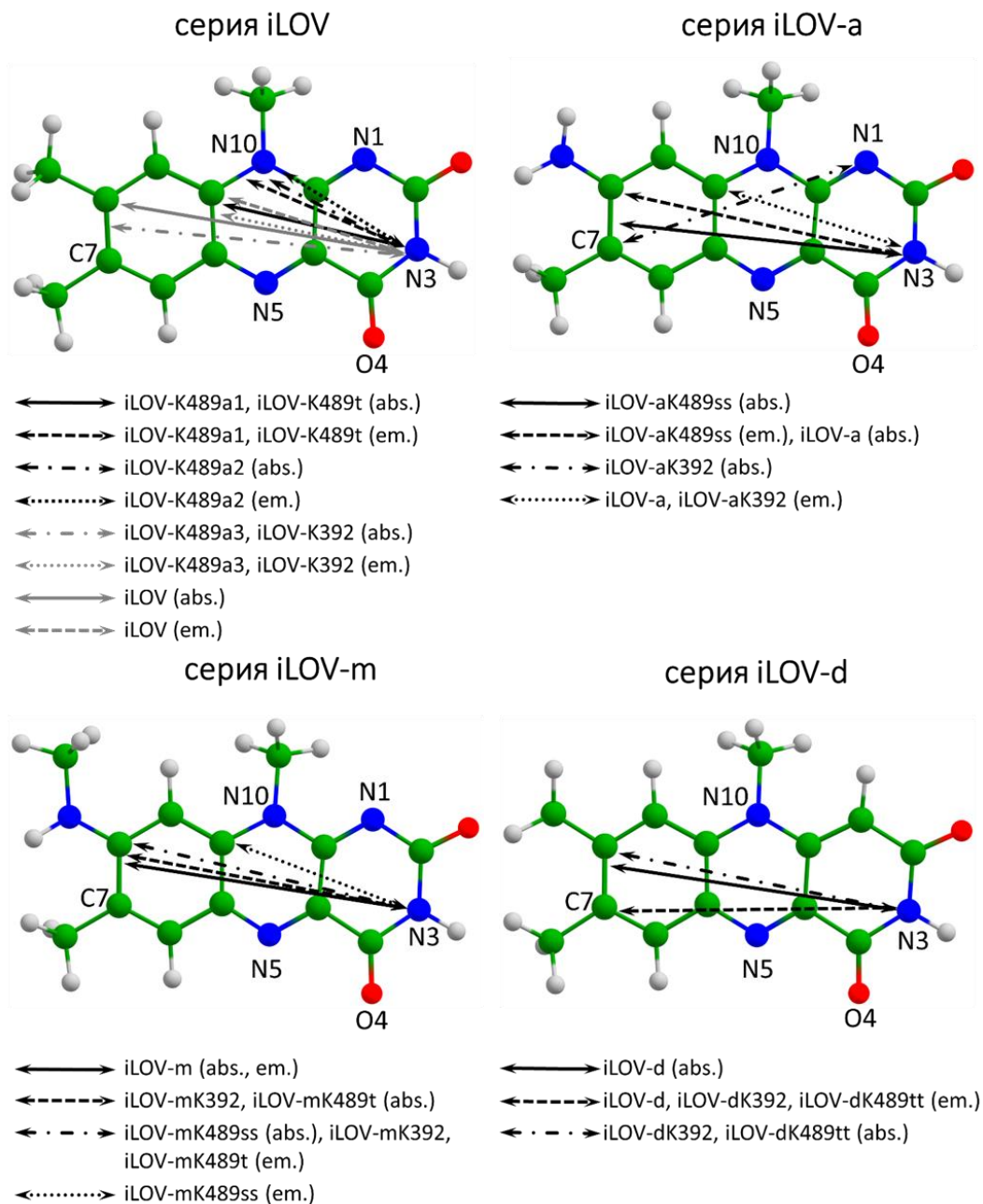


Рисунок 8. Дипольные моменты переходов поглощения $S_{0,\min}-S_1$ (abs.) и испускания $S_{1,\min}-S_0$ (em.) рассматриваемых систем.

Для белков rsLOV1, rsLOV2, а также дикого типа YtvA-LOV было получено по 3 молекулярно-динамических траектории, каждая длительностью в

100 нс. В полученных траекториях самое активное движение наблюдается для $A'\alpha$ и $J\alpha$ спиралей.

У rsLOV1 и rsLOV2 $A'\alpha$ спираль может или контактировать с петлей $H\beta$ - $I\beta$ (рисунок 9а), или располагаться ниже N-концевой части белка (рисунок 9б), тогда как у дикого типа YtvA-LOV наблюдается только последний вариант.

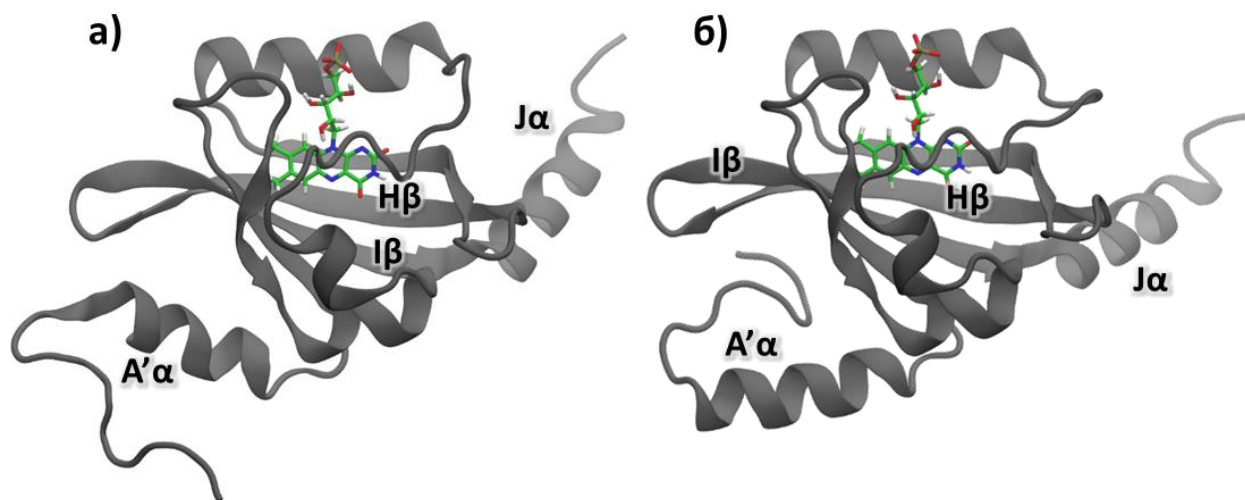


Рисунок 9. Характерные конфигурации белков из молекулярно-динамических траекторий на примере rsLOV1.

Последние завитки $J\alpha$ спирали демонстрируют высокую подвижность у всех трех белков, однако для мутантных форм наблюдаются движения, не характерные для дикого типа.

Чтобы получить дополнительную информацию о сходстве и различии исследуемых систем, был выполнен динамический сетевой анализ рассчитанных траекторий. На рисунке 10 представлены полученные дисперсионно-ковариационные матрицы. На них области, которые отвечают скоррелированному движению аминокислотных остатков отмечены более темными цветами (красным и зеленым). Можно наблюдать, что эти области у мутантных форм rsLOV1 и rsLOV2 шире, чем у дикого типа YtvA-LOV.

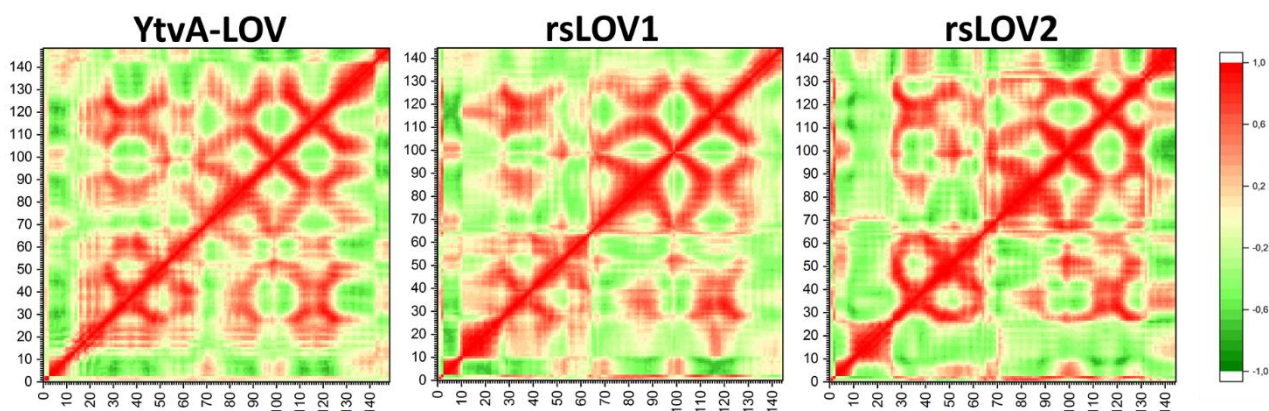


Рисунок 10. Дисперсионно-ковариационные матрицы. По осям отложены номера узлов сети. Узлы 0 и 1 отвечают флавиону (изоаллоксазиновому кольцу и рибитильной части, соответственно), узлы от 2 до 148 соответствуют аминокислотам 1-146.

Также были рассмотрены изменения, происходящие в хромофор-содержащем кармане. Наиболее подвижной боковой цепью в данной области обладает строго консервативный аминокислотный остаток Q123. Чтобы описать его поведение, были рассмотрены двугранный угол NE2-CD-CG-CB и расстояние между атомом NE2 глутамина и N5 флавина (рисунок 11).

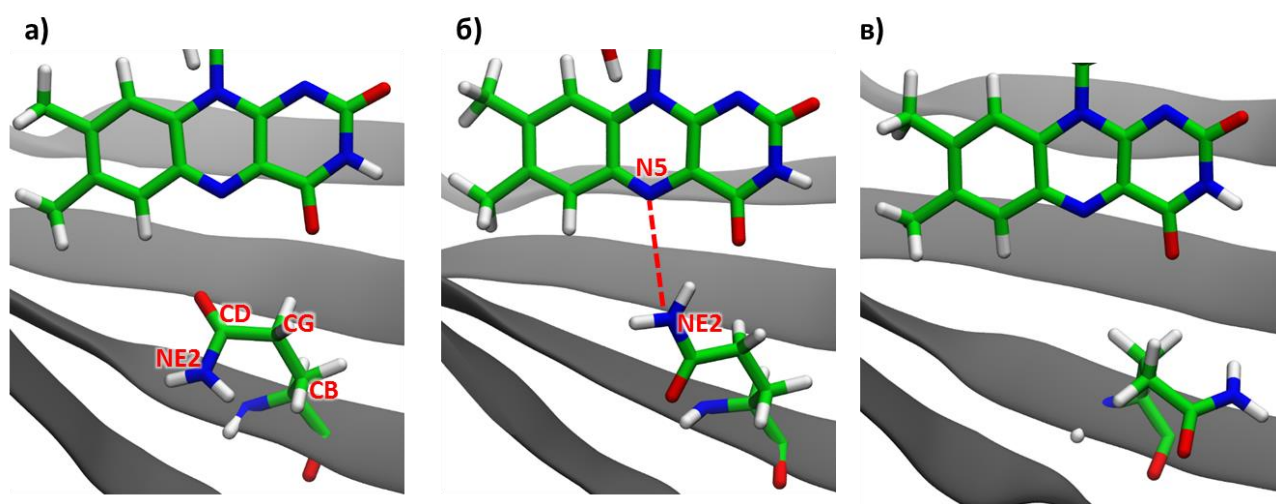


Рисунок 11. Конформеры Q123 с разной величиной угла NE2-CD-CG-CB: а) 50°; б) 160°; в) 50°.

Для дикого типа YtvA-LOV характерен конформер, изображенный на рисунке 11а. Для белков rsLOV1 и rsLOV2 существенно увеличивается заселенность состояний, типичный вид которых приведен на рисунке 11б. Также

для rsLOV2 наблюдается слабо заселенное состояние, где боковая цепь Q123 направлена в сторону $J\alpha$ спирали (рисунок 11в).

Для численного сравнения подвижности боковой цепи глутамина в разных белках для каждой системы была подсчитана доля кадров в молекулярно-динамических траекториях, в которых расстояние NE-N5 не превышало 3.5 Å, результаты приведены в таблице 5. В белках rsLOV1 и rsLOV2 боковая цепь Q123 обладает большей подвижностью и гибкостью, чем в YtvA-LOV.

Таблица 5. Доля кадров в молекулярно-динамических траекториях, в которых расстояние NE2-N5 < 3.5 Å.

Белок	YtvA-LOV	rsLOV1	rsLOV2
Доля, %	2.6	15.9	13.7

В разделе 3.5 обсуждены другие работы, последовавшие после публикации описанных здесь результатов. Комбинация результатов, описанных в главе 3 этой работы, и результатов, полученных другими коллективами, открывает дополнительные возможности для создания флуоресцентных белков на основе LOV доменов со значительным батохромным сдвигом в спектрах поглощения и флуоресценции.

В заключении были подведены итоги проделанной работы, на основе полученных результатов даны рекомендации и рассмотрены перспективы для создания флуоресцентных белков на основе LOV доменов с батохромными сдвигами полос поглощения и флуоресценции.

Основные результаты и выводы

1. Методами молекулярного моделирования разработаны новые варианты флуоресцентных белков на основе iLOV путем введения точечных аминокислотных замен, стабилизирующих возбужденное электронное состояние хромофора, или внедрением модифицированных вариантов флавинмононуклеотида в качестве хромофора с меньшими энергиями поглощения. Предложенные белки расширяют палитру флавиносодержащих флуоресцентных белков, покрывая видимую и ближнюю ИК области.
2. Предложены пары флуоресцентных белков на основе iLOV, которые можно использовать в качестве компонентов FRET-сенсоров. Для них определены молекулярные характеристики, необходимые для создания сенсоров с большей эффективностью.
3. По сравнению с диким типом YtvA-LOV в модифицированных белках rsLOV1 и rsLOV2 увеличена подвижность спирали, участвующей в переносе сигнала к белку-эффектору, а также изменяется конформационный состав боковой цепи остатка глутамина Q123 хромофор-связывающего кармана, что приводит к экспериментально наблюдаемому увеличению эффективности фотопереключения.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Список публикаций в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.4 – Физическая химия:

1. Khrenova M.G., Meteleshko Y.I., Nemukhin A.V. Mutants of the Flavoprotein iLOV as Prospective Red-Shifted Fluorescent Markers // The Journal of Physical Chemistry B – 2017. – Vol. 121, № 43. – P. 10018–10025. (JIF WoS 3.466)
2. Meteleshko Y.I., Nemukhin A.V., Khrenova M.G. Novel flavin-based fluorescent proteins with red-shifted emission bands: a computational study // Photochemical and Photobiological Sciences – 2019. – Vol. 18, № 1. – P. 177–189. (JIF WoS 4.328)
3. Метелешко Ю.И., Немухин А.В., Хренова М.Г. Моделирование фотофизических свойств компонентов FRET-пар на основе флавиносодержащих флуоресцентных белков и их аналогов // Химическая Физика. – 2019. – Vol. 38, № 6. – P. 3–7. (Импакт-фактор РИНЦ 1.085)
4. Метелешко Ю.И., Хренова М.Г., Немухин А.В. Компьютерное моделирование структур обратимо переключаемых флуоресцентных белков с LOV-доменами // Кристаллография. — 2021. — Vol. 66, № 5. — P. 789–792. (Импакт-фактор РИНЦ 0.639)