

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ



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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, профессор РАН

Хренова Мария Григорьевна

Москва – 2023

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. LOV домены и флавиносодержащие флуоресцентные белки	11
Глава 2. Расчётные методы	25
2.1 Построение моделей	25
2.2 Расчеты молекулярно-динамических траекторий	26
2.3. Расчеты комбинированным методом квантовой механики и молекулярной механики	28
2.4. Расчет вертикальных энергий возбуждения и испускания.....	30
2.5. Расчет дипольных моментов перехода	32
2.6. Расчет зарядов на атомах.....	32
Глава 3. Результаты и обсуждение	33
3.1. Разработка вариантов iLOV-Q489K с батохромных сдвигом подбором компенсирующих мутаций.....	33
3.1.1 Молекулярное моделирование iLOV и iLOV-Q489K	35
3.1.2. Разработка новых мутантных форм iLOV.....	37
3.1.3. Заключение к разделу 3.1	43
3.2. Разработка вариантов iLOV-Q489K с батохромных сдвигом с модифицированным хромофором.	44
3.2.1. Выбор новых хромофоров	44
3.2.2. iLOV с аналогами флавина	47
3.2.3. Заключение к разделу 3.2	61
3.3. Определение фотофизических свойств для флуоресцентных белков на основе iLOV с батохромными сдвигами	62

3.3.1. Дипольные моменты перехода	63
3.3.2. Заряды на атомах хромофоров	65
3.3.3. Заключение к разделу 3.3	67
3.4. Моделирование структур обратимо переключаемых белков rsLOV1 и rsLOV2.....	68
3.4.1. Молекулярное моделирование структур rsLOV1 и rsLOV2	69
3.4.2. Заключение к разделу 3.4.....	74
3.5. Обсуждение применимости полученных результатов.....	75
Заключение	78
Основные результаты и выводы	81
Список сокращений и условных обозначений.....	82
Список литературы	88
Приложение А	98
Приложение Б.....	102
Приложение В.....	118
Приложение Г	125

Введение

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 флаavinмоноклеотида, 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 iLOV, iLOV-Q489K, их варианты с аминокислотными заменами и другими хромофорами, а также фотопереключаемые флуоресцентные белки 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 флаavinмоноклеотида.
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 флаavinсодержащими 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 фотопереклочения 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 флавинодержащими 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 ХМСQDPT2, 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-эффektorу.

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»:

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)

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.

Глава 1. LOV домены и флавинсодержащие флуоресцентные белки

LOV домены (light, oxygen, voltage sensing domain) являются малыми фоточувствительными белками и принадлежат суперсемейству PAS (PER-ARNT-SIM) сенсорных белков, контролирующих клеточные сигнальные функции [1].

Впервые LOV домены были открыты в составе фототропина 1 (phot1) растения *Arabidopsis thaliana* [2]. Фототропины регулируют в высших растениях явления фототропизма, открытия устьиц, движения хлоропластов, отслеживания солнца и регуляции циркадных ритмов при воздействии синего света [3]. Фототропины содержат два LOV домена – LOV1 и LOV2, ковалентно связанных с сериновой/треониновой киназой.

Позже LOV домены были обнаружены во многих других организмах – бактериях, грибах, водорослях, в недавней работе [4] при помощи биоинформатического анализа были выявлены более 6700 различных LOV доменов. Одной из особенностей LOV доменов является многообразие белков-эффекторов, связывающихся с ними. Среди них гистидиновые киназы, циклазы, фосфодиэстеразы, ДНК-связывающие белки типа спираль-поворот-спираль, STAS домены [5]. Также встречаются бактериальные LOV домены, которые не связаны с другими белками, их обозначают sLOV (short-LOV). Предположительно, они формируют комплексы с другими эффекторными белками [5].

Вторичная структура LOV доменов (рисунок 1.1) состоит из 5 антипараллельных β -листов и 4 α -спиралей (A β B β C α D α E α F α G β H β I β) [6]. LOV домены являются компактными белками, состоящими из приблизительно 110 аминокислот.

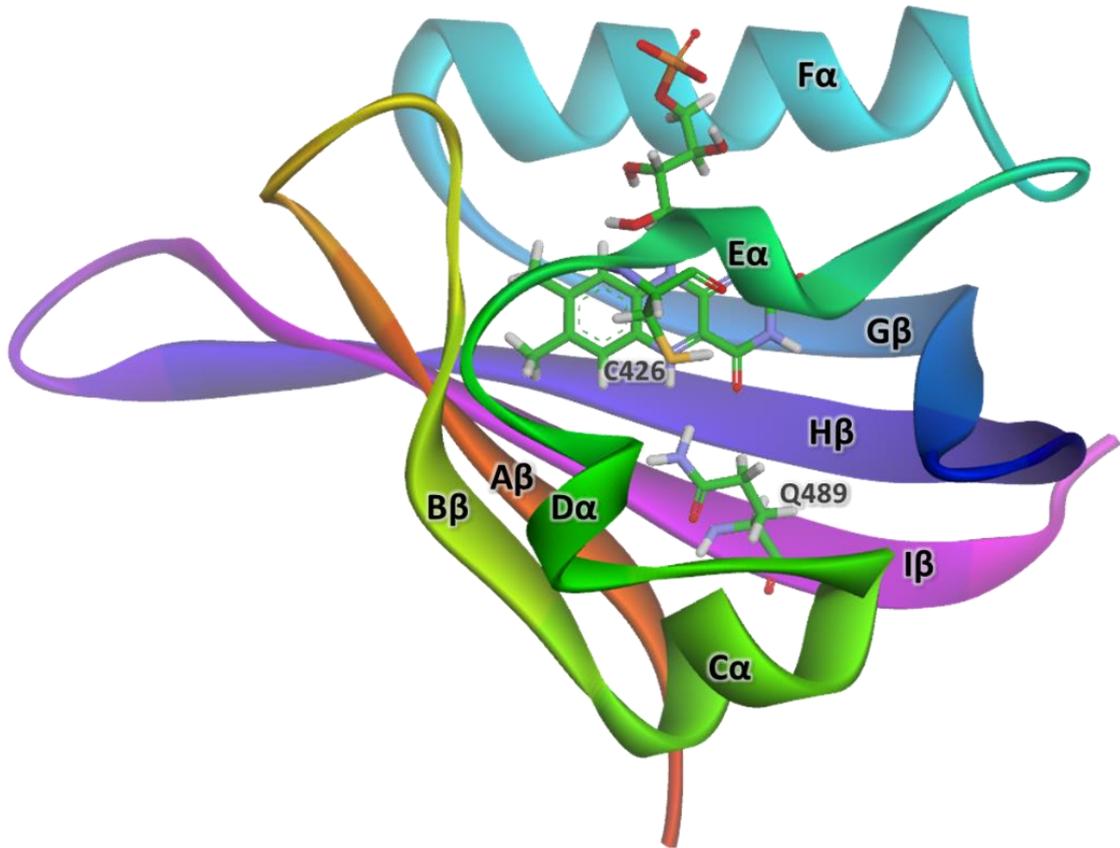


Рисунок. 1.1. Структура LOV2 домена из phot2 *Arabidopsis thaliana*.

LOV домены нековалентно связывают преимущественно флавиномононуклеотид (FMN), реже – флавинадениндинуклеотид (FAD) (рисунок 1.2). Флавины могут находиться в окисленном состоянии (в котором они связываются с LOV доменами), в полухинонной форме (в которой восстановлен один электрон) и восстановленном состоянии (восстановлены два электрона) [7]. Флавины обладают высоким квантовым выходом образования триплетных состояний ($\Phi_T = 0,5-0,7$) и относительно высоким квантовым выходом флуоресценции ($\Phi_F = 0,25-0,3$) [7].

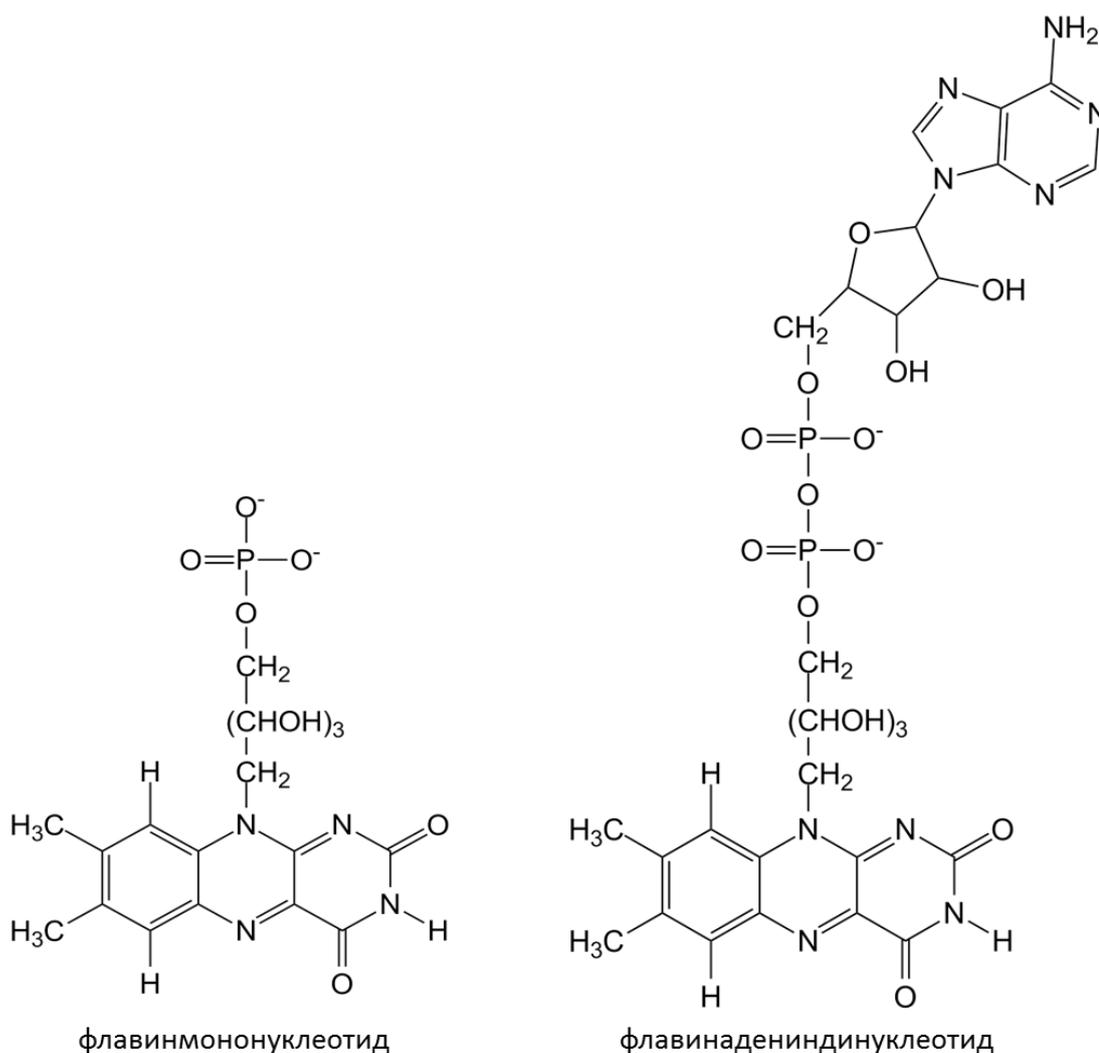


Рисунок 1.2. Структурные формулы флавинмоноклеотида и флавинадениндинуклеотида.

Сигнальная функция LOV доменов реализуется через фотоцикл, который стартует из темного состояния, в котором флавин нековалентно связан с белком. При освещении синим и UVA светом флавин переходит в триплетное состояние, которое, распадаясь, формирует фотоаддукт между хромофором и строго консервативным аминокислотным остатком цистеина (C426 LOV2 в *phot2 Arabidopsis thaliana*, C62 в *YtvA-LOV Bacillus subtilis*). Фотоактивный цистеин находится внутри строго консервативного мотива GXNCRFLQ (где в качестве X может выступать любая аминокислота), присущего всем LOV доменам [8]. Гамма-атом серы цистеина образует ковалентную связь с C4a атомом флавина, а атом N5 становится протонированным. Квантовый выход формирования фотоаддукта

находится в пределах от 0,3 до 0,6 при освещении синим светом, и сильно падает при UVA освещении. [5]

Фотоаддукт, так называемое светлое состояние, термически распадается, возвращаясь в темное состояние (рисунок 1.3). Длительность этого процесса сильно варьируется в зависимости от белка и может продолжаться от секунд до часов и дней при комнатной температуре [5]. Лимитирующей стадией реакции разложения светлого состояния в темное является перенос протона с атома N5. Реакция может быть ускорена мутациями аминокислот, находящихся вблизи хромофора [9]. Также переход из темного в светлое состояние можно спровоцировать облучением UVA светом (около 390 нм), но эффективность такого перехода будет очень низкой [5].

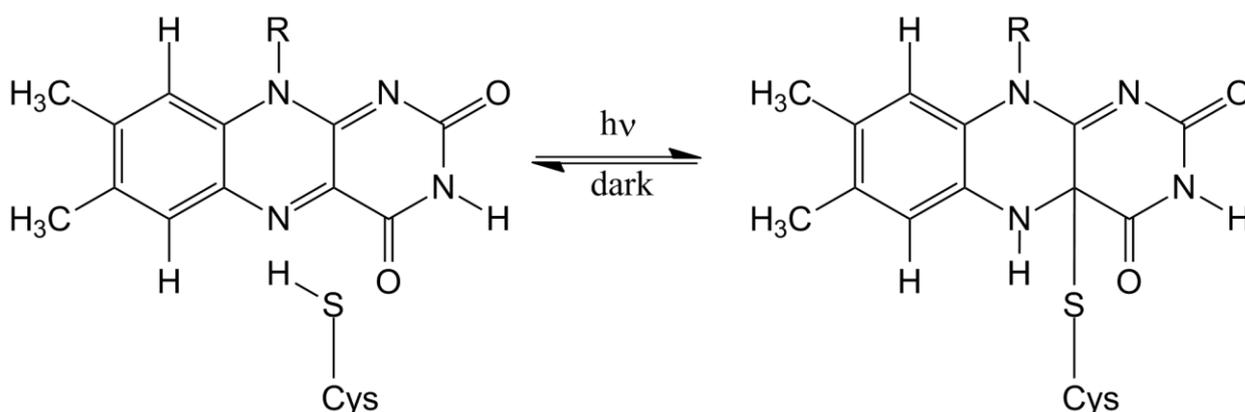


Рисунок. 1.3. Фотореакция в LOV доменах.

Образование фотоаддукта запускает ряд конформационных изменений, приводящих к передаче сигнала от LOV домена к белку-эффектору. Первым шагом в передаче сигнала является поворот боковой цепи строго консервативного глутамина, находящегося на I β листе (Q489 в LOV2 из phot2 *A. thaliana*, Q123 в YtvA из *B. subtilis*), вызванный протонированием атома N5 флавина [5] (рисунок 1.4).

Однако как было показано в работе [10], образование фотоаддукта не является обязательным условием для передачи сигнала. Для хорошо изученных LOV белков VVD и YF1 было показано экспериментально, что и в отсутствии

фотоактивного цистеина происходят структурные изменения, характерные для светлого состояния. Облучение синим светом рецепторов VVD и YF1, в которых фотоактивный цистеин был замещен на аланин, провоцирует восстановление флавина в полухинонную форму с протонированным атомом N5. Также в работе [10] было показано существование природных LOV-подобных доменов, в которых сохраняются все строго консервативные аминокислотные остатки, за исключением цистеина. Одним из таких белков является BAT-LOV* (астериск означает отсутствие фотоактивного цистеина, BAT = bacterio-opsin activator) галоархеи *Halorubrum hochstenium*. Попытки превратить BAT-LOV* в традиционный LOV домен заменой пролина в активном сайте на цистеин не привели к образованию фотоаддукта при освещении, но увеличили скорость фотовосстановления. Было выдвинуто предположение, что LOV домены могли произойти от флавопротеинов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах, но не содержащих цистеин, способный формировать аддукт. Введение такого цистеина позволило бы увеличить фоточувствительность [10].

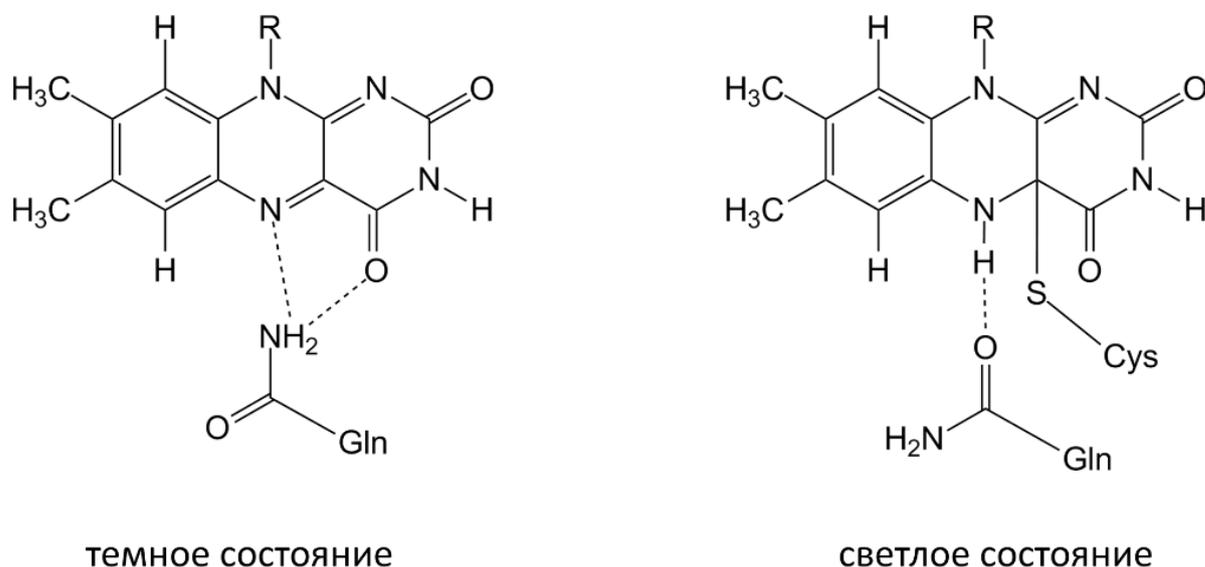


Рисунок 1.4. Поворот боковой цепи консервативного глутамина в LOV доменах.

Одним из наиболее изученных LOV доменов является AsLOV2 (LOV2 домен в phot1 *Avena sativa*). N и C-концы AsLOV2 продолжены спиралью, обозначаемыми как A'α и Jα соответственно. В темном состоянии они связаны с

LOV ядром гидрофобными взаимодействиями [11,12]. Образование светлого состояния приводит к обратимому разворачиванию $J\alpha$ спирали [10]. Также известно, что $A'\alpha$ спираль тоже участвует в процессе передачи сигнала [11], [13]. Однако даже для хорошо изученного *AsLOV2* неизвестны точные механизмы, по которым образование фотоаддукта приводит к разворачиванию $J\alpha$ спирали.

Методы молекулярного моделирования являются одним из перспективных способов изучения передачи сигнала в LOV доменах. Результаты, полученные методом молекулярной динамики, также, как и экспериментальные данные, показывают связь консервативного глутамина (Q513 в *AsLOV2*) со структурным переходом в светлое состояние и показывают, что изменение конформации Q513 приводит к наклону $I\beta$ листа, при котором разрывается его взаимодействие с $J\alpha$ спиралью [14]. Дополнительно предсказывается возможность того, что образование водородной связи между N414 и Q513 в светлом состоянии изменяет динамику участка $A'\alpha$ - $A\beta$ - $B\beta$, усиливая его взаимодействие с $J\alpha$ спиралью [14]. В более позднем исследовании [15] было показано, что N414 играет важную роль в процессе разворачивания $J\alpha$ спирали. Было установлено влияние N414 на динамику фотоактивации через непосредственное влияние на структуру $J\alpha$ спирали в темном состоянии. Также N414 вызывал локальные изменения структуры вблизи от хромофора при разворачивании спирали в светлом состоянии. (Положение рассматриваемых аминокислот показано на рисунке 1.5)

Важную роль в передаче сигнала 513 глутамином также подтверждает экспериментальное исследование [16], в котором было выявлено, что замена Q513L фиксирует LOV домен в псевдотемном состоянии, которое несущественно реагирует на облучение, а замена Q513N переводит LOV в псевдоосвещенное состояние. Эффект замены Q513N вероятно состоит в том, что N513 приходится принимать конформацию, характерную для освещенного состояния, из-за более короткой боковой цепи [14]. Мутация Q513L предотвращает передачу сигнала за счет того, что L513 не способен участвовать в сети водородных связей между Q513 и хромофором, N414, N492 [14].

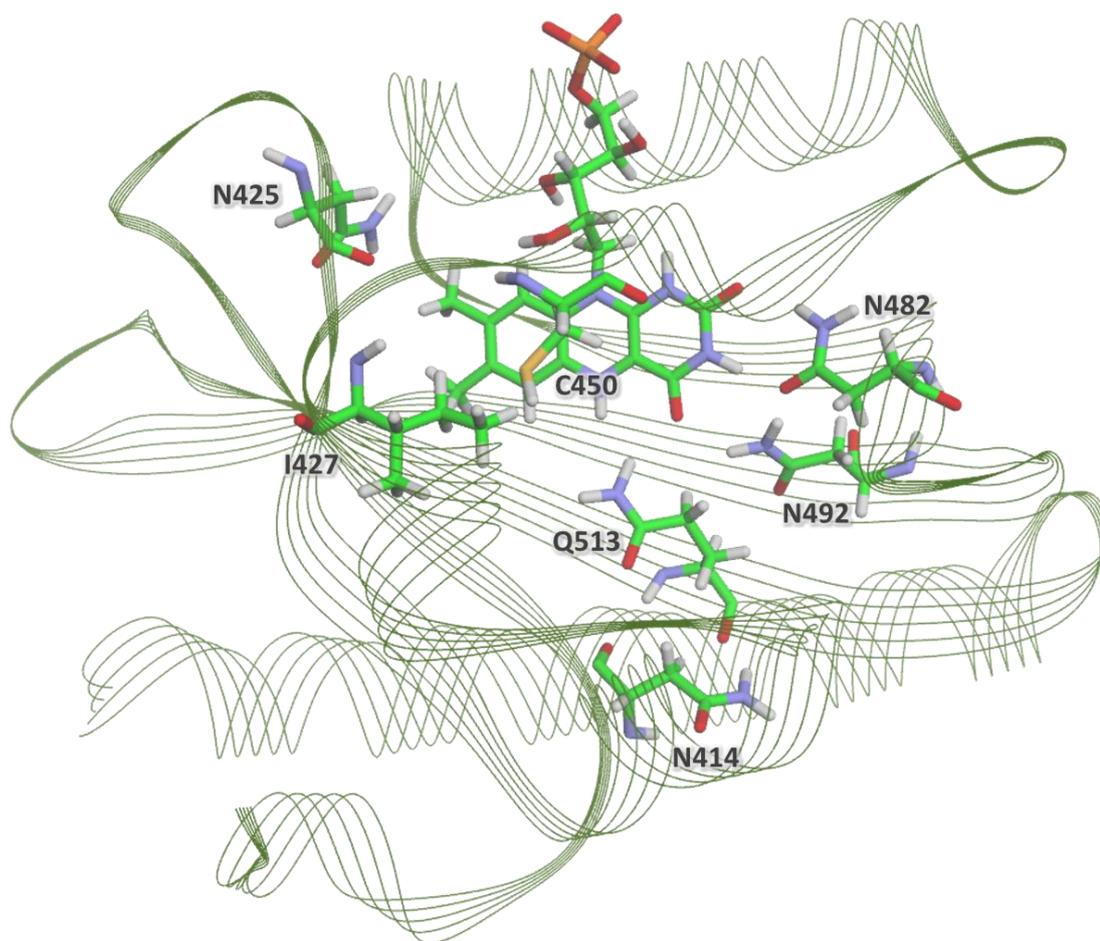


Рисунок 1.5. Белок AsLOV2. Здесь и далее атомы С, Н, О, N обозначены соответственно зеленым, светло-серым, красным, синим цветами.

Другой хорошо изученный LOV домен находится в фоторецепторе YtvA бактерии *Bacillus subtilis*, в котором он присоединен к С-концу STAS домена при помощи J α спирали. Однако в отличие от AsLOV2, где J α спираль примыкает к ядру, у YtvA-LOV она направлена от ядра домена и при возбуждении синим светом и последующем формировании фотоаддукта не разворачивается.

Для рецептора YtvA было показано, что он существует в виде димера и имеет форму, напоминающую гантель (рисунок 1.6) [8]. При облучении синим светом два мономерных YtvA-LOV вращаются друг относительно друга приблизительно на 5° [17].

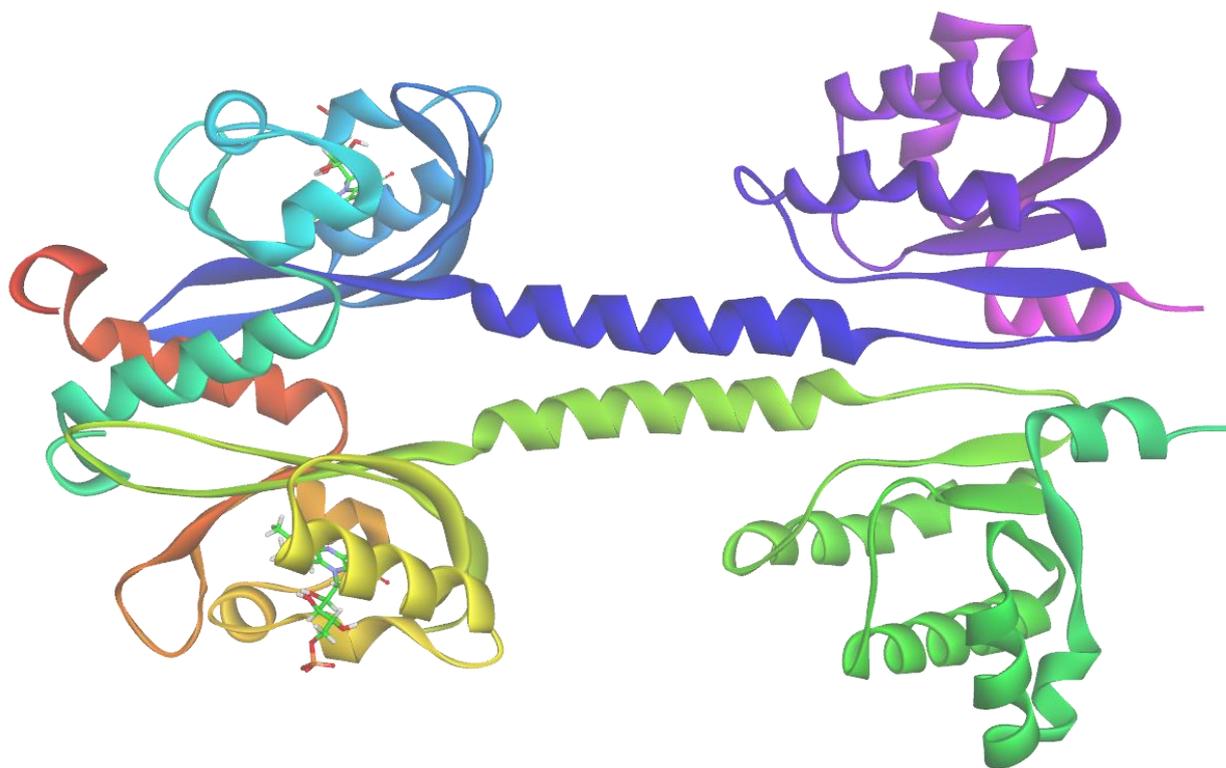


Рисунок 1.6. Рецептор YtvA-LOV.

В отличие от *AsLOV2*, в случае с *YtvA-LOV* замена консервативного глутамина на аспарагин Q123N приводит не к фиксации белка в псевдоосвещенном состоянии, а к значительному ускорению реакции восстановления в 85 раз [18]. В той экспериментальной работе авторы фокусируются на изучении водородных связей между консервативными полярными незаряженными аминокислотными остатками N94, N104, Q123 и изоаллоксазиновым кольцом флавинмононуклеотида. Замена аспарагина на аспарагиновую кислоту в 94 и 104 позициях приводила только к небольшому синему сдвигу в спектрах поглощения и испускания в несколько нм. (Положение обсуждаемых аминокислотных остатков показано на рисунке 1.7.)

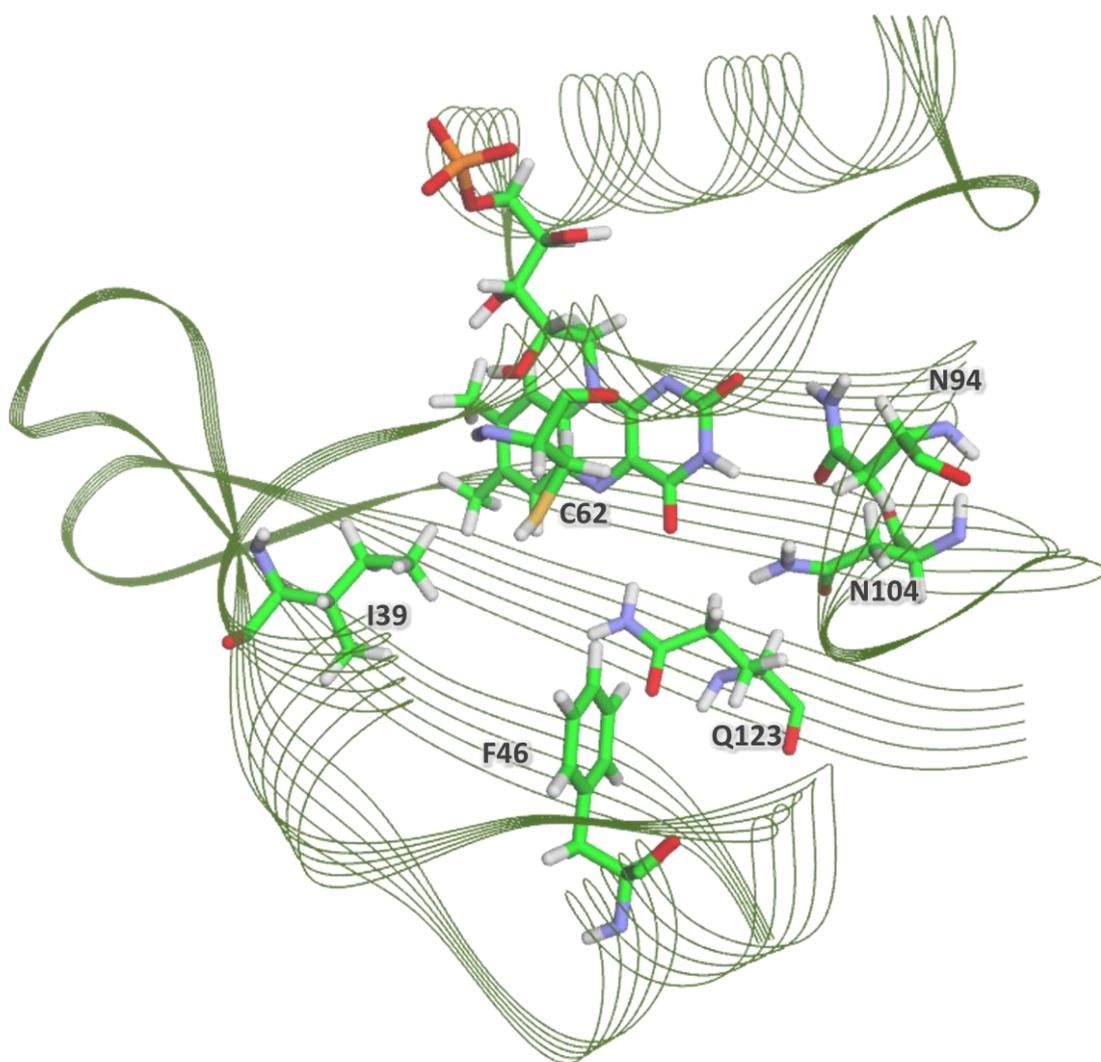


Рисунок 1.7. Белок YtvA-LOV. Показаны аминокислотные остатки 24-126.

Также на фотоцикл оказывают влияние и те аминокислотные остатки, которые не образуют водородные связи с хромофором, но участвуют в стерических взаимодействиях. Например, в работе [19] авторы исследуют роль консервативного аминокислотного остатка фенилаланина в LOV доменах. Они использовали экспериментальные и расчетные методы на системе YtvA-LOV. В данном LOV домене консервативный аминокислотный остаток фенилаланина находится в положении 46. Он находится в близости от вовлеченного в водородную связь с флавиномононуклеотидом глутамина Q123, чей поворот цепи участвует в передаче сигнала в светлом состоянии. При освещении синим светом F46 подвергается конформационным изменениям, видимо, участвуя в передаче сигнала. Фенильное

кольцо F46 поворачивается на 70 градусов к фотоаддукту, заполняя собой то пространство, в котором находился глутамин Q123 в темном состоянии [17]. Было найдено, что замена на аланин (F46A) приводит к псевдо-темному состоянию (глутамин Q123 не меняет своей конформации даже после образования фотоаддукта), а замена на тирозин (F46Y) вызывает псевдо-светлое состояние (боковая цепь глутамина Q123 в темном состоянии ориентирована так же, как и в светлом). Обе мутации значительно ускоряют фотоцикл за счет уменьшения времени восстановления из светлого состояния в темное, что происходит из-за понижения активационного барьера.

Помимо увеличения скорости восстановления, мутация фенилаланина на тирозин также вызывает снижение квантового выхода (0,18 против 0,49 в диком типе), предположительно из-за наличия молекулы воды вблизи хромофора, которая создает возмущения в хромофор-содержащем кармане путем нарушения сети водородных связей с белком, что делает хромофор более подвижным. Эту молекулу воды видно в молекулярно-динамических траекториях.

В другом исследовании было выявлено, что двойная мутация I39V/F46H в белке YtvA-LOV приводит к еще большему увеличению скорости реакции восстановления в 75 раз [20]. Подобный эффект ускорения реакции также был найден и для аминокислотного остатка в AsLOV2 I427, аналогичного I39 в YtvA-LOV [21]. Также ускорение фотоцикла происходит у AsLOV2 при мутации N425, находящегося вблизи 8 α -метиловой группы, на цистеин. Исходя из этого, можно предположить, что N425 фиксирует изоаллоксазиновое кольцо таким образом, чтобы стабилизировать фотоаддукт.

Так как LOV домены обладают природным фотоциклом, одним из направлений их практического применения является оптогенетика. Оптогенетика – это метод исследования динамических процессов в клетках при помощи конструкций, состоящих из фотоактивного белка и белка-эффектора. Оптогенетика позволяет при помощи освещения включать или выключать различные клеточные процессы, например, такие как ферментативная активность, экспрессия генов, рекомбинация ДНК, апоптоз и другие [22]. Изначально метод оптогенетики был

разработан для применения в нейронах и миоцитах и использовал конструкции на основе опсинов [23],[24],[25].

Из-за небольшого размера LOV домены часто используются для создания различных оптогенетических конструкций. Одной из первых таких конструкций стал LOV2-Rac1, состоящий из *AsLOV2* домена и малой ГТФазы Rac1 (рисунок 1.8). В этой конструкции Rac1 стерически заблокирован присоединенным к N-концу доменом *AsLOV2*. При освещении синим светом $J\alpha$ спираль разворачивается, высвобождая Rac1. LOV2-Rac1 способен эффективно контролировать сокращение и движение животных клеток [26], [27]. На данный момент существуют различные оптогенетические конструкции на основе LOV доменов различного действия, применимых не только для исследования процессов, происходящих внутри живых клеток, но и также для создания материалов с изменяемыми свойствами и возможной терапии раковых опухолей [26], [28], [29], [30], [31].

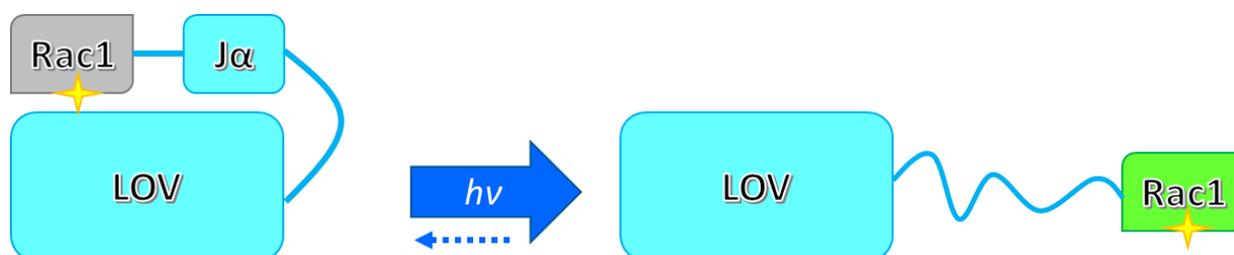


Рисунок 1.8. Принцип работы оптогенетической конструкции LOV2-Rac1.

Также за счет обратимого фотоцикла белки на основе LOV доменов могут применяться в методах спектроскопии сверхвысокого разрешения RESOLFT и STED [32], [33]. В эксперименте было показано, что YtvA-LOV не обладает необходимыми характеристиками для практического применения из-за слабой флуоресценции и низкой эффективности переключения в темное состояние под действием ультрафиолетового света [33], поэтому позже [34] были получены новые фотоперключаемые флуоресцентные белки rsLOV1 и rsLOV2.

Замена фотоактивного цистеина на другую аминокислоту, например, аланин, предотвращает образование аддукта и тем самым нарушает фотоцикл LOV доменов, фиксируя их в темном, флуоресцентном состоянии. Более того, такая замена усиливает квантовый выход флуоресценции [35]. Независимость флуоресценции LOV доменов от присутствия кислорода, а также факт, что они связывают флавинмононуклеотид, содержащийся в живых клетках, делают их привлекательными для использования в качестве репортеров. Флуоресцентные белки, построенные на основе LOV доменов, получили общее название флавинсодержащих флуоресцентных белков (FbFPs).

Первые флавинсодержащие флуоресцентные белки, *BsFbFp* и *PpFbFp*, были построены на основе бактериальных LOV доменов. Для создания *BsFbFp* (261 аминокислота) был использован YtvA-LOV фоторецептор из *B. Subtilis*, а для *PpFbFp* (148 аминокислот) – фоторецептор SB2 *Pseudomonas putida*. Из *BsFbFp* был получен усеченный до LOV домена и кодон-оптимизированный для экспрессии в *E.coli EcFbFp*, состоящий из 137 аминокислот [36]. Полученные флуоресцентные белки были успешно использованы в бактериях [36] и животных клетках [37], в том числе и в анаэробных условиях. Однако недостатком этих и других бактериальных флавинсодержащих флуоресцентных белков является их димеризация.

Позже был создан новый флуоресцентный белок iLOV (improved LOV) с улучшенными свойствами [38]. В качестве основы был использован LOV2 домен из *phot2 Arabidopsis thaliana* из-за его мономерности [39]. iLOV получен заменой фотоактивного цистеина C426 на аланин и последующей ДНК-перетасовкой с другими тремя LOV кодирующими последовательностями из *A. Thaliana*, содержащих мутацию цистеина на аланин. iLOV состоит из 109 аминокислот (387-496 согласно нумерации *phot2*) и содержит 6 мутаций (C426A, S409G, F470L, S394T, I452T, M475V). По сравнению с LOV2 доменом с мутацией C426A, iLOV обладает более высоким квантовым выходом (0,44) и улучшенной флотабильностью. Малый размер iLOV позволил ему превзойти GFP в исследованиях вирусных инфекций растений [38]. В дальнейшем iLOV неоднократно применялся в исследованиях различных как растительных, так и

животных вирусных инфекций [40], [41], [42], [43]. Изучение свойств *EcFbFp*, *PpFbFp* и *iLOV* показало, что они флуоресцируют в широком диапазоне pH (от 4 до 11) и обладают высокой термостабильностью (*iLOV* сохраняет около 60% флуоресценции при 60 °C) [44].

Еще позднее были разработаны новые варианты *iLOV* с улучшенной фотостабильностью [45]. Одним из таких белков является *phiLOV2.1* (photostable *iLOV*), обладающий еще 6 мутациями (N390S, N401Y, L422M, Q478R, E481G, D491V), однако меньшим квантовым выходом.

В дальнейших попытках улучшить спектральные свойства флавинодержащих флуоресцентных белков из водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* и *Vaucheria frigida* были получены *CreiLOV* и *VafLOV* соответственно, обладающие повышенной фотостабильностью и яркостью (*CreiLOV*) [46].

Также были созданы варианты флавинодержащих флуоресцентных белков с улучшенной термостабильностью на основе LOV доменов термофильных бактерий, например, *MrFbFP*, *YNP3FbFP*[47], *CagFbFP* [48].

Флавинодержащие флуоресцентные белки могут применяться не только для визуализации, но и также возможно их использование в составе биосенсоров, основанных на явлении Фёстеровского резонансно-индуктивного переноса энергии (FRET). Он заключается в том, что при нахождении двух хромофоров в непосредственной близости друг от друга, между ними может произойти безызлучательный перенос энергии при помощи диполь-дипольного взаимодействия.

Примером конструкции, основанной на явлении Фёстеровского резонансно-индуктивного переноса энергии является сенсор *FluVO* [49]. Он был сконструирован для измерения уровня молекулярного кислорода в клетках. Он содержит в качестве донора флавинодержащий флуоресцентный белок *EcFbFP* и желтый флуоресцентный белок *YFP* в качестве акцептора. *YFP* относится к GFP-подобным белкам, что означает, что для созревания хромофора и последующей флуоресценции необходим молекулярный кислород. Следовательно, при освещении синим светом с длиной волны 450 нм в отсутствие кислорода перенос

энергии будет отсутствовать, и будет наблюдаться флуоресценция *EcFbFP* с максимумом испускания при 495 нм, тогда как в присутствии кислорода этот перенос произойдет, и будет наблюдаться флуоресценция YFP с максимумом при 528 нм (рисунок 1.9).

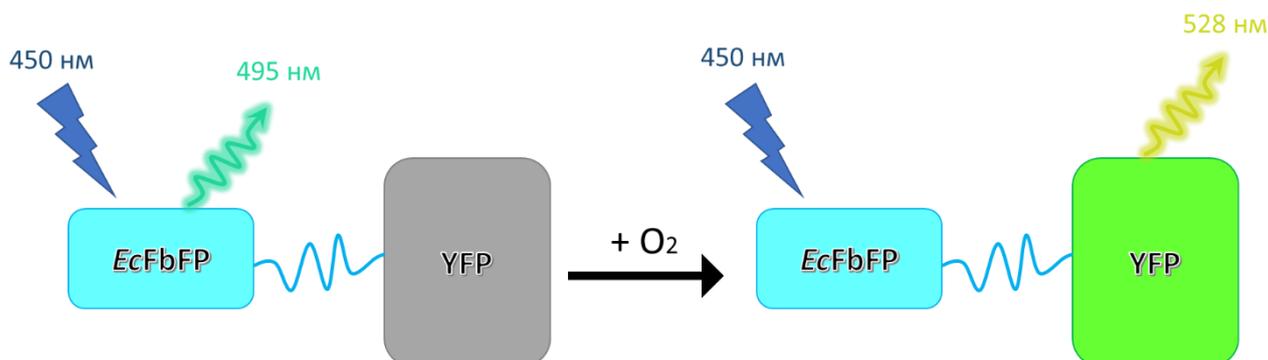


Рисунок 1.9. Принцип работы FRET-сенсора молекулярного кислорода FluBO.

Однако несмотря на существующее разнообразие флавиносодержащих флуоресцентных белков, полученных из LOV доменов различных организмов, на данный момент еще не получилось добиться существенного изменения положений максимумов поглощения и испускания. Схожесть максимумов полос поглощения и испускания для разных флавиносодержащих флуоресцентных белков, а также их невысокая яркость, являются главными недостатками, ограничивающими их применение.

Глава 2. Расчётные методы

2.1 Построение моделей

Полноатомные молекулярные модели iLOV и всех рассмотренных его мутантных форм были созданы на основе кристаллической структуры (PDB ID: 4EET) [45], содержащей координаты тяжелых ядер. Атомы водорода были добавлены с учетом положительного заряда боковых цепей лизина и аргинина, и отрицательного заряда боковых цепей глутаминовой и аспарагиновой кислот.

Полноатомные молекулярные модели YtvA-LOV, rsLOV1 и rsLOV2 были построены на основе ЯМР-структуры YtvA *Bacillus subtilis* (PDB ID: 2MWG). Данная структура содержит полный рецептор *Bacillus subtilis* YtvA в димерной форме. Для построения моделей в соответствии с работой [34] были выбраны аминокислоты 1-146 для YtvA-LOV и 1-142 для rsLOV1 и rsLOV2 мономера А. Для получения структур rsLOV1 и rsLOV2 были произведены точечные замены в соответствии с известными первичными последовательностями (рисунок 2.1). Было проверено, что боковые цепи аминокислот лизина и аргинина являлись положительно заряженными, глутаминовой и аспарагиновой кислот — отрицательно заряженными.

Все модельные системы были сольватированы в водных оболочках. Для моделей на основе iLOV их размер равнялся $69 \times 76 \times 74 \text{ \AA}^3$, для YtvA-LOV — $94 \times 74 \times 76 \text{ \AA}^3$ и $91 \times 74 \times 76 \text{ \AA}^3$ для rsLOV1 и rsLOV2. Заряды систем были нейтрализованы добавлением ионов натрия и хлора таким образом, чтобы ионная сила раствора равнялась 0,15М.

Ytva-LOV	1	MASFQSFGLPGQLEVIKALDHLRVGVVITDPALEDNPIVYVNGFVQMT
rsLOV1	1	MTRFQSFGLSGQLEVIKALDHLRVGVVITDPALEDNPIVYVNGFVQMT
rsLOV2	1	MTRFQSFGLSGQLEVIKALDHLRVGVVITDPALEDNPVVYVNGFVQMT
Ytva-LOV	51	GYE TEE ILGKNCRF LQ GKHTDPAEVDN I RTALQNKEPVTVQIQ NY KKDGT
rsLOV1	51	GYE AEE ILGKNCRI LQ GEHTDPAEVDI I RTALQNKEPVTVQI LN YRKDGT
rsLOV2	51	GYE AEE ILGK S CRIL Q GEHTDPAEVDI I RTALQNKEPVTVQI LN YRKDGT
Ytva-LOV	101	MFWN ELN IDPMEIEDKTYFVGIQNDITKQKEYEK LLED SLTEITAL
rsLOV1	101	MFWN LLH IVPIVIEGKTYFVGNQNDITKQKEYEK LLE RPHRG----
rsLOV2	101	MFWN LLH IVPIVIEGKTYFVGNQNDITKQKEYEK LLE RPHRG----

Рисунок 2.1. Выравненные аминокислотные последовательности YtvA-LOV, rsLOV1 и rsLOV2. Цветом выделены различия.

2.2 Расчеты молекулярно-динамических траекторий

Молекулярная динамика – это метод описания эволюции системы во времени при помощи интегрирования уравнений движения Ньютона [50]:

$$-\frac{dV}{dr} = m \frac{d^2r}{dt^2},$$

где r – вектор координат всех частиц (соответственно, в декартовых координатах для N частиц его размерность равна $3N$), V – потенциальная энергия системы, t – время.

В классической молекулярной динамике потенциальная энергия системы описывается при помощи силовых полей в рамках метода молекулярной механики. В данном методе молекулы рассматриваются, как набор заряженных шаров, соединенных друг с другом пружинами. Шары описывают атомы и могут иметь разные размеры, а пружины представляют химические связи и обладают разной длиной и жесткостью.

Потенциальная энергия в такой модели рассчитывается как

$$V = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{el} + E_{cross},$$

где E_{str} – энергия растяжения связей между двумя атомами, E_{bend} – энергия деформации угла между тремя атомами, E_{tors} – энергия изменения двугранных углов, E_{vdw} и E_{el} описывают взаимодействия между несвязанными друг с другом атомами, а именно энергию Ван-дер-Ваальса и энергию кулоновского взаимодействия, E_{cross} учитывает взаимодействия между предыдущими членами.

Эти энергии вычисляются на основе параметров, заложенных в силовое поле. Каждому атому, в зависимости от того, в каких связях он участвует, присваивается определенный тип, которому соответствует свой набор параметров. Существуют различные силовые поля, предназначенные для определенных объектов. В данной работе были использованы силовые поля CHARMM [51,52] и AMBER [53], которые хорошо описывают протеины.

Протокол расчёта. Для всех исследуемых систем были получены молекулярно-динамические траектории. Расчеты проводились в программном пакете NAMD [54]. Для каждой модели были получены траектории длительностью 50-100 нс. Расчеты проводились в NPT ансамбле, где для сохранения температуры 300 К и давления 1 атм использовалась динамика Ланжевена. Для электростатических взаимодействий был применен алгоритм PME [55]. Перед запуском расчетов молекулярно-динамических траекторий выполнялось 2000 шагов минимизации. Шаг интегрирования составил 1 фс.

Для описания белковой макромолекулы применялось силовое поле CHARMM [51,52], для молекул воды – модель TIP3P, для флавина и его аналогов – параметры и типы атомов CGenFF [56]. Заряды на атомах, присвоенные CGenFF, имели большие штрафы, поэтому они были оптимизированы при помощи Force Field Toolkit [57], реализованного в программном пакете VMD [58]. В таблицах А.1-А.4 приложения А приведены оптимизированные заряды атомов для флавиномононуклеотида и его аналогов.

2.3. Расчеты комбинированным методом квантовой механики и молекулярной механики

Белки являются макромолекулами. Модели, построенные для исследуемых в данной работе систем, содержат примерно от 36 до 49 тысяч атомов. Для таких больших систем на данный момент невозможно использовать квантово-химические методы, а методы, основанные на использовании силовых полей, не могут описывать образование или разрыв связей и другие явления, связанные с перераспределением электронной плотности.

Поэтому в случаях, когда ко всей системе невозможно применить квантово-механические методы, а методы молекулярной механики не воспроизводят интересующие явления, используется **комбинированный метод квантовой механики и молекулярной механики** (КМ/ММ).

Суть этого метода заключается в разделении системы на 2 части, одна из которых будет описываться квантово-химическими методами, а вторая – методами молекулярной механики. В таком случае полные гамильтониан и энергия системы могут быть записаны следующим образом [50]:

$$\hat{H} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{MM} + \hat{H}_{QM/MM},$$

$$E = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM},$$

где \hat{H}_{QM} и E_{QM} – гамильтониан и энергия квантовой подсистемы, \hat{H}_{MM} и E_{MM} – гамильтониан и энергия молекулярно-механической подсистемы, а $\hat{H}_{QM/MM}$ и $E_{QM/MM}$ описывают взаимодействия между ними.

Главные вопросы метода КМ/ММ – как учитывать взаимодействия между квантовой и молекулярно-механической подсистемами и каким образом делить систему на части. При расчете белковых молекул обычно раздел приходится на ковалентные связи. Проблема разрыва ковалентной связи чаще всего решается использованием линк-атомов [59]. Линк-атом (в основном используется водород) помещается на место разрыва связи и заполняет собой образовавшуюся свободную валентность.

Существует несколько подходов для учета взаимодействия между подсистемами. В данной работе используется схема электронного встраивания, в которой заряды на атомах ММ части поляризуют квантовую подсистему [50].

Протокол расчёта. Для iLOV, iLOV-Q489K, а также мутантных форм, отобранных для дальнейшего изучения, с флавином или его аналогами в качестве хромофора, был применен метод КМ/ММ для оптимизации геометрии белковых макромолекул.

В качестве стартовых структур были выбраны наиболее репрезентативные кадры из молекулярно-динамических траекторий, а именно кадры с сохраненными водородными связями между хромофором и белком, в которых аминокислотные остатки хромофор-содержащего кармана принимали свои типичные конформации.

В квантовую подсистему были включены:

- люмифлавин или его аналог,
- боковые цепи аминокислот, образующих водородные связи с хромофором (Q430, N458, N468 для всех систем, а также Q489 для iLOV-Q489_{in}, T394 для вариантов iLOV с 8-аминофлавинмононуклеотидом и 8-метиламинофлавинмононуклеотидом в качестве хромофора),
- для мутантных форм также были включены K489 или K392 и боковые цепи аминокислот и молекулы воды, образующие с ними водородные связи.

В молекулярно-механическую подсистему входили оставшаяся часть белковой макромолекулы и водная оболочка на расстоянии 5 Å от белка.

Квантовая подсистема описывалась на уровне DFT/cc-pvdz с функционалом PBE0 [60] и дисперсионной поправкой D3 [61]. Молекулярно-механическая подсистема описывалась силовым полем AMBER [53]. Расчет проводился в программном пакете NWChem [62].

2.4. Расчет вертикальных энергий возбуждения и испускания

Для систем с оптимизированными методом КМ/ММ геометриями были получены вертикальные энергии возбуждения и испускания. Расчёты проводились для молекулярных кластеров, состоящих из квантовых подсистем, использованных в расчетах методом КМ/ММ.

Вертикальные энергии переходов рассчитывались методом многоконфигурационной квазивырожденной теории возмущений второго порядка ХМСQDPT2 [16], реализованном в программном пакете Firefly[17], частично основанном на исходном коде GAMESS (US) [18].

Для этого сначала были произведены расчёты методом конфигурационного взаимодействия с однократными возбуждениями (CIS). На основе полученных результатов были выбраны π -орбитали, участвующие в переходах, которые составили активное пространство для расчетов многоконфигурационным методом самосогласованного поля в полном активном пространстве (CASSCF). Активное пространство состояло из 12 электронов, распределенных на 12 молекулярных орбиталях CASSCF(12/12) во всех случаях, кроме расчётов вертикальных энергий поглощения для систем, содержащих 1-деазафлавин. Молекулярные орбитали, входящие в активное пространство, показаны для всех систем в приложении Б, рисунки Б1-Б18. Было применено усреднение по 2 нижним синглетным состояниям с равными весами. Для количественной оценки энергий вертикальных электронных переходов использовался метод многоконфигурационной квазивырожденной теории возмущений ХМСQDPT2. Для выбора размерности эффективного гамильтониана в методе ХМСQDPT2 для iLOV с разными хромофорами последовательно рассчитывались энергии переходов с разным ее значением. Для дальнейших расчетов были выбраны те размерности, при которых значения энергий переходов выходили на плато. Таким образом, размерность эффективного гамильтониана выбиралась равной 16 во всех случаях, кроме расчетов вертикальных энергий поглощения для систем с 1-деазафлавином, где она была равна 2.

Чтобы рассчитать вертикальные энергии испускания, были локализованы минимумы в S_1 возбужденном состоянии. В качестве стартовых точек для оптимизации геометрии были использованы молекулярные кластеры, соответствующие квантовым подсистемам из расчетов КМ/ММ. Конечные атомы углерода всех молекулярных фрагментов (хромофор и аминокислотные остатки) были зафиксированы в ходе оптимизации геометрии. Для S_1 состояния градиенты и силы были рассчитаны на SA-CASSCF(2/2) (для систем с флавином в качестве хромофора) или SA-CASSCF(4/4) (системы с модифицированными хромофорами) волновых функций с усреднением по двум нижним синглетным состояниям и отслеживанием 4 нижних синглетных состояний для всех систем. Для систем с аналогами флавина необходимость расширить активное пространство связана с более адекватным воспроизведением геометрии возбужденного состояния. Молекулярные орбитали, выбранные в активное пространство, показаны в приложении В на рисунках В1-В18.

Известно, что описание спектральных характеристик 1-деазафлавина является непростой задачей как в водном растворе, так и в YtvA-LOV белке [23]. Поэтому для расчета вертикальных энергий поглощения у систем, содержащих 1-деазафлавин, был выбран метод XMCQDPT2/CASSCF(2/2)/cc-pvdz, так как он дает самые близкие к экспериментальным значениям результаты. Вертикальные энергии испускания для систем с 1-деазафлавином рассчитывались так же, как и для других белков.

Более того, для полученных методом КМ/ММ геометрий были проведены дополнительные оценки энергий переходов методом конфигурационного взаимодействия с однократными и выборочными двукратными возбуждениями с поправкой по теории возмущений (SOS-CIS(D)) [19], реализованным в программном пакете QChem [20], и методом нестационарной теории функционала электронной плотности (TD-DFT) с функционалом ω B97X-D3 [21] в программном пакете ORCA [22].

Функционал ω B97X-D3 был выбран, так как он завышает энергии переходов меньше, чем функционал B3LYP их занижает, и адекватнее воспроизводит разницу в энергиях переходов между системами (приложение Г, таблица Г1).

Дополнительно для аналогов флавина были получены энергии поглощения в газовой фазе. Оптимизация геометрии проводилась на уровне теории PBE0-D3/cc-pvdz для молекулярных кластеров, состоящих из молекулы хромофора с обрезанным рибитиловым хвостом (т.е. для аналогов люмифламина) или молекулы хромофора и одной молекулы воды. Вертикальные энергии поглощения были рассчитаны методом XMCQDPT2/sa2-CASSCF(12/12)/cc-pvdz.

2.5. Расчет дипольных моментов перехода

Дипольные моменты поглощения и испускания были получены для систем на основе iLOV. Они рассчитывались для молекулярных кластеров методами XMCQDPT2/CASSCF(2/2)/cc-pvdz для $S_{0,\min}$ - S_1 перехода у систем с 1-деазафлавином в качестве хромофора и XMCQDPT2/CASSCF(12/12)/cc-pvdz во всех остальных случаях.

2.6. Расчет зарядов на атомах

Для систем на основе iLOV были получены заряды по Малликену. Они рассчитывались для основного электронного состояния на волновых функциях, полученных в расчетах XMCQDPT2/CASSCF(2/2)/cc-pvdz для iLOV с 1-деазафлавином и XMCQDPT2/CASSCF(12/12)/cc-pvdz для остальных систем.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Результаты, представленные в данной главе, изложены в работах [63], [64], [65], [66].¹

3.1. Разработка вариантов iLOV-Q489K с батохромным сдвигом подбором компенсирующих мутаций

Одними из наиболее трудно решаемых недостатков флавиносодержащих флуоресцентных белков являются их очень близкие значения максимумов поглощения и испускания [22], что ограничивает их практическое применение. Поэтому, важной задачей является разработка белков на основе LOV-доменов с батохромным сдвигом.

Известно, что изменение окружения хромофора в флуоресцентных белках влияет на их спектральные свойства, и может как уменьшить или увеличить квантовый выход флуоресценции, так и вызвать сдвиг полос поглощения и испускания. Ранее были предприняты попытки вызвать батохромный сдвиг для флавиносодержащего флуоресцентного белка iLOV заменой Q489K [67]. При помощи методов молекулярного моделирования было показано, что если положительно заряженная аминокислотная группа боковой цепи лизина будет образовывать

¹ При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Khrenova M.G., Meteleshko Y.I., Nemukhin A. V. Mutants of the Flavoprotein iLOV as Prospective Red-Shifted Fluorescent Markers // J. Phys. Chem. B. – 2017. – Vol. 121, № 43. – P. 10018–10025 (подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Метелешко Ю.И. в работе составляет 60%), Meteleshko Y.I., Nemukhin A. V., Khrenova M.G. Novel flavin-based fluorescent proteins with red-shifted emission bands: a computational study // Photochem. Photobiol. Sci. – 2019. – Vol. 18, № 1. – P. 177–189 (подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Метелешко Ю.И. в работе составляет 90%), 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 (подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Метелешко Ю.И. в работе составляет 90%), 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. (подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Метелешко Ю.И. в работе составляет 90%).

водородные связи с атомом N5 (рисунок 3.1) флавиномононуклеотида, то будет стабилизироваться электронная плотность в возбужденном состоянии, тем самым вызывая красный сдвиг в спектрах поглощения и испускания. Однако позже было экспериментально показано, что для данной мутантной формы наблюдается, наоборот, слабый синий сдвиг спектральных полос, вызванный тем, что гибкая боковая цепь лизина предпочтительно находилась в конформации, в которой она отвернута от хромофора в раствор [68].

Чтобы зафиксировать боковую цепь лизина в положении, в котором положительно заряженная аминогруппа будет взаимодействовать с флавином, необходимо подобрать компенсирующие мутации, которые посредством сети водородных связей будут фиксировать ее рядом с хромофором, для чего целесообразно использование методов молекулярного моделирования.

В данном разделе изложены результаты поиска таких мутаций и предложены варианты флуоресцентных белков на основе iLOV, для которых были получены батохромные сдвиги полос поглощения и испускания различной величины, а также даны рекомендации по подбору компенсирующих замен [63].

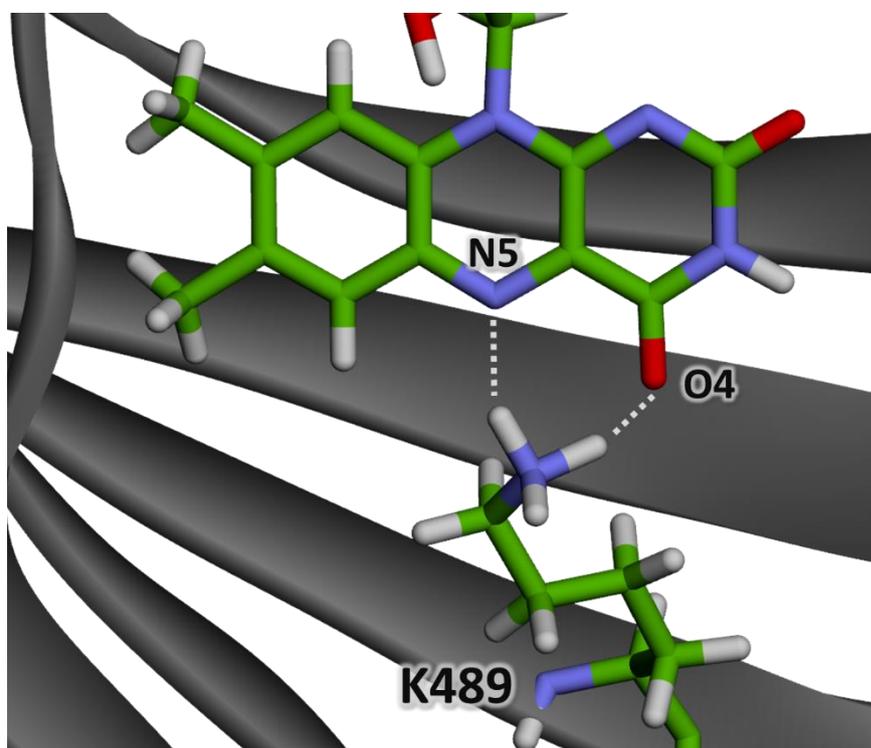


Рисунок 3.1. Образование водородных связей K489 с флавиномононуклеотидом в iLOV-Q489K.

3.1.1 Молекулярное моделирование iLOV и iLOV-Q489K

Чтобы проверить, насколько точно применяемые методы будут описывать исследуемые системы, сначала были рассмотрены белки, для которых известны экспериментальные данные, а именно iLOV и его мутантная форма iLOV-Q489K.

Чтобы понять, какие конформеры более характерны для рассматриваемых систем, для каждого белка – iLOV и iLOV-Q489K – были получены молекулярно-динамические траектории длительностью в 50 нс. На рисунке 3.2 изображен график изменения расстояний между атомами N5 и O4 флавина и атомом азота боковой группы 489 аминокислотного остатка вдоль траекторий.

Видно, что для мутантной формы iLOV-Q489K водородные связи рвутся практически сразу же, в самом начале траектории (после 3 нс), после чего боковая цепь лизина K489 принимает конформацию, в которой она направлена в раствор. Для iLOV эти связи более стабильны и держатся на протяжении первых 9 нс траектории. Более того, для обеих систем водородные связи с атомом N5 флавина рвутся практически в самом начале траекторий.

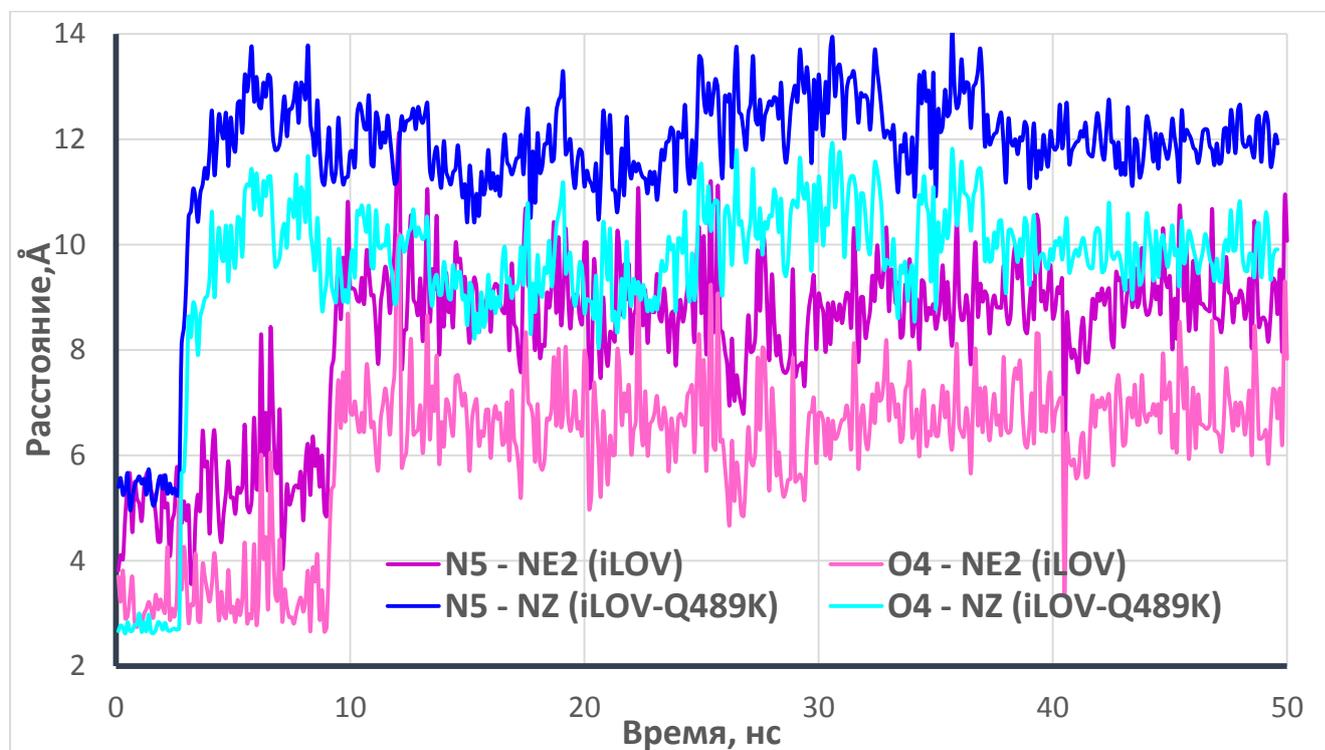


Рисунок 3.2. График изменения расстояний между хромофором и 489 аминокислотным остатком в молекулярно-динамических траекториях.

В дальнейших расчетах 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). Примеры данных конформеров показаны на рисунке 3.3.

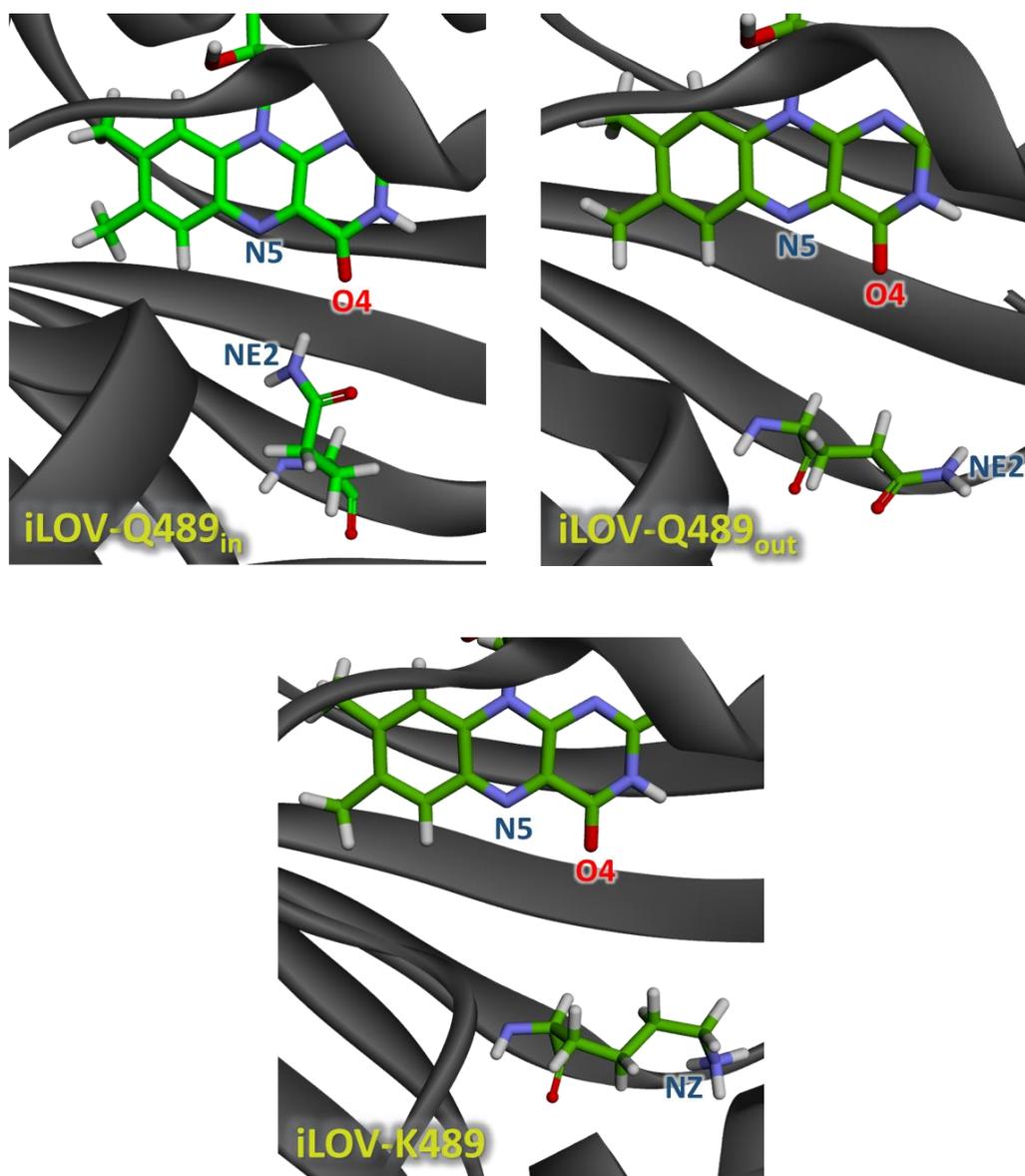


Рисунок 3.3. Рассматриваемые конформеры iLOV и iLOV-Q489K.

Затем для iLOV-Q489_{in}, iLOV-Q489_{out} и iLOV-K489 были рассчитаны вертикальные энергии возбуждения $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ и испускания $S_{1,\min} \rightarrow S_0$. В таблице 3.1 приведены значения, полученные в расчетах методом XMCQDPT2, а также

известные экспериментальные данные. Как видно, полученные длины волн хорошо совпадают с экспериментальными данными [45], [68].

Таблица 3.1. Экспериментальные и рассчитанные длины волн (в нм) возбуждения и испускания для iLOV и iLOV-Q489K. В скобках указаны силы осцилляторов.

Система	Возбуждение $S_{0,\min} \rightarrow S_1$	Испускание $S_{1,\min} \rightarrow S_0$	Источник
iLOV	447	497	[45]
iLOV	450	497	[68]
iLOV-Q489K	440	489	[68]
iLOV-Q489 _{in}	441 (0.40)	491 (0.23)	Данная работа
iLOV-Q489 _{out}	439 (0.27)	496 (0.21)	Данная работа
iLOV-K489 (K489 _{out})	437 (0.29)	492 (0.22)	Данная работа

3.1.2. Разработка новых мутантных форм iLOV

Данная часть работы посвящена подбору компенсирующих мутаций для iLOV-Q489K. Для этого было тщательно проанализировано окружение мутированного лизина, и были выбраны достаточно близкие к K489 позиции (392, 410, 426, 428, 442, 454, 470, 472, 487). В эти позиции 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.

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 NZ-N5 и NZ-O4. 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». Краткие названия для отобранных систем и наборы замен приведены в таблице 3.2, а на рисунке 3.4 отмечены все позиции, подвергающиеся мутациям в этих вариантах.

Таблица 3.2. Краткие названия для перспективных вариантов iLOV.

Обозначение	Замены
iLOV-K489t	Q489K/L470T
iLOV-K489a1	Q489K/L470D/G487S
iLOV-K489a2	Q489K/L470E/L472N
iLOV-K489a3	Q489K/L470N/L472D
iLOV-K392	V392K/F410V/A426S

На рисунке 3.5 приведен график вероятностного распределения расстояний в молекулярно-динамических траекториях для перспективных мутантных форм iLOV. Из графика видно, что для всех пяти отобранных вариантов рассмотренные расстояния колеблются около значений, типичных для водородных связей. Для всех систем стабильной оказывается как минимум водородная связь с атомом O4, тогда как водородная связь с атомом N5 присутствует не во всех случаях.

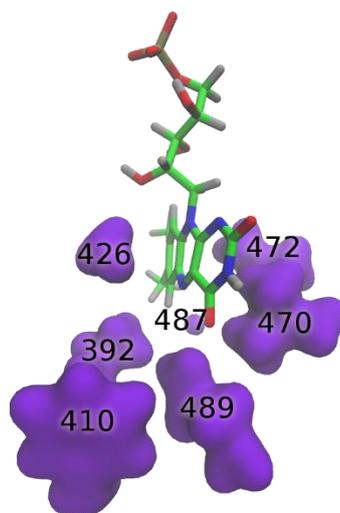


Рисунок 3.4. Позиции, подвергающиеся мутациям в отобранных вариантах.

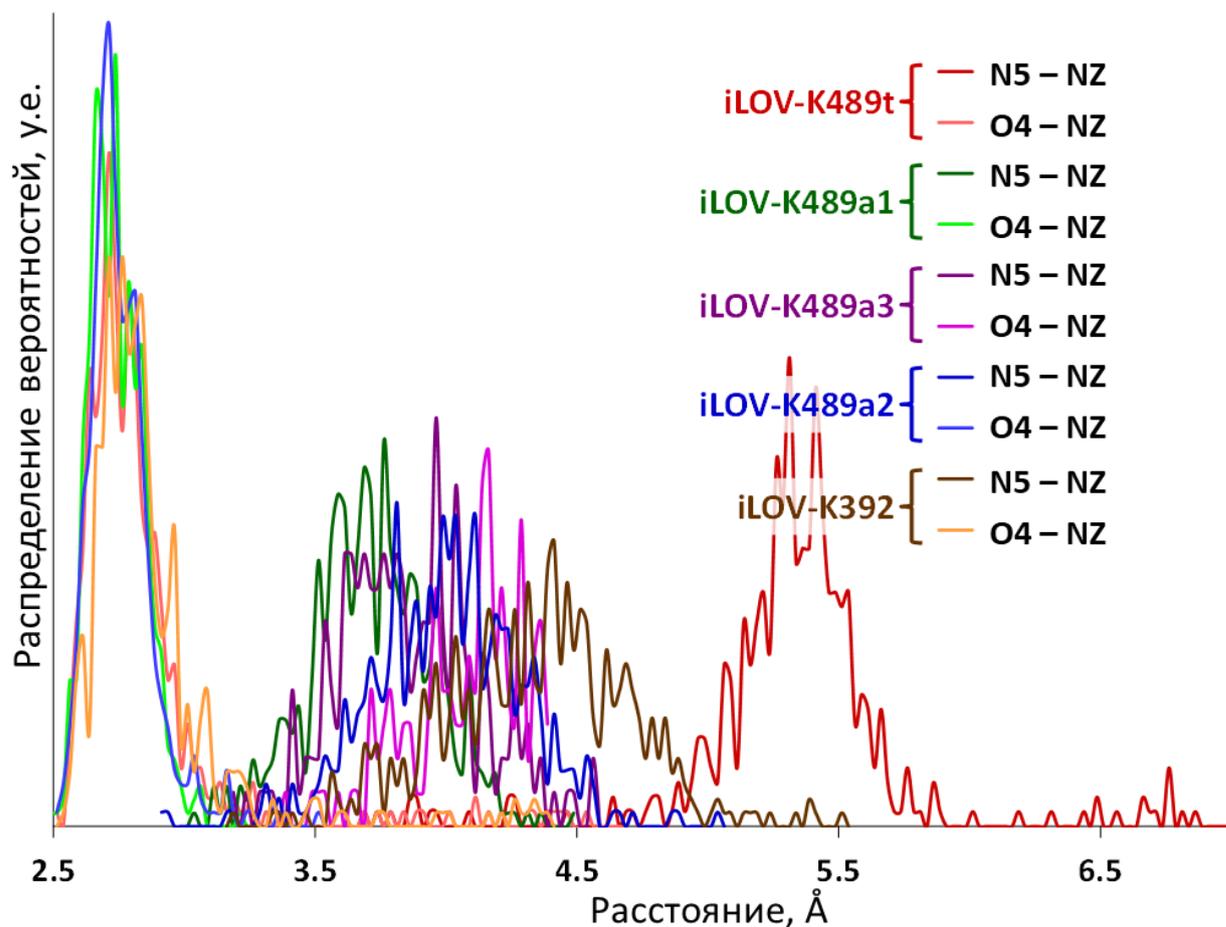


Рисунок 3.5. Вероятностное распределение расстояний в молекулярно-динамических траекториях для новых вариантов белка iLOV.

Затем для отобранных систем были рассчитаны вертикальные энергии возбуждения и испускания. На рисунке 3.6 показаны молекулярные кластеры, для которых производился расчет.

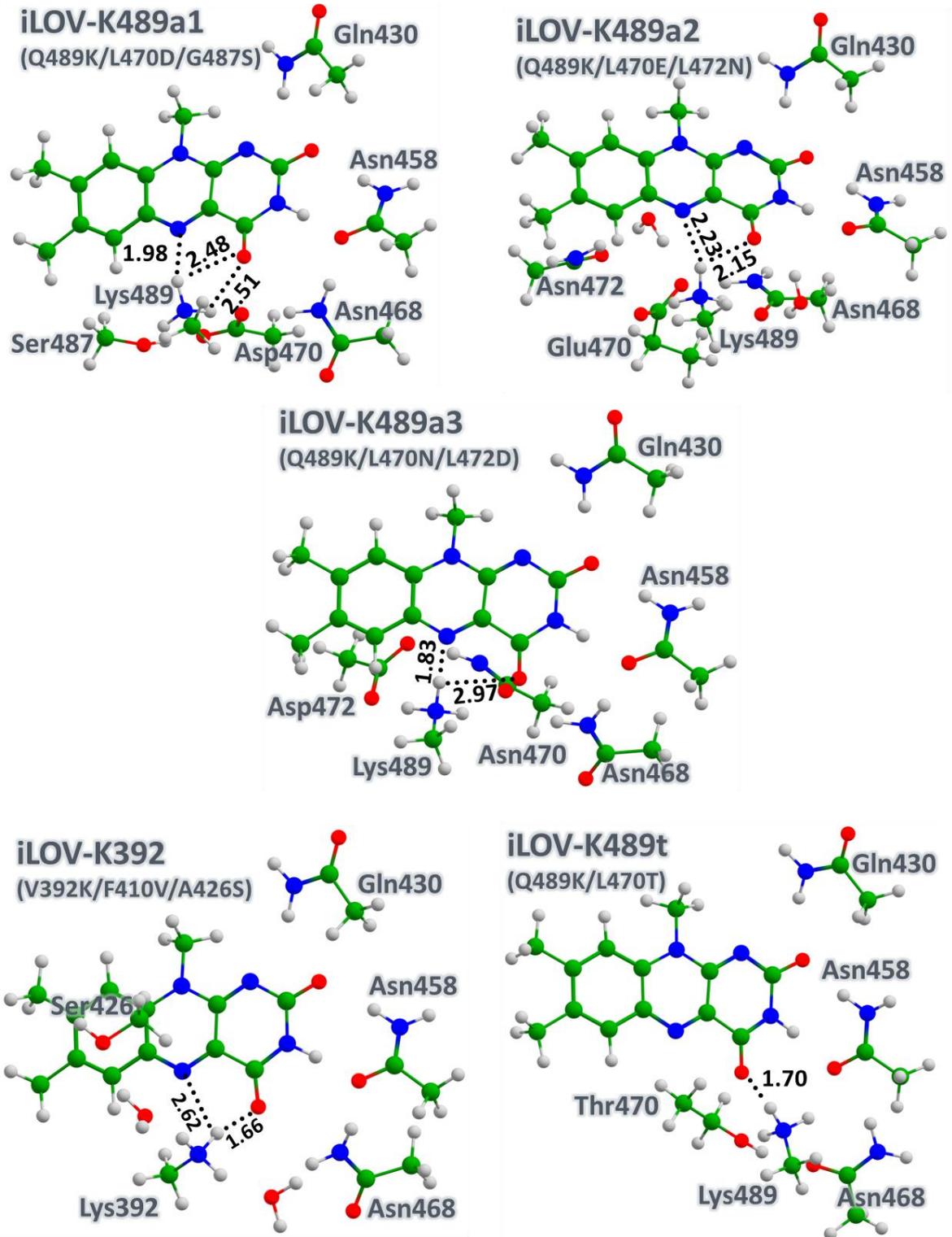


Рисунок 3.6. Квантовые подсистемы новых вариантов белка iLOV.

Результаты расчета вертикальных энергий возбуждения и испускания разными методами представлены в таблицах 3.3 и 3.4. Самые точные результаты предоставляет метод XMCQDPT2, а методы TD-DFT и SOS-CIS(D) хоть и не воспроизводят так хорошо экспериментальные значения, но предсказывают похожие спектральные сдвиги для мутантных форм iLOV относительно оригинального белка.

Таблица 3.3. Вертикальные энергии возбуждения и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $iLOV_{out}$.

Метод Система	XMCQDPT2		ω B97X-D3		SOS-CIS(D)	
	$S_{0,min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0,min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0,min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$iLOV_{in}$	2.81/441 (0.40)	-0.01 [+2]	3.66/339	-0.04 [+4]	3.14/394	-0.11 [+12]
$iLOV_{out}$	2.82/439 (0.27)	0	3.70/335	0	3.25/382	0
$iLOV$ -K489	2.84/437 (0.29)	+0.02 [-2]	3.69/336	-0.01 [+1]	3.23/384	-0.02 [+2]
$iLOV$ -K489t	2.64/469 (0.25)	-0.18 [+30]	3.59/346	-0.11 [+11]	2.98/416	-0.27 [+34]
$iLOV$ -K489a1	2.73/455 (0.26)	-0.09 [+16]	3.55/350	-0.15 [+15]	3.09/402	-0.16 [+20]
$iLOV$ -K489a2	2.77/447 (0.24)	-0.05 [+8]	3.53/351	-0.17 [+16]	2.97/417	-0.28 [+35]
$iLOV$ -K489a3	2.80/443 (0.32)	-0.02 [+4]	3.55/349	-0.15 [+14]	3.01/412	-0.24 [+30]
$iLOV$ -K392	2.52/492 (0.27)	-0.30 [+53]	3.49/356	-0.21 [+21]	2.89/429	-0.36 [+47]

Таблица 3.4. Вертикальные энергии испускания и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $iLOV_{out}$.

Метод Система	XMCQDPT2			$\omega B97X-D3$		SOS-CIS(D)	
	Стоксов сдвиг, эВ	$S_{1.min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1.min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1.min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$iLOV_{in}$	-0.28	2.53/491 (0.23)	0.03 [-5]	3.29/377	-0.05 [+6]	2.58/480	-0.07 [+11]
$iLOV_{out}$	-0.32	2.50/496 (0.21)	0	3.34/371	0	2.65/467	0
$iLOV-K489$	-0.32	2.52/492 (0.22)	0.02 [-4]	3.33/372	-0.01 [+1]	2.64/469	-0.01 [+2]
$iLOV-K489t$	-0.31	2.33/533 (0.19)	-0.17 [+37]	3.17/391	-0.17 [+20]	2.39/518	-0.26 [+51]
$iLOV-K489a1$	-0.23	2.50/497 (0.23)	0	3.24/383	-0.10 [+12]	2.55/487	-0.10 [+20]
$iLOV-K489a2$	-0.30	2.47/503 (0.16)	-0.03 [+7]	3.13/396	-0.21 [+25]	2.35/528	-0.30 [+61]
$iLOV-K489a3$	-0.37	2.43/509 (0.19)	-0.07 [+13]	2.90/428	-0.44 [+57]	2.13/582	-0.52 [+115]
$iLOV-K392$	-0.17	2.35/529 (0.20)	-0.15 [+33]	3.09/401	-0.25 [+30]	2.32/534	-0.33 [+67]

Для белков группы $iLOV-K489a$ (общей чертой которых является то, что одна из компенсирующих мутаций содержит отрицательно заряженную аминокислоту) предсказан небольшой батохромный сдвиг – от 4 до 16 нм для поглощения и от 0 до 13 нм для испускания. Большой 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).

3.1.3. Заключение к разделу 3.1

В данной части работы при помощи методов молекулярного моделирования были предсказаны 5 новых флавинодержущих флуоресцентных белков на основе iLOV с батохромными сдвигами. Величина сдвигов составила от 4 до 53 нм для поглощения, и до 37 нм для испускания. Таким образом, предсказанные максимумы полос поглощения и испускания для предложенных мутантных форм iLOV существенно больше, чем для других известных флавинодержущих флуоресцентных белков.

Было показано, что для получения батохромного сдвига в iLOV достаточно только 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).

Также следует отметить, 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), поэтому для замен следует использовать только незаряженные полярные аминокислоты.

3.2. Разработка вариантов iLOV-Q489K с батохромных сдвигом с модифицированным хромофором.

Изменения спектральных характеристик флуоресцентного белка можно достигнуть не только заменой аминокислот в хромофор-содержащем кармане, а также и модификацией самого хромофора. Недавно было показано экспериментально, что LOV домены способны образовывать стабильные комплексы с аналогами флавина [69,70].

Данный раздел посвящен разработке новых вариантов флуоресцентного белка iLOV с еще большими батохромными сдвигами путем модификации и хромофора, и его окружения, и содержит результаты поиска этих вариантов [64].

3.2.1. Выбор новых хромофоров

В качестве новых хромофоров были подобраны аналоги флавинмононуклеотида, обладающие смещенными по сравнению с ним в красную область спектра полосами поглощения и испускания – 8-аминофлавинмононуклеотид, 8-метиламинофлавинмононуклеотид и 1-дезафлавинмононуклеотид. В таблице 3.5 представлены спектральные данные для 8-аминорибофлавина, 8-метиламинорибофлавина и 1-дезарибофлавина.

Таблица 3.5. Максимумы поглощения ($\lambda_{a,max}$), максимумы испускания ($\lambda_{F,max}$) и квантовый выход флуоресценции (ϕ_F) для рибофлавина и его аналогов в водном растворе.

Хромофор	Рибофлавин [71]	8-аминорибофлавин [72]	8-метиламинорибофлавин [73]	1-деазарибофлавин [74]
$\lambda_{a,max}$, эВ (нм)	2.79 (445)	2.62 (473)	2.54 (488)	2.31 (537)
$\lambda_{F,max}$, эВ (нм)	2.29 (542)	2.33 (533)	2.21 (560)	1.77 (700)
Стоксов сдвиг, эВ (нм)	0.50 (97)	0.29 (60)	0.34 (72)	0.54 (163)
ϕ_F	0.26	0.19	≈ 0.4	0.0024

Сначала для выбранных хромофоров были рассчитаны энергии поглощения в газовой фазе методом ХМСQDPT2. Результаты приведены в таблице 3.6.

Таблица 3.6. Вертикальные энергии поглощения (в эВ) для новых хромофоров. В скобках указаны соответствующие длины волн в нм.

Модельная система	$S_{0,min} \rightarrow S_1$
8-аминолюмифлавин	2.83 (438)
8-метиламинолюмифлавин	2.82 (440)
1-деазалумифлавин	2.48 (500)

Как видно, рассчитанные максимумы поглощения для всех хромофоров обладают синим сдвигом приблизительно на 40 нм по сравнению с экспериментальными данными, полученными в водном растворе, что наблюдалось и для люмифлавина [67]. Также, подобно люмифлавину, для новых хромофоров наблюдается увеличение электронной плотности в S_1 состоянии для атомов С4А, О4, N5 и уменьшение электронной плотности для атома N1 (а у 1-деазалумифлавина – для С1). Карты разностной электронной плотности для $S_{0,min} \rightarrow S_1$ перехода представлены на рисунке 3.7.

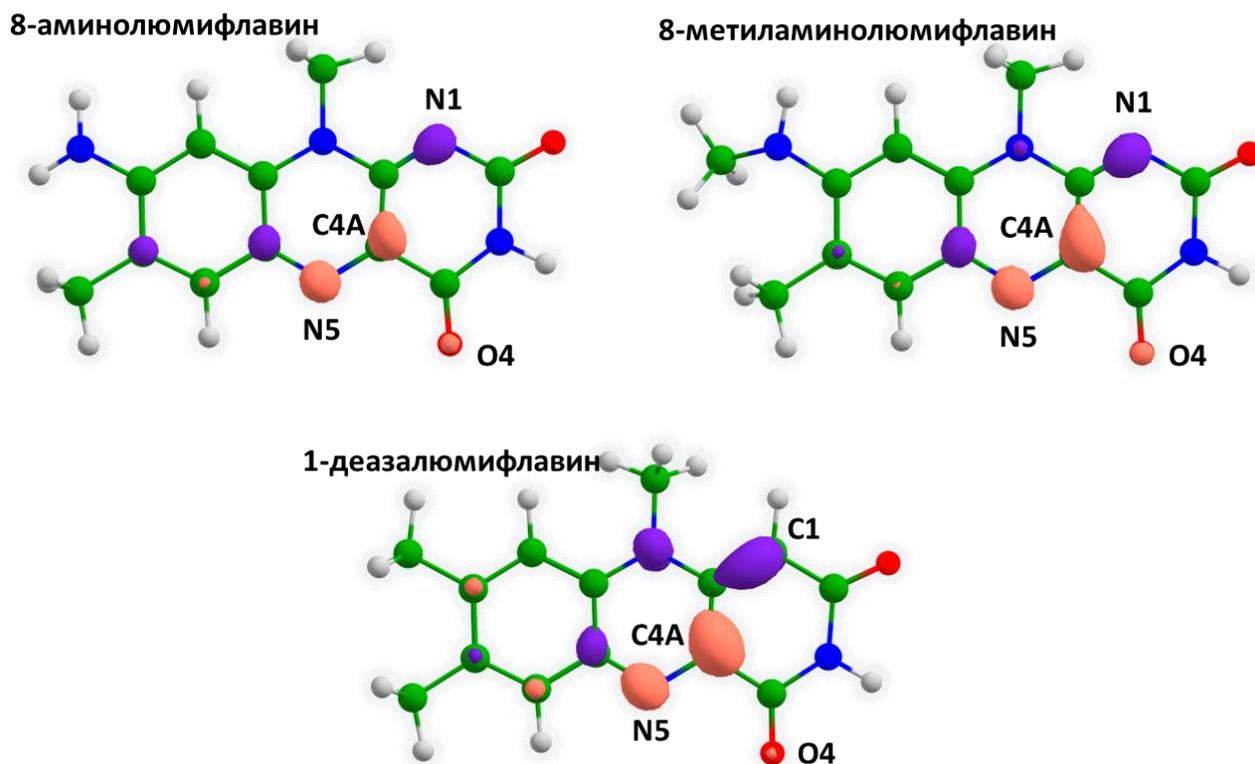


Рисунок 3.7. Карты разностной электронной плотности для $S_{0,\min} \rightarrow S_1$ перехода для хромофоров. Изоповерхности лососевого цвета обозначают увеличение электронной плотности в первом синглетном возбужденном состоянии, а фиолетового – уменьшение.

Чтобы проверить, как будет влиять образование водородных связей с атомами N5, O4, N1 на максимумы поглощения, были рассмотрены молекулярные кластеры, состоящие из молекулы 8-аминолюмифлавина и одной молекулы воды, находящейся в разных позициях (рисунок 3.8). В таблице 3.7 приведены вертикальные энергии поглощения для данных систем.

Из таблицы 3.7 видно, что водородная связь с атомом N1, на котором электронная плотность в возбужденном состоянии уменьшается, вызывает синий сдвиг, а образование водородной связи с атомами O4 и N5 способствует красному сдвигу максимумов поглощения.

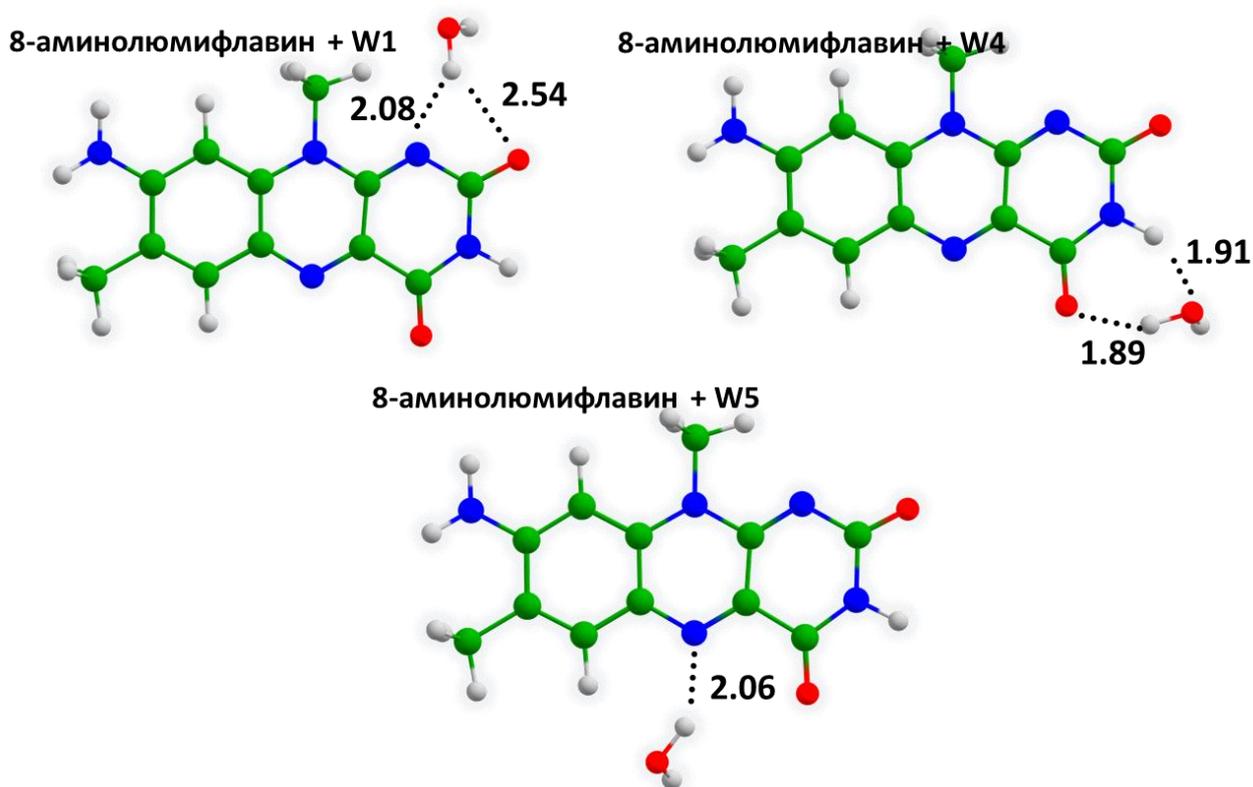


Рисунок 3.8. Молекулярные кластеры, состоящие из 8-аминолюмифлавина и одной молекулы воды.

Таблица 3.7. Вертикальные энергии поглощения (в эВ) для кластеров, состоящих из 8-аминолюмифлавина и одной молекулы воды. В скобках указаны соответствующие длины волн в нм.

Модельная система	$S_{0,\min} \rightarrow S_1$
8-аминолюмифлавин + W1	2.90 (427)
8-аминолюмифлавин + W4	2.74 (452)
8-аминолюмифлавин + W5	2.77 (447)

3.2.2. *iLOV* с аналогами флавина

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. На рисунке 3.9 представлен график изменения расстояний между атомами N5 и O4 флавина и атомом NE2 глутамина Q489 вдоль траекторий.

Также, как и для iLOV, у всех рассматриваемых систем водородная связь Q489 с атомом N5 рвется в самом начале, а с атомом O4 остается стабильной в течение первых 5 нс траекторий. Однако для iLOV-m и iLOV-d водородные связи Q489 с хромофором имеют тенденцию к периодическому восстановлению. Тем не менее для описания данных систем были выбраны конформеры out, так как их заселенность существенно выше.

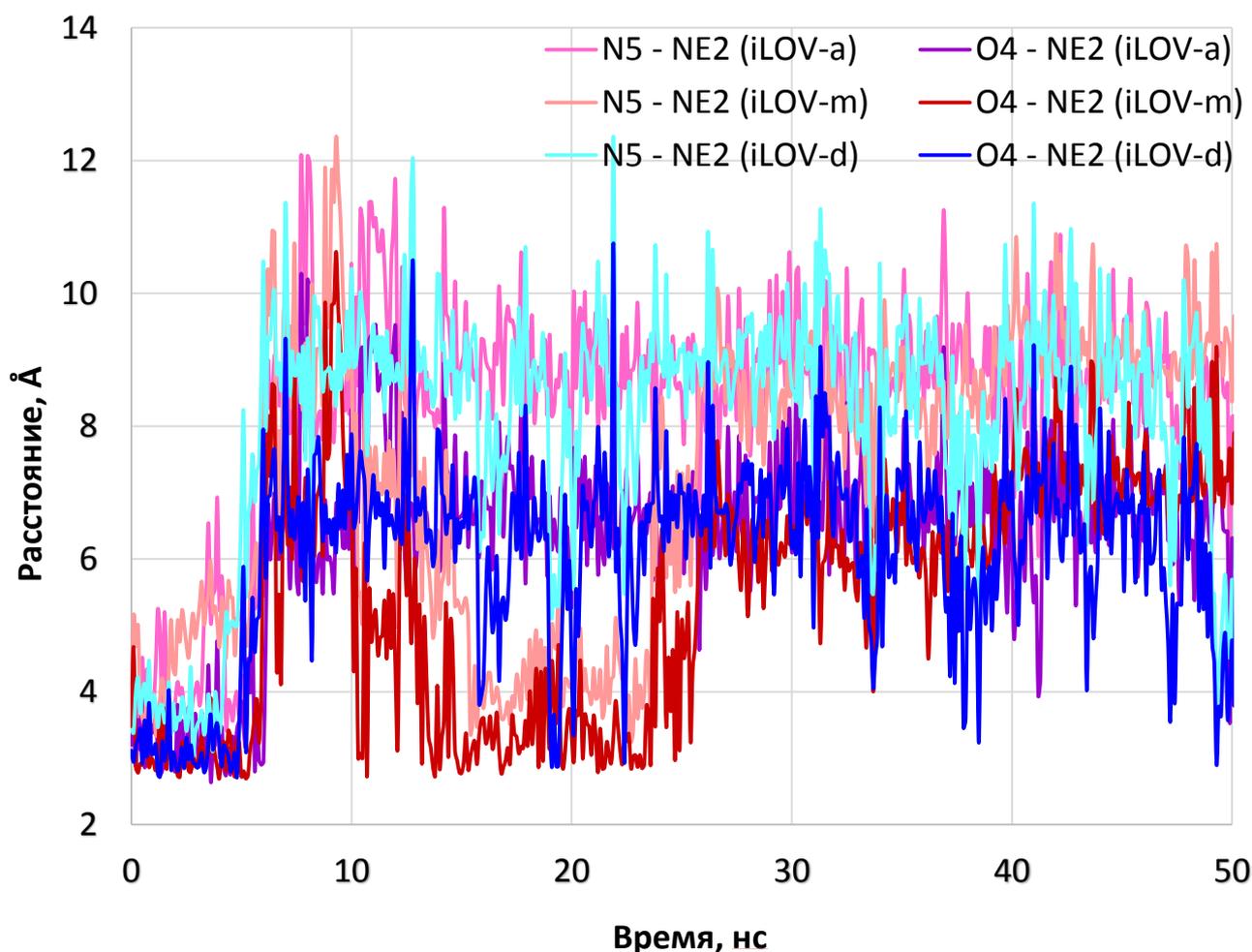


Рисунок 3.9. Изменение расстояний между атомами N5 и O4 хромофора и NE2 атома глутамина в 489 позиции в молекулярно-динамических траекториях.

В белках iLOV-a и iLOV-m появляется дополнительная водородная связь между хромофором и атомом кислорода боковой цепи Thr394 (рисунок 3.10). В ходе траекторий эти водородные связи стабильны. Структура хромофор-содержащего кармана для iLOV-d аналогична iLOV, дополнительных водородных связей не образуется.

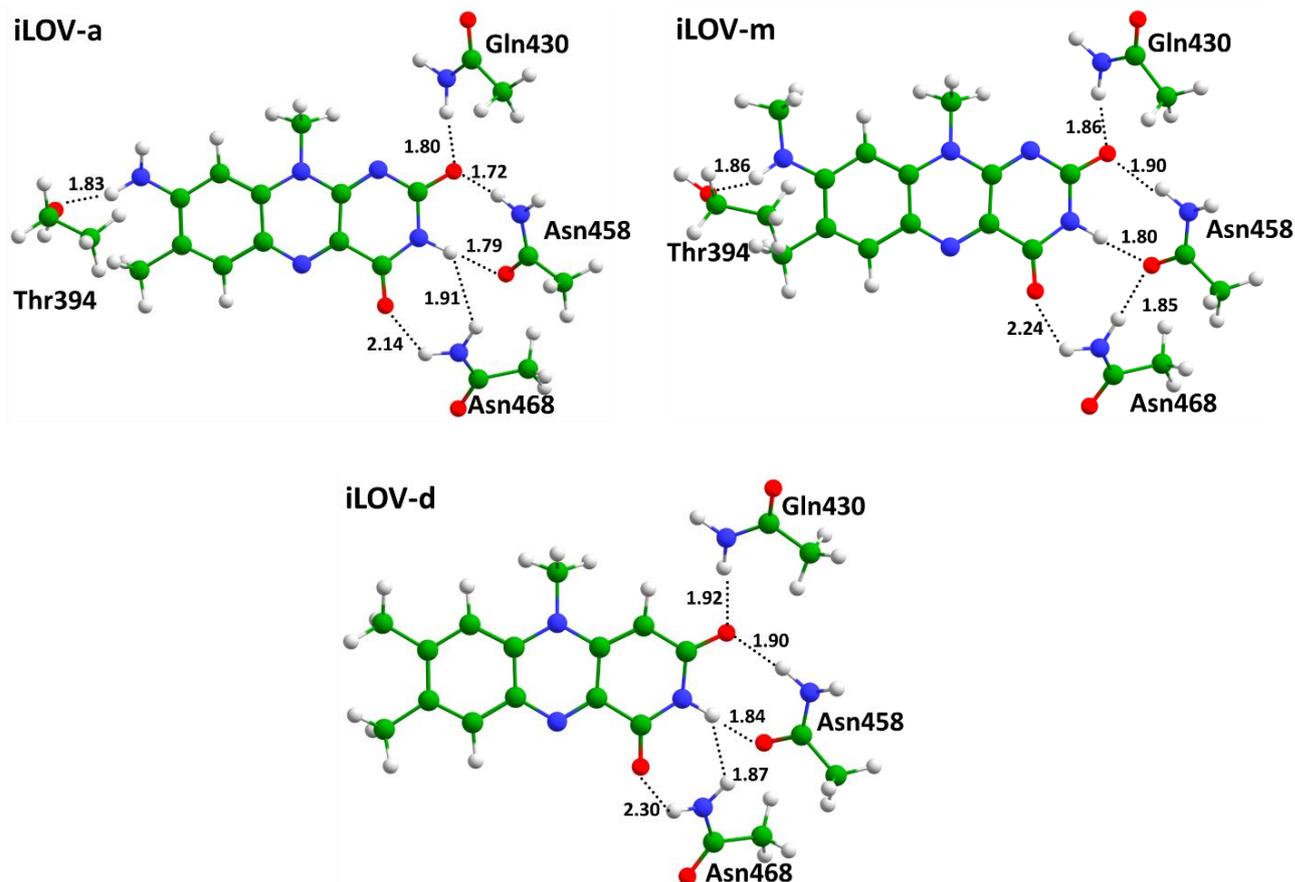


Рисунок 3.10. Квантовые подсистемы iLOV-a, iLOV-m, iLOV-d. На рисунке указаны расстояния, соответствующие равновесным геометриям, полученными методом КМ/ММ.

Для всех систем были рассчитаны вертикальные энергии возбуждения и испускания. Результаты приведены в таблицах 3.8 и 3.9. Наименьшие сдвиги для поглощения и испускания были получены для iLOV-a, а наибольшие – для iLOV-d, что согласуется с известными экспериментальными данными для соответствующих хромофоров (таблица 3.5)

Таблица 3.8. Вертикальные энергии возбуждения и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $i\text{LOV}_{\text{out}}$.

Метод Система	XMCQDPT2		TD-DFT		SOS-CIS(D)	
	$S_{0,\text{min}} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0,\text{min}} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0,\text{min}} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$i\text{LOV}_{\text{out}}$	2.82/439 (0.27)	0	3.70/335	0	3.25/382	0
$i\text{LOV-a}$	2.70/450 (0.40)	-0.12 [+11]	3.57/347	-0.13 [+12]	2.84/436	-0.41 [+54]
$i\text{LOV-m}$	2.59/478 (0.40)	-0.23 [+39]	3.55/350	-0.15 [+15]	2.81/442	-0.44 [+60]
$i\text{LOV-d}$	2.36/526 (0.31)	-0.46 [+82]	3.34/371	-0.36 [+36]	2.95/420	-0.30 [+38]

Таблица 3.9. Вертикальные энергии испускания и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $i\text{LOV}_{\text{out}}$.

Метод Система	XMCQDPT2			TD-DFT		SOS-CIS(D)	
	Стоксов сдвиг, эВ	$S_{1,\text{min}} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1,\text{min}} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1,\text{min}} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$i\text{LOV}_{\text{out}}$	-0.32	2.50/496 (0.21)	0	3.34/372	0	2.65/467	0
$i\text{LOV-a}$	-0.43	2.27/547 (0.26)	-0.23 [+51]	3.31/375	-0.03 [+3]	2.43/511	-0.22 [+44]
$i\text{LOV-m}$	-0.40	2.19/566 (0.40)	-0.31 [+70]	3.25/382	-0.09 [+10]	2.36/526	-0.29 [+59]
$i\text{LOV-d}$	-0.63	1.73/717 (0.17)	-0.77 [+221]	2.46/503	-0.88 [+131]	1.70/727	-0.95 [+260]

3.2.3. Мутантные формы *iLOV-a*, *iLOV-m*, *iLOV-d*

Как показано в 3.2.1, образование водородных связей с атомами N5 и O4 новых хромофоров, так же, как и в случае с оригинальным флавином, будет приводить к батохромному сдвигу в спектрах. Поэтому, чтобы получить варианты флуоресцентных белков на основе *iLOV* с еще большими красными сдвигами, для *iLOV-a*, *iLOV-m* и *iLOV-d* были рассмотрены различные замены.

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 части 3.1.2, однако с учетом сделанных в 3.1.3 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*.

Для каждой системы были получены молекулярно-динамические траектории длительностью в 50 нс. Из 17 исследованных систем были отобраны 7 с минимальными расстояниями между атомами NZ 392 или 489 лизина и N5 и/или O4 аналога флавина. Краткие названия отобранных систем и соответствующие замены приведены в таблице 3.10. Для всех отобранных мутантных форм в молекулярно-динамических траекториях боковая цепь лизина преимущественно заселяет «in» конформер, в котором обязательно стабильна водородная связь хотя бы с атомом O4 хромофора. Для некоторых систем также является стабильной водородная связь с атомом N5 хромофора (рисунок 3.11).

Таблица 3.10. Краткие названия для отобранных вариантов белка iLOV с модифицированным хромофором.

Обозначение	Хромофор	Набор замен
iLOV-aK392	8-аминофлавин	V392K/F410V/A426S/Q489A
iLOV-aK489ss	8-аминофлавин	Q489K/L470S/G487S
iLOV-mK392	8-метиламинофлавин	V392K/F410V/A426S
iLOV-mK489t	8-метиламинофлавин	Q489K/L470T
iLOV-mK489ss	8-метиламинофлавин	Q489K/L470S/G487S
iLOV-dK392	1-дезафлавин	V392K/F410V/A426S
iLOV-dK489tt	1-дезафлавин	Q489K/L470T/L472T

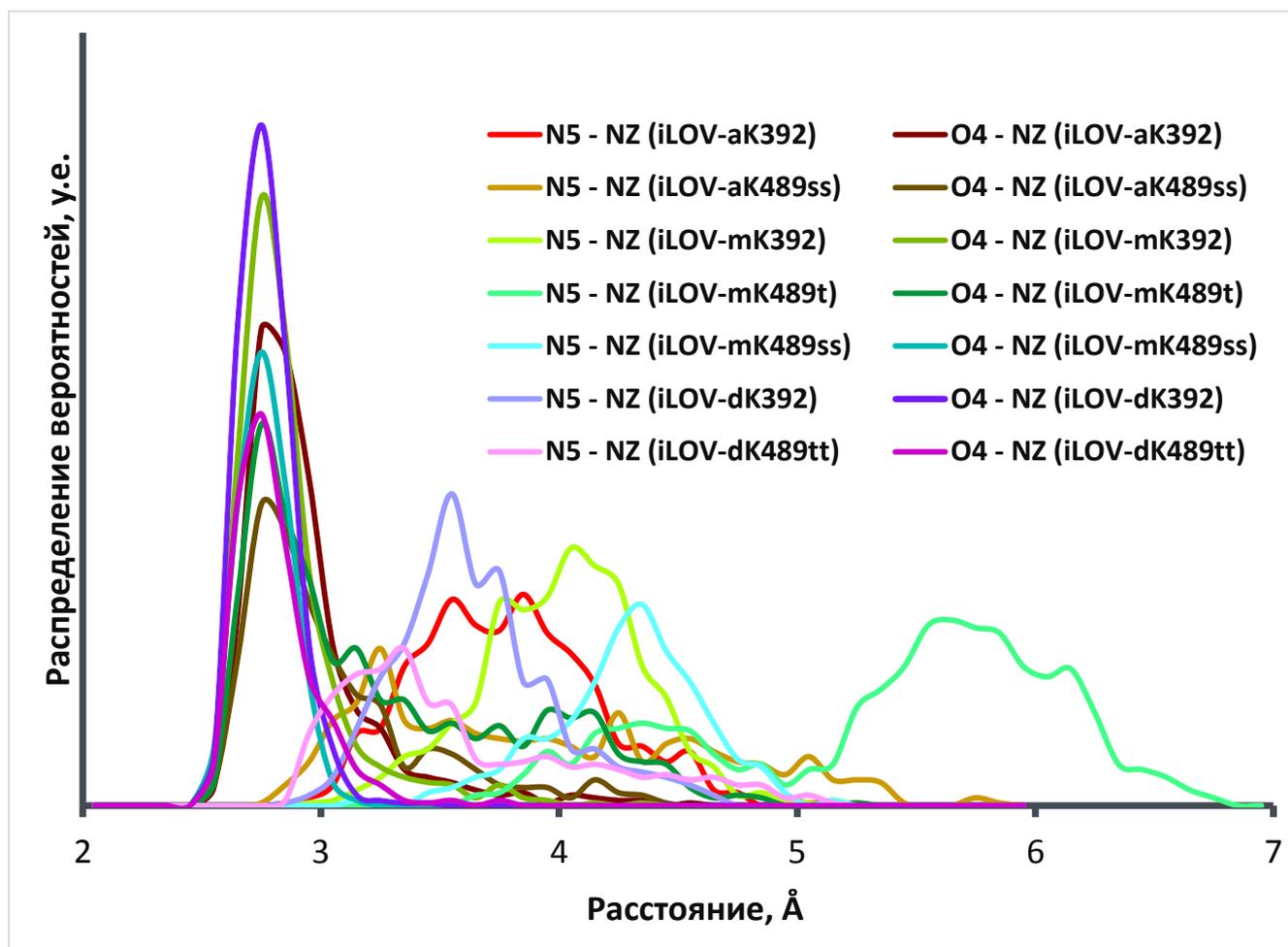


Рисунок 3.11. Вероятностное распределение расстояний в молекулярно-динамических траекториях для новых вариантов белка iLOV с модифицированным хромофором.

Чтобы проверить, будут ли выбранные системы сохранять необходимую конформацию 392 или 489 лизина на большем временном масштабе, для каждой мутантной формы было получено по 10 дополнительных молекулярно-динамических траекторий, каждая длительностью в 100 нс, что в сумме составляет по 1 мкс для каждого белка.

В качестве стартовых наборов координат для новых расчетов использовались кадры с максимальным RMSD из траекторий длительностью по 50 нс, полученных в процессе отбора перспективных мутантных форм. На рисунке 3.12 приведен график вероятностного распределения расстояний в новых траекториях. Для всех отобранных мутантных форм сохраняется водородная связь между аминок группой боковой цепи лизина и атомом O4 хромофора. Для iLOV-dK392 и iLOV-dK489tt также наблюдается стабильная водородная связь с атомом N5. Для iLOV-aK392 и iLOV-aK489ss заселенность состояний с водородной связью с атомом N5 ниже. Для вариантов с 8-метиламинофлавином образование водородной связи с атомом N5 не характерно. Также для iLOV-mK489t и iLOV-mK489ss наблюдается небольшая популяция состояний, в которых боковая цепь лизина не образует водородных связей с хромофором.

Таким образом, на большем временном промежутке отобранные варианты также сохраняют стабильные водородные связи лизина с хромофором.

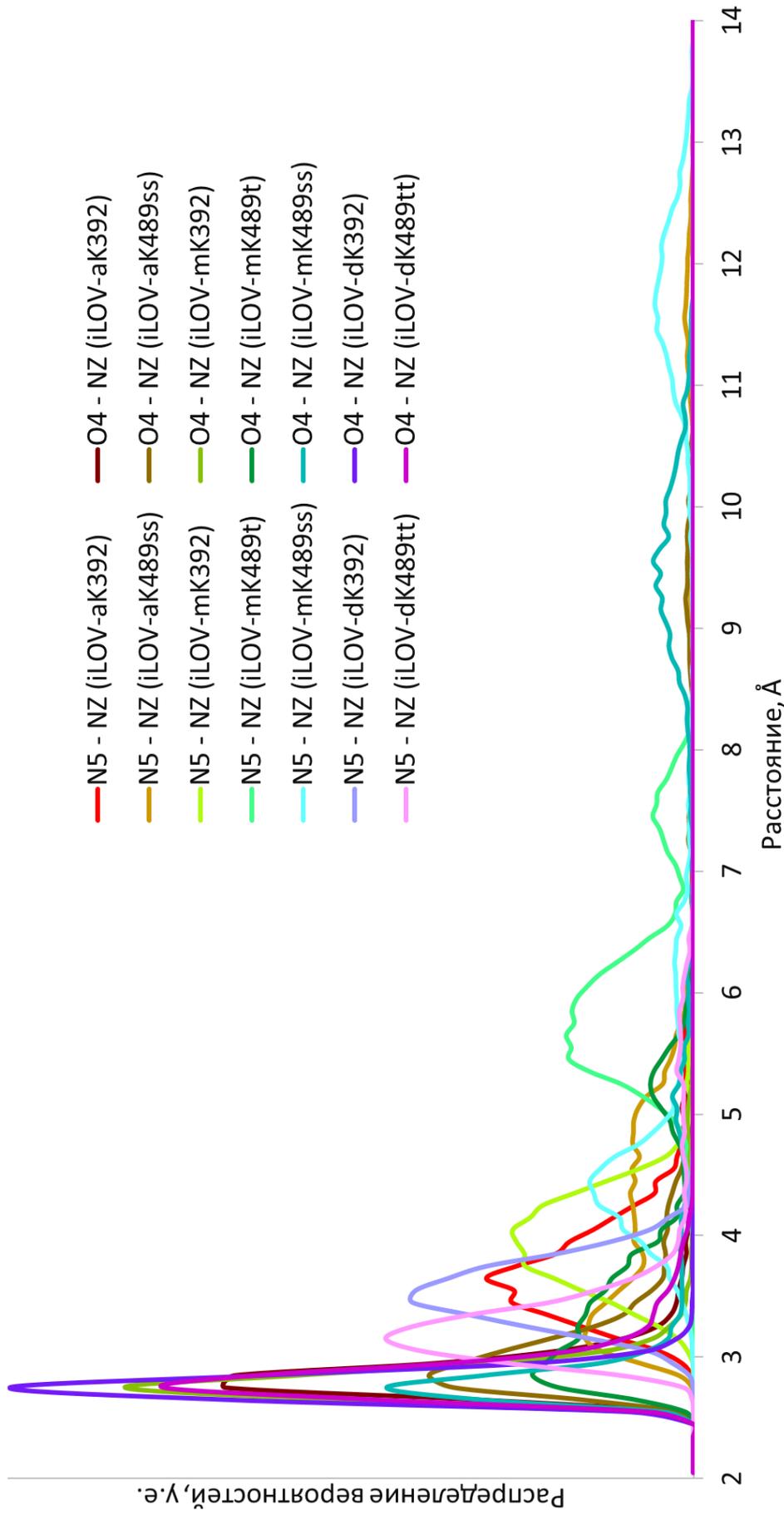


Рисунок 3.12. Вероятностное распределение расстояний в микросекундных траекториях (10 запусков по 100 нс) для новых вариантов белка iLOV с модифицированным хромофором.

Дальше для отобранных систем были получены вертикальные энергии возбуждения и испускания.

Для вариантов iLOV с 8-аминофлавином в качестве хромофора результаты расчетов приведены в таблицах 3.11 и 3.12, а на рисунке 3.13 показаны соответствующие молекулярные кластеры. Полученные сдвиги для данных систем 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-a будет выступать донором энергии, а iLOV-aK392 или iLOV-aK489ss – акцептором.

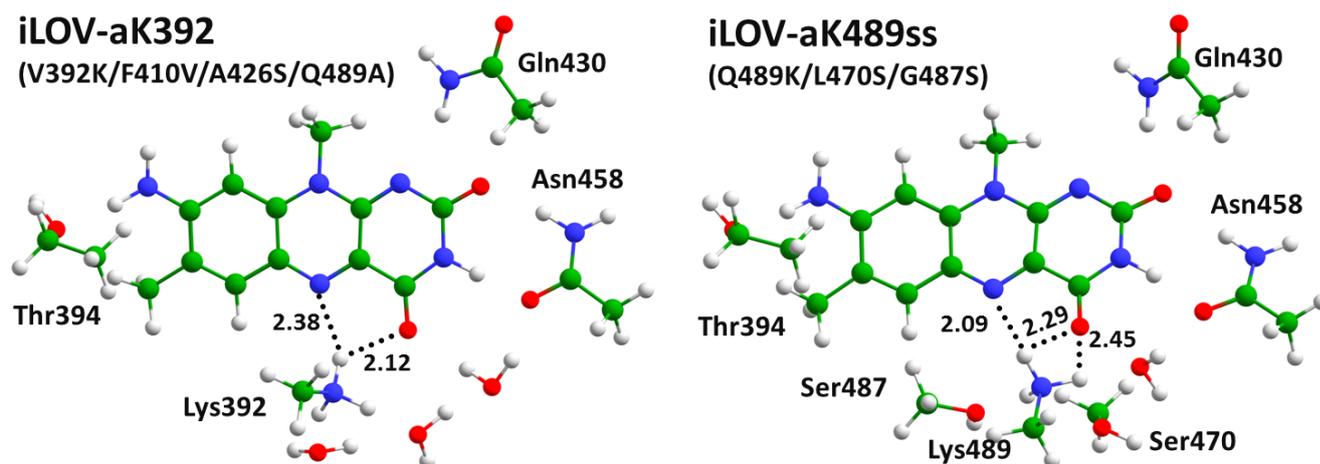


Рисунок 3.13. Квантовые подсистемы вариантов белка iLOV с 8-аминофлавином.

Таблица 3.11. Вертикальные энергии возбуждения и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $iLOV_{out}$.

Метод \ Система	ХМCQDPT2		TD-DFT		SOS-CIS(D)	
	$S_{0.min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0.min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0.min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$iLOV_{out}$	2.82/439 (0.27)	0	3.70/335	0	3.25/382	0
$iLOV$ - aK392	2.42/512 (0.44)	-0.40 [+73]	3.43/361	-0.27 [+26]	2.67/464	-0.58 [+82]
$iLOV$ - aK489ss	2.36/525 (0.48)	-0.46 [+86]	3.42/363	-0.28 [+28]	2.69/461	-0.56 [+79]

Таблица 3.12. Вертикальные энергии испускания и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $iLOV_{out}$.

Метод \ Система	ХМCQDPT2			TD-DFT		SOS-CIS(D)	
	Стоксов сдвиг, эВ	$S_{1.min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1.min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1.min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$iLOV_{out}$	-0.32	2.50/496 (0.21)	0	3.34/372	0	2.65/467	0
$iLOV$ - aK392	-0.25	2.17/570 (0.37)	-0.33 [+74]	3.17/391	-0.17 [+19]	2.29/542	-0.36 [+75]
$iLOV$ - aK489ss	-0.28	2.08/595 (0.35)	-0.42 [+99]	3.15/393	-0.19 [+21]	2.31/538	-0.34 [+71]

Результаты расчетов вертикальных энергий возбуждения и испускания для мутантных форм iLOV с 8-метиламинофлавином представлены в таблицах 3.13 и 3.14, на рисунке 3.14 показаны соответствующие молекулярные кластеры.

Несмотря на то, что в водных растворах 8-метиламинофлавиин обладает большим красным сдвигом относительно флавина, чем 8-аминофлавиин, для iLOV-mK392, iLOV-mK489t и iLOV-mK489ss получены меньшие величины сдвигов, чем для iLOV-aK392 и iLOV-aK489ss. 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.

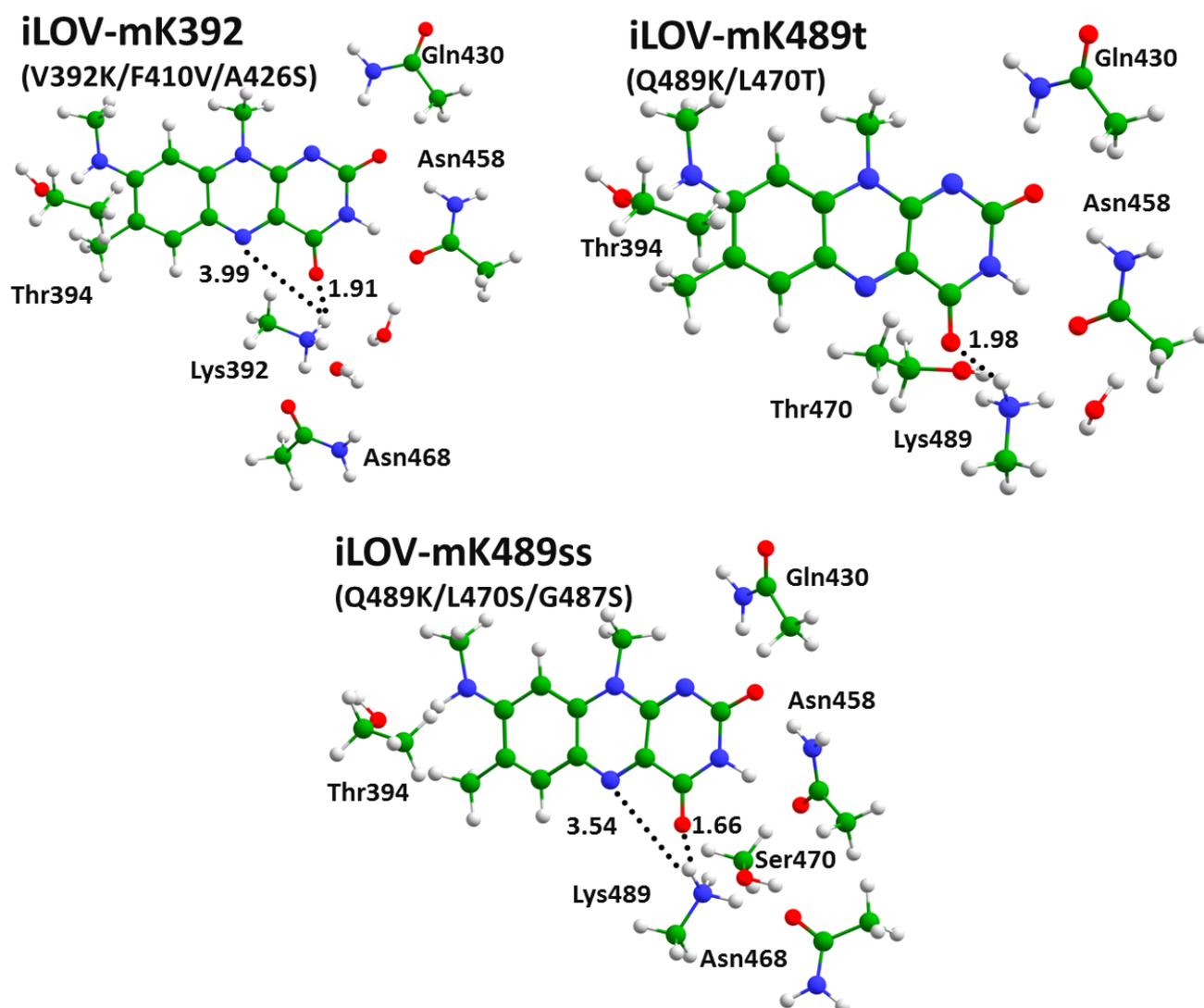


Рисунок 3.14. Квантовые подсистемы вариантов белка iLOV с 8-метиламинофлавином.

Таблица 3.13. Вертикальные энергии возбуждения и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $iLOV_{out}$.

Метод Система	XMCQDPT2		TD-DFT		SOS-CIS(D)	
	$S_{0,min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0,min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0,min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$iLOV_{out}$	2.82/439 (0.27)	0	3.70/335	0	3.25/382	0
$iLOV$ - mK392	2.49/499 (0.44)	-0.33 [+60]	3.46/359	-0.24 [+24]	2.68/462	-0.57 [+80]
$iLOV$ - mK489t	2.49/499 (0.49)	-0.33 [+60]	3.46/359	-0.24 [+24]	2.66/467	-0.59 [+85]
$iLOV$ - mK489ss	2.54/488 (0.44)	-0.28 [+49]	3.44/361	-0.26 [+26]	2.65/468	-0.60 [+86]

Таблица 3.14. Вертикальные энергии испускания и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $iLOV_{out}$.

Метод Система	XMCQDPT2			TD-DFT		SOS-CIS(D)	
	Стоксов сдвиг, эВ	$S_{1,min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1,min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1,min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$iLOV_{out}$	-0.32	2.50/496 (0.21)	0	3.34/372	0	2.65/467	0
$iLOV$ - mK392	-0.25	2.24/553 (0.36)	-0.26 [+57]	3.25/381	-0.09 [+9]	2.37/524	-0.28 [+57]
$iLOV$ - mK489t	-0.19	2.30/539 (0.39)	-0.20 [+43]	3.30/376	-0.04 [+4]	2.40/516	-0.25 [+49]
$iLOV$ - mK489ss	-0.32	2.22/558 (0.31)	-0.28 [+62]	3.25/381	-0.09 [+9]	2.37/524	-0.28 [+57]

Результаты расчетов вертикальных энергий возбуждения и испускания для мутантных форм iLOV с 1-дезафлавином в качестве хромофора представлены в таблицах 3.15 и 3.16, на рисунке 3.15 показаны соответствующие молекулярные кластеры.

Для этих систем получены наибольшие красные сдвиги относительно iLOV, что согласуется с тем, что максимум поглощения для 1-дезафлавина смещен почти на 100 нм в красную область по сравнению с флавином (таблица 3.5). Дополнительные 50-60 нм сдвига вызваны образованием водородных связей аминокислот 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) [75],[26].

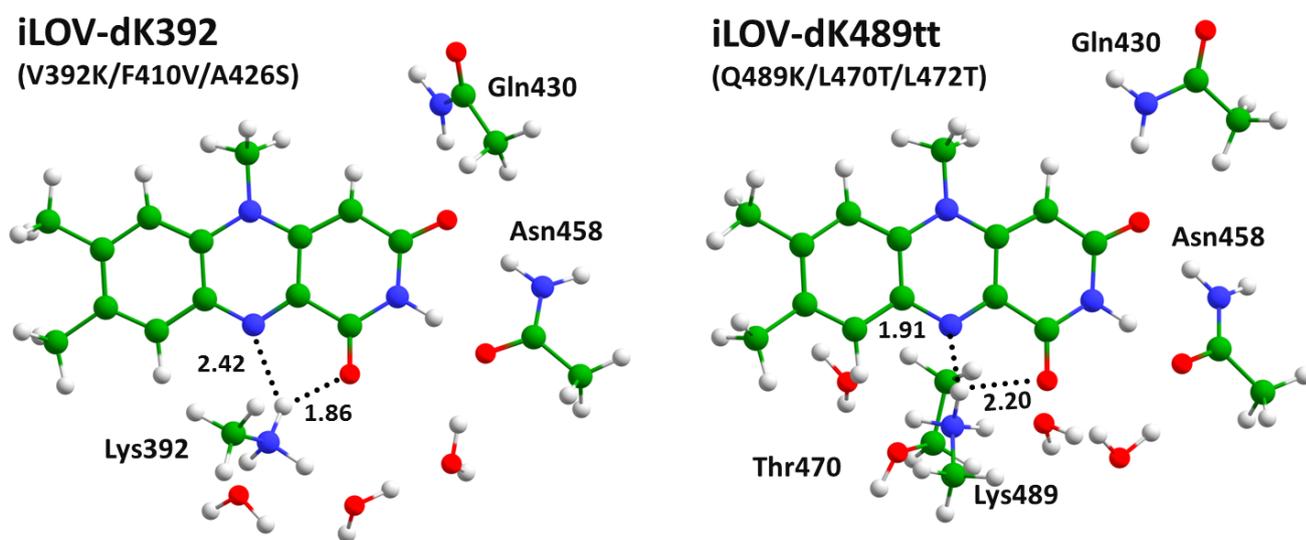


Рисунок 3.15. Квантовые подсистемы вариантов белка iLOV с 1-дезафлавином.

Таблица 3.15. Вертикальные энергии возбуждения и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $iLOV_{out}$.

Метод Система	XMCQDPT2		TD-DFT		SOS-CIS(D)	
	$S_{0,min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0,min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{0,min} \rightarrow S_1$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$iLOV_{out}$	2.82/439 (0.27)	0	3.70/335	0	3.25/382	0
$iLOV$ - dK392	2.09/592 (0.23)	-0.73 [+153]	3.08/402	-0.62 [+67]	2.61/476	-0.64 [+94]
$iLOV$ - dK489tt	2.06/602 (0.24)	-0.76 [+163]	3.05/406	-0.65 [+71]	2.57/483	-0.68 [+101]

Таблица 3.16. Вертикальные энергии испускания и соответствующие длины волн, рассчитанные разными методами. В круглых скобках указаны силы осцилляторов. Сдвиги рассчитаны относительно $iLOV_{out}$.

Метод Система	XMCQDPT2			TD-DFT		SOS-CIS(D)	
	Стоксов сдвиг, эВ	$S_{1,min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1,min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]	$S_{1,min} \rightarrow S_0$, эВ/нм	Сдвиг, эВ [нм]
$iLOV_{out}$	-0.32	2.50/496 (0.21)	0	3.34/372	0	2.65/467	0
$iLOV$ - dK392	-0.62	1.47/843 (0.16)	-1.03 [+347]	2.24/554	-1.10 [+182]	1.42/873	-1.23 [+406]
$iLOV$ - dK489tt	-0.62	1.44/860 (0.15)	-1.06 [+364]	2.18/568	-1.16 [+196]	1.38/897	-1.27 [+430]

3.2.3. Заключение к разделу 3.2

В данной части работы при помощи методов молекулярного моделирования предложены 7 новых флуоресцентных белков на основе iLOV с модифицированными хромофорами. Все предложенные варианты обладают большими красными сдвигами полос поглощения и/или испускания по сравнению с системами, состоящими из мутантных форм iLOV с оригинальным хромофором, разработанными в части 3.1.

Таким образом, была получена еще более широкая палитра флуоресцентных белков на основе LOV доменов.

Предложенные мутантные формы iLOV, iLOV-a и iLOV-m могут быть применены для многоцветной визуализации, для которой необходимо, чтобы полосы поглощения были отдалены друг от друга на 50-60 нм. Более того, белки серии iLOV-a могут быть использованы для создания FRET-сенсоров, а максимумы испускания для белков серии iLOV-d находятся в области, в которой свет легко проникает сквозь животные ткани. Также данные белки могут быть использованы для многоцветной визуализации в ближней ИК области.

Дополнительно стоит заметить, что для одних и тех же систем графики вероятностного распределения расстояний, построенные из траекторий длительностью 50 нс, практически совпадают с графиками, построенными из набора траекторий общей длительностью в 1 мкс. Таким образом, для отбора перспективных мутантных форм белка iLOV достаточно рассмотрения траекторий длиной в 50 нс.

3.3. Определение фотофизических свойств для флуоресцентных белков на основе iLOV с батохромными сдвигами

Белки на основе LOV доменов являются перспективными кандидатами для дизайна FRET-пар [76]. Фёстеровский резонансно-индуктивный перенос энергии может наблюдаться для двух близко расположенных в пространстве хромофоров. На его эффективность влияют индивидуальные фотофизические свойства хромофоров, а также взаимная ориентация дипольных моментов перехода (флуоресценции – для донора, а поглощения – для акцептора) [77]. Более того, для осуществления переноса энергии необходимо перекрытие полосы испускания донора с полосой поглощения акцептора (рисунок 3.16).

В данном разделе представлены результаты расчетов направлений дипольных моментов переходов, а также зарядов на атомах хромофора для исследуемых в разделах 3.1 и 3.2 систем, и их анализ [65].

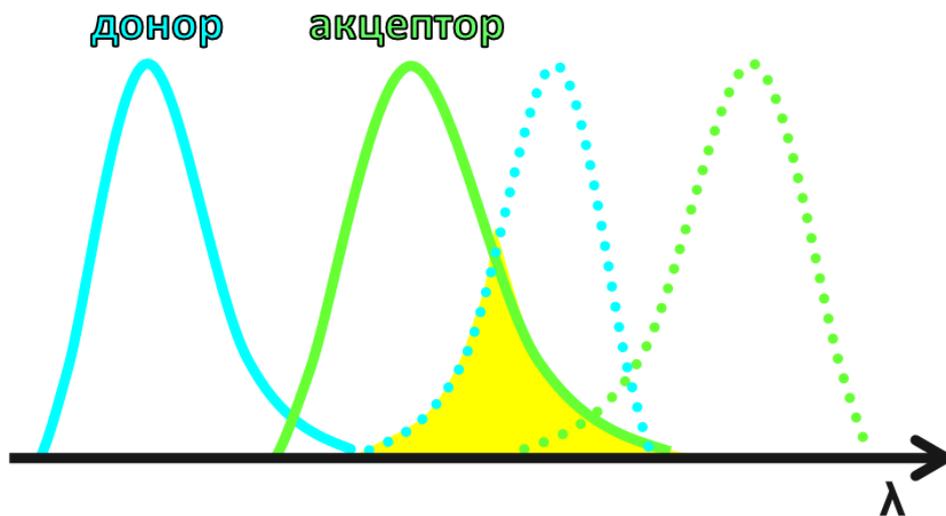


Рисунок 3.16. Схематическое изображение перекрытия полосы испускания донора с полосой поглощения акцептора.

3.3.1. Дипольные моменты перехода

Одной из характеристик, необходимых для рационального дизайна FRET-пар, являются направления дипольных моментов переходов поглощения и испускания.

Всего рассмотрены 16 систем: 4 без точечных мутаций, но с разными хромофорами (iLOV, iLOV-a, iLOV-m, iLOV-d) и 12 с точечными мутациями в белковой макромолекуле и разными хромофорами. Полученные направления дипольных моментов переходов находятся в плоскости изоаллоксазинового кольца хромофора и представлены на рисунке 3.17.

Для систем с флавином, 8-метиламинофлавином (серия iLOV-m) и 1-дезафлавином (серия iLOV-d) в качестве хромофора введение точечных мутаций незначительно изменяет направление дипольных моментов переходов.

Наибольшая вариативность наблюдается для систем с 8-аминофлавином (серия iLOV-a) – для iLOV-aK392 направление дипольного момента поглощения сильно отличается от остальных систем, для которых направления дипольных моментов перехода находятся между условно проведенными линиями N3 – N10 и N3 – C7. Такое отличие может быть связано с окружением хромофора – iLOV-aK392 является единственной системой, содержащей мутацию на неполярную аминокислоту в 489 позиции.

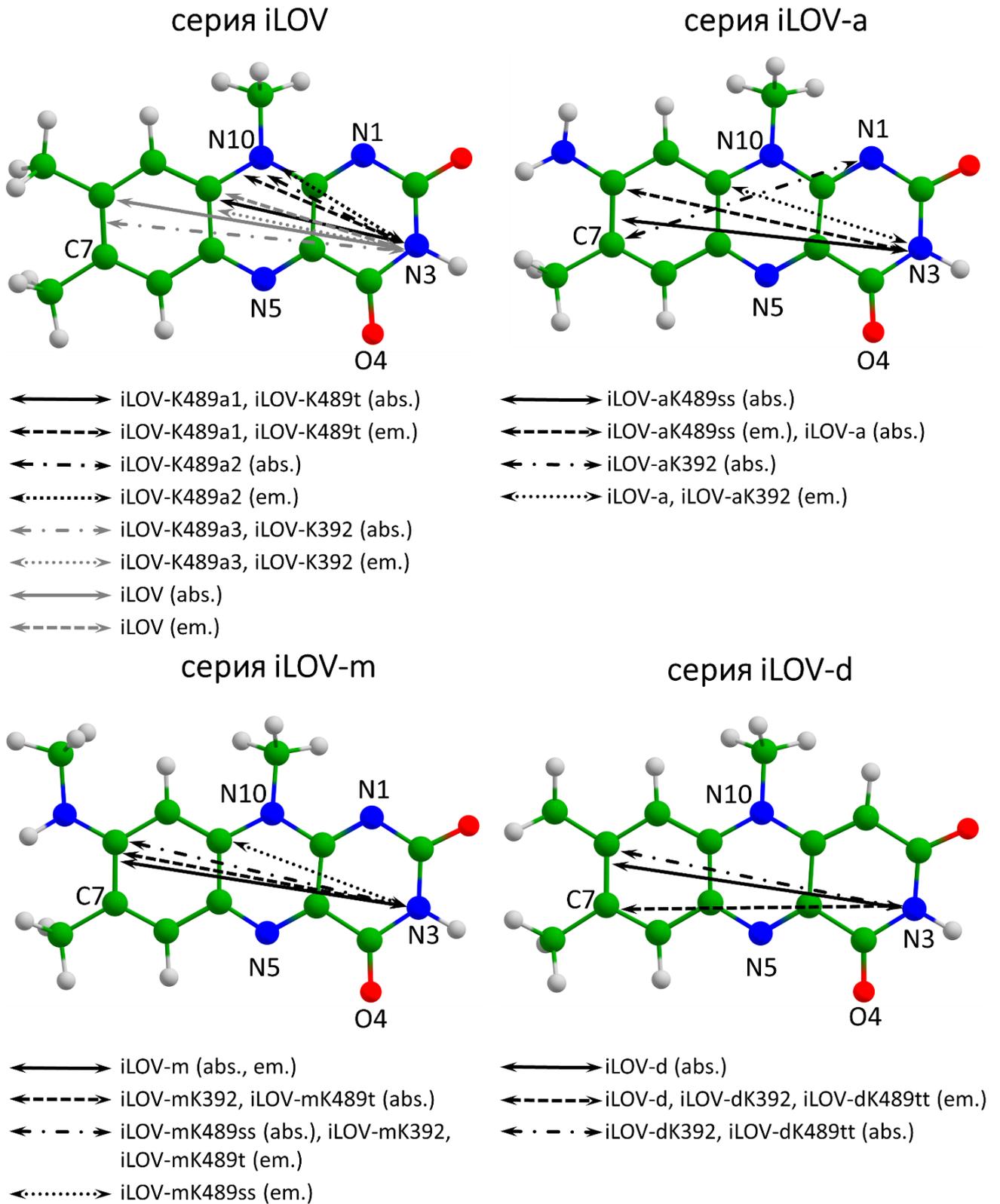


Рисунок 3.17. Дипольные моменты переходов поглощения $S_{0,\min}-S_1$ (abs.) и испускания $S_{1,\min}-S_0$ (em.) рассматриваемых систем.

3.3.2. Заряды на атомах хромофоров

Для рассматриваемых систем были рассчитаны заряды по Малликену и рассмотрена их зависимость от величины сдвига полос поглощения.

Для анализа были выбраны атомы O4, N5 и N1, так как именно в их области происходят самые большие изменения электронной плотности в возбужденном состоянии (рисунок 3.7). Рассчитанные заряды приведены в таблице 3.17.

Таблица 3.17. Рассчитанные вертикальные энергии $S_{0,\min}-S_1$ (E_{abs}) переходов и атомные заряды по Малликену (q) в основном электронном состоянии для рассматриваемых систем.

Система	E_{abs} , эВ	ΔE_{abs} , эВ	$q(O4)$, а.е.	$\Delta q(O4)$, а.е.	$q(N5)$, а.е.	$q(N1)$, а.е.
iLOV _{out}	2,82	0	-0,36	0	-0,24	-0,52
iLOV-K489a3	2,80	-0,02	-0,38	-0,01	-0,36	-0,50
iLOV-K489a2	2,77	-0,05	-0,41	-0,05	-0,32	-0,54
iLOV-K489a1	2,73	-0,09	-0,38	-0,02	-0,33	-0,53
iLOV-K489t	2,64	-0,18	-0,46	-0,09	-0,24	-0,51
iLOV-K392	2,52	-0,3	-0,47	-0,11	-0,31	-0,49
iLOV-a	2,70	0	-0,31	0	-0,26	-0,53
iLOV-aK392	2,42	-0,28	-0,42	-0,11	-0,33	-0,50
iLOV-aK489SS	2,36	-0,34	-0,43	-0,12	-0,35	-0,49
iLOV-d	2,36	0	-0,36	0	-0,15	-
iLOV-dK392	2,09	-0,27	-0,44	-0,09	-0,23	-
iLOV-dK489TT	2,06	-0,3	-0,48	-0,12	-0,27	-
iLOV-m	2,59	0	-0,38	0	-0,24	-0,54
iLOV-mK489SS	2,54	-0,05	-0,43	-0,04	-0,28	-0,53
iLOV-mK392	2,49	-0,1	-0,46	-0,08	-0,28	-0,52
iLOV-mK489T	2,49	-0,1	-0,45	-0,07	-0,26	-0,51

Заряд на атоме N1 в основном электронном состоянии слабо изменяется при введении точечных мутаций, что должно быть связано с тем, что локальное окружение данного атома остается одинаковым в разных системах.

Заряд на атоме N5 меняется сильнее, однако его зависимости от сдвига энергии вертикального перехода поглощения не наблюдается. Но следует отметить, что водородная связь между атомом N5 и положительно заряженной аминокислотой лизина присутствует только для части исследуемых систем.

Для атома O4, который образует водородную связь с аминокислотой лизина во всех мутантных формах, прослеживается зависимость между изменением его заряда ($\Delta q(O4)$) и смещением энергии вертикального $S_{0,\min}-S_1$ перехода (ΔE_{abs}). Полученная зависимость (рисунок 3.18) общая для всех мутантных форм iLOV как с флавином, так и с его аналогами. Из графика видно, что концентрация отрицательного заряда на атоме O4 приводит к уменьшению вертикальной энергии поглощения.

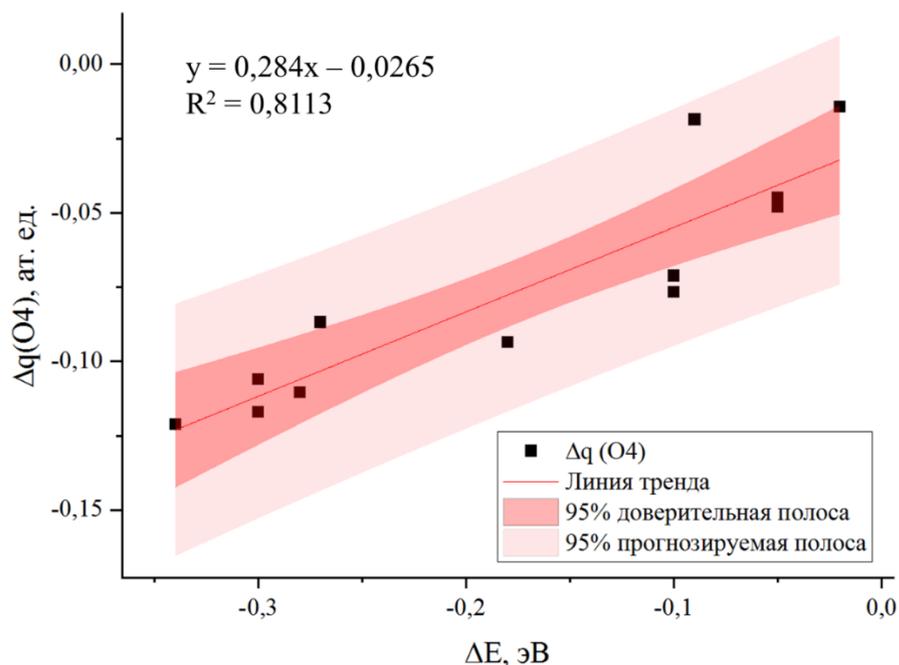


Рисунок 3.18. Зависимость изменения заряда на атоме O4 хромофора в основном электронном состоянии в мутантных формах от величины сдвига энергии вертикального $S_{0,\min}-S_1$ перехода мутантных форм по отношению к флуоресцентным белкам с соответствующими хромофорами без мутаций.

3.3.3. Заключение к разделу 3.3

В данной части для новых вариантов флуоресцентного белка iLOV, предложенных в частях 3.1 и 3.2, были получены направления дипольных моментов переходов, необходимые для дизайна эффективных сенсоров на основе фостеровского резонансно-индуктивного переноса энергии.

На примере системы iLOV-aK392 было предположено, что замена на неполярную аминокислоту в хромофор-содержащей области может значительно изменить направление дипольного момента в флуоресцентных белках, созданных на основе iLOV.

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

3.4. Моделирование структур обратимо переключаемых белков rsLOV1 и rsLOV2

В последнее время активно развивается такая область, как спектроскопия сверхвысокого разрешения, при помощи которой можно преодолеть дифракционный предел [78]. Для такой спектроскопии необходимы обратимо фотопереключаемые флуоресцентные белки. Они характеризуются наличием флуоресцентного и нефлуоресцентного состояний, между которыми можно переключаться при помощи освещения светом определенной длины волны [79].

Хотя большинство таких белков созданы на основе белков семейства GFP, природный фотоцикл LOV доменов делает их также привлекательными для применения в области спектроскопии сверхвысокого разрешения. Первые попытки использовать LOV домены в качестве обратимо фотопереключаемого маркера были предприняты в отношении рецептора *Bacillus subtilis* YtvA [80]. Однако слабая флуоресценция и низкая эффективность переключения из сигнального нефлуоресцентного в флуоресцентное состояние под действием ультрафиолетового света не способствовали практическому применению природного белка. Позже были получены новые варианты обратимо фотопереключаемых белков, названные rsLOV1 и rsLOV2, демонстрирующие повышенную яркость и улучшенную кинетику переключения. Данные белки были синтезированы сайт-направленным мутагенезом на основе YtvA-LOV [34].

Пространственная структура известна только для дикого типа YtvA-LOV (рисунок 3.18), тогда как для новых белков rsLOV1 и rsLOV2 известны только первичные последовательности аминокислотных остатков. 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, для чего были получены молекулярно-динамические траектории для мутантных форм и оригинального белка и проведен их детальный анализ [66].

3.4.1. Молекулярное моделирование структур *rsLOV1* и *rsLOV2*

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. На рисунке 3.19 показаны все полученные варианты положения этих спиралей.

Для дикого типа *YtvA-LOV* $A'\alpha$ спираль на протяжении всех траекторий располагается ниже N-концевой части белка (рисунок 3.19в, д), тогда как для мутантных форм *rsLOV1* и *rsLOV2* в части кадров наблюдается как такое же положение $A'\alpha$ спирали (рисунок 3.19г, е), так и ее контакт с петлей $H\beta-I\beta$ (при этом N-концевая часть белка находится или под спиралью (рисунок 3.19б) или за ней (рисунок 3.19а)).

Последние 2 завитка $J\alpha$ спирали демонстрируют высокую подвижность, причем в части траекторий наблюдается тенденция к их разворачиванию (рисунок 3.19а, д), а в случае с *YtvA-LOV* полностью развернулась половина $J\alpha$ спирали в одной из траекторий (рисунок 3.19д).

Также для *rsLOV2* однократно наблюдалось необычное движение $A'\alpha$ и $J\alpha$ спиралей навстречу друг другу (на рисунке 3.19е показано их максимальное сближение), после которого они вернулись в обычные положения.

Чтобы получить дополнительную информацию о сходстве и различии исследуемых систем, был выполнен динамический сетевой анализ рассчитанных траекторий с использованием программ VMD [58] и Carna [81,82].

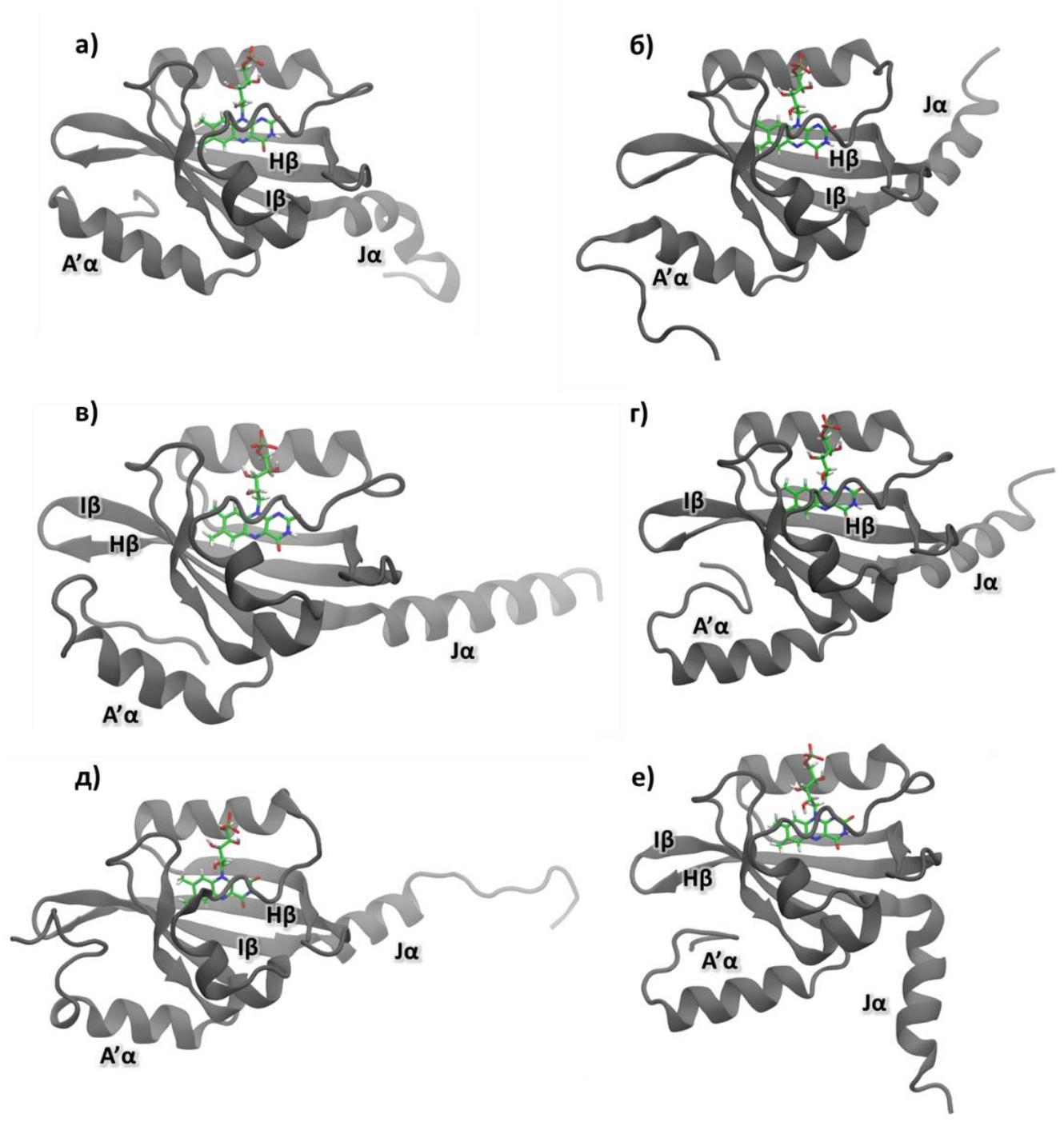


Рисунок 3.19. Характерные конфигурации белков из молекулярно-динамических траекторий для: а) – rsLOV1; б), г), е) – rsLOV1; в), д) – YtvA-LOV.

На рисунке 3.20 представлены полученные дисперсионно-ковариационные матрицы. На них области, которые отвечают скоррелированному движению аминокислотных остатков отмечены красным цветом. Можно наблюдать, что эти области у мутантных форм rsLOV1 и rsLOV2 шире, чем у дикого типа YtvA-LOV.

Более того, для rsLOV1 и rsLOV2 наблюдается четкий раздел, приходящийся на фотоактивный С62. Также существенные отличия заметны для rsLOV2 в области между 30-м и 62-м остатками, что, вероятно, связано с тем, что там находятся дополнительные мутации, отсутствующие у rsLOV1 (I39V, Q44N, N61S).

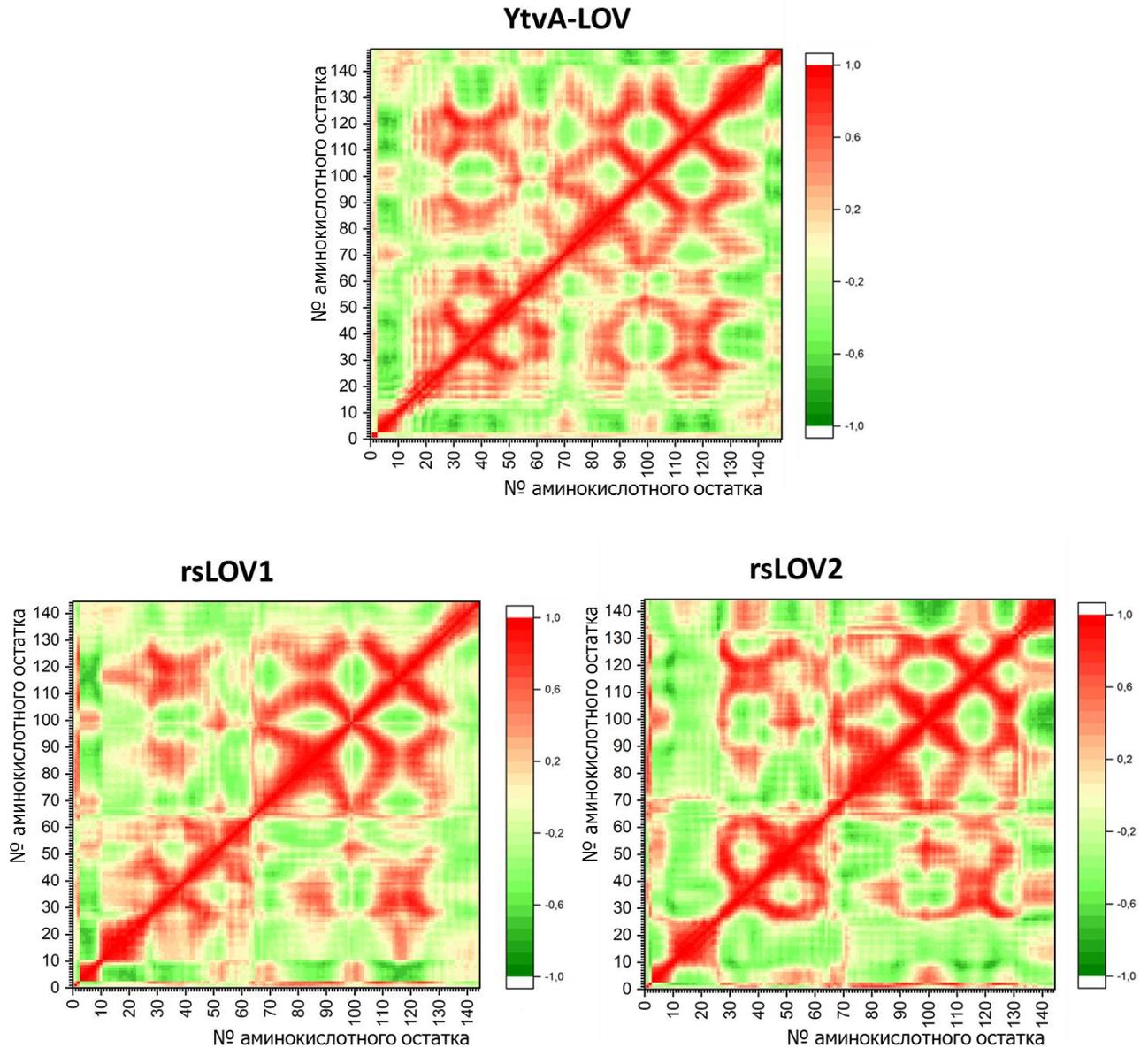


Рисунок 3.20. Дисперсионно-ковариационные матрицы. По осям отложены номера узлов сети. Узлы 0 и 1 отвечают флавину (изоаллоксазиновому кольцу и рибитиловому хвосту соответственно), узлы от 2 до 148 соответствуют аминокислотам 1-146.

Для того, чтобы лучше понять природу различий в поведении данных белков при фотопереключении, также были рассмотрены изменения, происходящие в хромофор-содержащем кармане. Наиболее подвижной боковой цепью в данной области обладает строго консервативный аминокислотный остаток глутамина Q123. Известно, что он играет важную роль в передаче сигнала [14] от LOV домена к белку-эффектору.

Чтобы описать поведение боковой цепи Q123, сначала были рассмотрены такие параметры, как двугранный угол NE2-CD-CG-CB и расстояние между атомом NE2 глутамина и N5 флавина (рисунок 3.21).

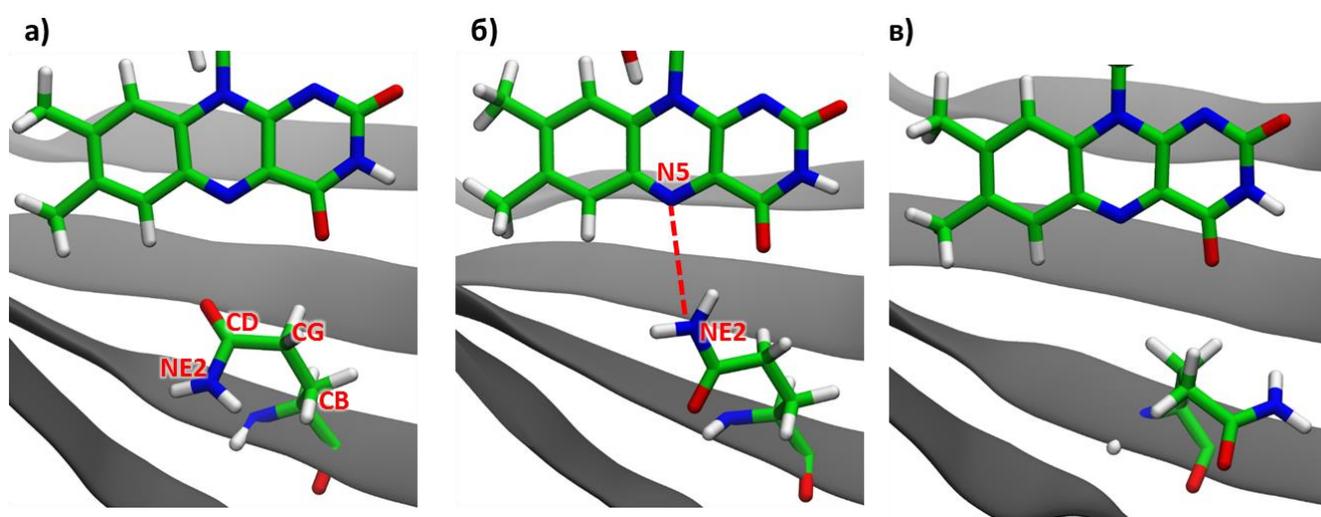


Рисунок 3.21. Конформеры Q123 с разной величиной угла NE2-CD-CG-CB: а) 50°; б) 160°; в) 50°.

Для этих параметров были построены графики зависимости (рисунок 3.22), на которых видно, что для дикого типа YtvA-LOV характерны расстояния от 4 до 5.5 Å и величины угла от 10° до 70°, (типичный конформер показан на рисунке 3.21а). Для белков rsLOV1 и rsLOV2 наблюдается большая заселенность состояний в области около 3-3.5 Å и от 150° до -120° (рисунок 3.21б). Также для rsLOV2 наблюдается слабо заселенное состояние с расстояниями больше 6 Å (рисунок 3.21в), где боковая цепь Q123 направлена в сторону $J\alpha$ спирали.

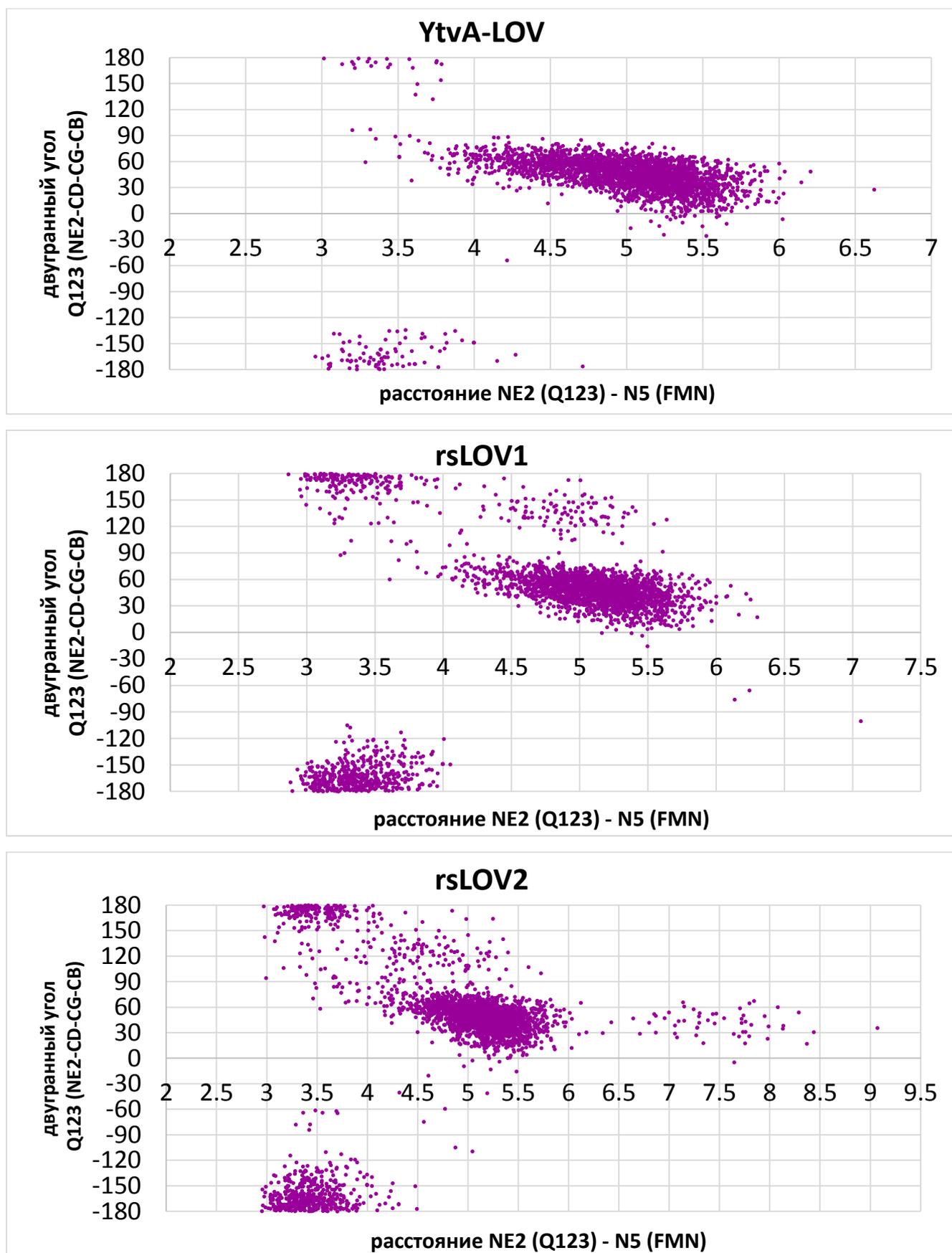


Рисунок 3.22. Графики зависимости расстояния NE2-N5 (Å) от угла NE-CD-CG-CB для Q123.

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 представлены в таблице 3.18. Как видно, для rsLOV1 и rsLOV2 она выше приблизительно в 5-6 раз.

Таблица 3.18. 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

3.4.2. Заключение к разделу 3.4

В данной главе впервые исследованы структуры новых обратимо фотопереключаемых белков rsLOV1 и rsLOV2 и проведено их сравнение со структурой дикого типа YtvA-LOV.

Было показано, что для белков rsLOV1 и rsLOV2 наблюдаются различия с диким типом YtvA-LOV в динамическом поведении как в масштабе всей молекулы белка, так и в отношении к отдельным аминокислотным остаткам.

У мутантных форм rsLOV1 и rsLOV2 наблюдается большее разнообразие возможных положений спиралей A'α и Jα, чем у дикого типа YtvA-LOV. Так как Jα спираль активно участвует в передаче сигнала от LOV домена к белку-эффектору, то можно предположить, что ее увеличенная подвижность будет положительно влиять на эффективность переключения между состояниями.

Также были выявлены отличия в поведении Q123, находящегося в хромофор-связывающем кармане, поворот которого является первым шагом в процессе передачи сигнала. В белках rsLOV1 и rsLOV2, боковая цепь Q123 обладает большей подвижностью и гибкостью, чем в YtvA-LOV.

3.5. Обсуждение применимости полученных результатов

Ценность проделанной работы и полученных результатов дополнительно раскрывается, если рассмотреть несколько работ, которые появились после публикации описанных в данной главе результатов.

В первой работе [83] была поставлена задача выделить такие мутации, которые будут вызывать одинаковые изменения в спектрах разных флавинодержащих флуоресцентных белков. Для этого были рассмотрены две системы – белки iLOV и CagFbFP. CagFbFP получен из термостабильной фототропной бактерии *Chloroflexus aggregans*, обладает сходным с iLOV размером, однако является димерным, что нежелательно для тех применений, где проблемой могут стать стерические ограничения.

Сначала было показано, что мутация находящегося в хромофор-содержащем кармане сигнального глутамина на лизин в CagFbFP-Q148K так же, как и в iLOV-Q489K вызывает слабый синий сдвиг (6 и 9 нм для максимумов флуоресценции соответственно). Затем авторы попытались найти варианты с красным сдвигом для iLOV-Q489K. Для этого был проведен сайт-насыщенный мутагенез в позиции 487 и 392, которые рассматривались в данной работе.

Замена находящегося в 487 положении глицина не привела к значимому красному сдвигу относительно iLOV ни в одном случае, однако для варианта G487S был получен небольшой красный сдвиг относительно iLOV-Q489K. Такая мутация есть в предложенной в данной работе мутантной форме iLOV-K489a1, где помимо замен Q489K и G487S есть дополнительная мутация L470D, предназначенная для лучшей фиксации боковой цепи лизина.

Сайт-насыщенный мутагенез в 392 позицию привел к более заметным изменениям. Максимальный сдвиг относительно iLOV составил 6 нм в направлении длинных волн для максимумов испускания у варианта iLOV-V392T/Q489K. Несколько меньшие красные сдвиги вызвали замены на аланин и цистеин.

Затем с аналогичными заменами был получен вариант CagFbFP-I52T/Q148K, который также продемонстрировал небольшой красный сдвиг в 7 нм. Чтобы понять, почему в множестве экспериментов не были найдены такие или похожие варианты флавинодержащих флуоресцентных белков с красным сдвигом, авторы оценили вероятность получить мутантную форму iLOV-V392T/Q489K с использованием методов случайного мутагенеза. Она получилась равной приблизительно 0.0014.

Во второй работе [84] были синтезированы предложенные нами мутантные формы iLOV с оригинальным хромофором с наибольшими предсказанными сдвигами – iLOV-K489t и iLOV-K392.

Однако в ходе работы авторы столкнулись с рядом проблем. После экспрессии этих белков в *E.coli* в оптическом микроскопе флуоресценция не была обнаружена. Для выяснения причин отсутствия флуоресценции были проведены дальнейшие исследования. После очистки полученных протеинов методом электрофореза в полиакриламидном геле и дальнейшей масс-спектрометрии было выяснено, что мутантные формы iLOV сопровождалась шаперонами, белками, помогающими сворачиванию других белков. Это позволило предположить, что в процессе сворачивания этих вариантов возникли сложности.

Затем для очищенных белков повторно изучили спектры поглощения и флуоресценции. Для iLOV-K392 было найдено, что мутация V392K препятствует или процессу фолдинга, или связыванию флавина с белком. Мутантная форма iLOV-K489t была получена в очень низкой концентрации. Для нее наблюдался слабый синий сдвиг около 2 нм для спектров поглощения и испускания, а также слегка увеличенный квантовый выход по сравнению с iLOV (0.47 и 0.39 соответственно).

В третьей статье [85] авторы так же использовали подход, заключающийся в вызове красного сдвига через модификацию окружения хромофора, только применимо к атому N1 флавинонуклеотида. На этом атоме происходит уменьшение электронной плотности в возбужденном состоянии, поэтому было решено поместить рядом с ним аминокислоту, обладающую отрицательным

зарядом. Для этого была выбрана замена 430 глутамина, образующего водородную связь с флавином, на глутаминовую кислоту. Сначала было сделано теоретическое предсказание, что такая замена будет вызывать только небольшой красный сдвиг максимума поглощения, равный 4 нм, так как боковая цепь E430 также, как и боковая цепь K489 в iLOV-Q489K, находится в out-конформации. Затем было экспериментально показано, что iLOV-Q430E обладает небольшими красными сдвигами в 2 нм для поглощения и 8 нм для испускания.

Публикация этих работ дополнительно подтверждает актуальность данной тематики и практическую ценность поставленной цели. Задача по созданию флуоресцентных белков с батохромным сдвигом на основе LOV доменов действительно является непростой, и одних только экспериментальных методов для ее успешного решения недостаточно. Результаты, описанные в упомянутых выше работах [83], [84], [85], еще раз показывают, что без помощи со стороны методов молекулярного моделирования и рационального подхода к дизайну белковых молекул с заданными свойствами сложно добиться необходимых изменений.

Результаты, полученные в статье [84], не умаляют достоинств этой работы. К сожалению, с помощью методов молекулярного моделирования нельзя предугадать такие проблемы, как неправильное сворачивание белков и низкая их экспрессия. Для iLOV-K489t хоть и не было получено красного сдвига относительно iLOV, однако он наблюдается относительно iLOV-Q489K, что означает, что компенсирующая мутация L470T вызывает изменения в необходимом направлении, однако только ее оказалось недостаточно.

Заключение

Итоги выполненного исследования. В данном исследовании решены все поставленные задачи с использованием методов молекулярного моделирования. На основе флавинсодержащего флуоресцентного белка iLOV предложены новые варианты, содержащие рационально отобранные замены аминокислотных остатков и / или химически модифицированные варианты хромофора флавинмононуклеотида, которые приводят к батохромным сдвигам полос поглощения и испускания, расширяя таким образом палитру цветов. Эти белки могут быть использованы для многоцветной визуализации в клетках и тканях и в составе сенсоров на основе резонансно-индуктивного переноса энергии (FRET). Для обратимо фотопереключаемых флуоресцентных белков rsLOV1 и rsLOV2, полученных из YtvA-LOV введением аминокислотных замен, установлено, что повышение эффективности фотопереключения по сравнению с исходным белком связано с увеличением подвижности J α спирали, которая претерпевает изменения при образовании светлого состояния и участвует в передаче сигнала от LOV доменов к белкам-эффекторам, и изменением конформационной заселенности боковой цепи глутамина Q123, находящегося в хромофор содержащем кармане.

Рекомендации. На основе полученных результатов можно предложить следующие рекомендации для поиска вариантов iLOV с батохромными сдвигами. Основной заменой, приводящей к батохромным сдвигам спектральных полос, является аминокислотная замена на лизин в положении 392 или 489. В результате аминокислотная группа боковой цепи лизина находится достаточно близко к атомам N5 и O4 флавина и участвует в стабилизации возбужденного состояния хромофора. При введении основной аминокислотной замены на лизин, также необходимы компенсирующие замены, необходимые для фиксации конформации боковой цепи лизина с образованием водородных связей с флавином. Для компенсирующих мутаций перспективны следующие положения: 410, 426, 470, 472 и 487. Боковые цепи аминокислотных остатков в этих положениях находятся ближе всего к нижней части изоаллоксазинового кольца флавина, содержащего атомы N5 и O4

флавина. Введение аминокислотных замен по положениям 428, 442 и 454 не привело к требуемому результату. Ни одна из рассмотренных систем, содержащих хотя бы одну из этих замен, не демонстрировала стабильных водородных связей между лизином K489 или K392 и хромофором в молекулярно-динамических траекториях. Вероятно, боковые цепи аминокислотных остатков в этих положениях, находятся слишком далеко от флавина, чтобы оказывать значимое влияние. Также, в качестве компенсирующих замен не следует использовать аминокислотные остатки с отрицательно заряженными боковыми цепями, глутамат и аспарат, поскольку появление отрицательного заряда нивелирует влияние протонированной аминогруппы лизина.

Таким образом, для образования водородных связей с положительно заряженной аминогруппой лизина подходят только полярные незаряженные аминокислотные остатки, к которым относятся серин, треонин, глутамин и аспарагин. Следует заметить, что глутамин и аспарагин в молекулярно-динамических траекториях стабильно удерживают боковую цепь введенного лизина только в сочетании с заменой на отрицательно заряженную аминокислоту. В качестве полярных незаряженных аминокислотных остатков в составе компенсирующих замен не должны участвовать серосодержащие цистеин и метионин, чтобы исключить возможность образования ковалентной связи между атомом серы и флавином. Замены на неполярные или ароматические аминокислоты могут быть полезны для установки стерических ограничений, если в этом возникнет необходимость.

Подводя итог, при подборе компенсирующих замен, в первую очередь следует рассмотреть замены на серин или треонин в положении 410, 426, 470, 472 и на серин в положении 487 (в этом положении в исходной последовательности находится остаток глицина, не содержащий боковую цепью, поэтому при аминокислотной замене в эту область может поместиться только небольшая боковая цепь). Затем можно добавить к рассмотрению замены на глутамин или аспарагин в эти же позиции.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Полученные в данной работе результаты и приведённые рекомендации позволяют более эффективно подходить к дизайну флуоресцентных белков на основе iLOV с батохромными сдвигами спектральных полос поглощения и флуоресценции. Причем эти результаты можно применить и для флавиносодержащих флуоресцентных белков, созданных на основе других LOV доменов. Более того, комбинация результатов, полученных в данной главе, а также в работах [83], [84], [85], открывает еще большие возможности для создания флуоресцентных белков на основе LOV доменов со значительным батохромным сдвигом спектральных полос.

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 флавиномононуклеотида 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 скорости фотопереключения.

Список сокращений и условных обозначений

LOV – light, oxygen, voltage sensing domain, чувствительный к свету, кислороду, напряжению домен

PAS – семейство PER-ARNT-SIM сенсорных белков

phot1 – фототропин 1

phot2 – фототропин 2

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

STAS – Sulfate Transporter and AntiSigma factor antagonist, транспортер сульфатов и антагонист анти-сигма фактора

sLOV – short-LOV, «короткий» LOV домен, не связанный с белком-эффектором

FMN, флавин – флавинмононуклеотид

FAD – флавинадениндинуклеотид

YtvA-LOV – LOV домен рецептора YtvA бактерии *Bacillus subtilis*

VVD – Vivid, LOV домен гриба *Neurospora crassa*

YF1 – гибридный белок, состоящий из рецепторов YtvA (1–127) и FixL (258–505)

BAT-LOV* – bacterio-opsin activator LOV*, LOV домен, не содержащий фотоактивного цистеина, связанный с активатором бактерио-опсина галоархеи *Halorubrum hochstenium*

AsLOV2 – LOV2 домен фототропина 1 растения *Avena sativa*

LOV2-Rac1 – оптогенетическая конструкция, состоящая из AsLOV2 домена и малой ГТФазы Rac1

ГТФазы – семейство ферментов гидролаз, связывающих и гидролизующих гуанозинтрифосфат

Rac1 – Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, сигнальный G-белок

RESOLFT – reversible saturable/switchable optical linear fluorescence transitions, микроскопия обратимого насыщенного оптического линейного флуоресцентного перехода

STED – stimulated emission depletion, метод подавления спонтанного испускания

rsLOV1 – reversibly switchable LOV1, обратимо фотоперключаемый флуоресцентный белок, созданный на основе YtvA-LOV домена для использования в RESOLFT спектроскопии

rsLOV2 – reversibly switchable LOV2, обратимо фотоперключаемый флуоресцентный белок, созданный на основе YtvA-LOV домена для использования в STED спектроскопии

FbFPs – Flavin binding Fluorescent Proteins, флавиносодержащие флуоресцентные белки

BsFbFp – флавиносодержащий флуоресцентный белок, полученный из LOV домена бактерии *Bacillus subtilis*

PpFbFp – флавиносодержащий флуоресцентный белок, полученный из LOV домена бактерии *Pseudomonas putida*

EcFBFp – флавиносодержащий флуоресцентный белок, полученный из LOV домена бактерии *Bacillus subtilis* и кодон-оптимизированный для экспрессии в *E.coli*

iLOV – improved LOV, «улучшенный» LOV, – флавиносодержащий флуоресцентный белок, полученный из LOV2 домена *phot2 Arabidopsis thaliana*

phiLOV2.1 – photostable iLOV, фотостабильный вариант iLOV

CreiLOV – флавиносодержащий флуоресцентный белок, полученный из LOV домена водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*

VafLOV – флавиносодержащий флуоресцентный белок, полученный из LOV домена водоросли *Vaucheria frigida*

MrFbFP – флавиносодержащий флуоресцентный белок, полученный из LOV домена термофильной бактерии *Meiothermus ruber*

YNP3FbFP – флавиносодержащий флуоресцентный белок, полученный из LOV домена термофильной бактерии, обитающей в горячих источниках национального парка Йеллоустоун

СagFbFP – флавиносодержащий флуоресцентный белок, полученный из LOV домена фототропной бактерии *Chloroflexus aggregans*

FRET – Фёстеровский резонансно-индуктивный перенос энергии

FluVO – сенсор молекулярного кислорода, основанный на явлении Фестеровского резонансно-индуктивного переноса энергии, состоящий из флавиносодержащего флуоресцентного белка *EcFbFP* и желтого флуоресцентного белка YFP

YFP – желтый флуоресцентный белок

PDB – Protein Data Bank, база данных трехмерных структур белков и других биологических макромолекул

PDB ID – идентификационный номер структуры макромолекулы в банке данных PDB

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

KM/MM - комбинированный метод квантовой механики и молекулярной механики

DFT – Density Functional Theory, теория функционала электронной плотности

XMCQDPT2 – Extended Multi-Configuration Quasi-Degenerate Perturbation Theory, метод многоконфигурационной квазивыврожденной теории возмущений второго порядка

CIS – Configuration Interaction Singles, метод конфигурационного взаимодействия с однократными возбуждениями

CASSCF – Complete Active Space Self-Consistent Field, многоконфигурационный метод самосогласованного поля в полном активном пространстве

SOS-CIS(D) – метод конфигурационного взаимодействия с однократными и выборочными двукратными возбуждениями с поправкой по теории возмущений

TD-DFT – Time Dependent Density Functional Theory, метод нестационарной теории функционала электронной плотности

Для обозначения аминокислот в составе белков в работе использованы сокращения:

Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Glu	E
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C

Для рассматриваемых в работе систем введены следующие краткие обозначения:

iLOV-Q489_{in} – конформер iLOV, в котором боковая цепь Q489 образует водородные связи с хромофором

iLOV-Q489_{out} – конформер iLOV, в котором боковая цепь Q489 направлена от хромофора

iLOV-K489 – конформер iLOV-Q489K, в котором боковая цепь K489 направлена от хромофора

iLOV-a – iLOV с 8-аминофлавинмононуклеотидом в качестве хромофора

iLOV-m – iLOV с 8-метиламинофлавинмононуклеотидом в качестве хромофора

iLOV-d – iLOV с 1-дезафлавинмононуклеотидом в качестве хромофора

Для мутантных форм введены следующие краткие обозначения:

Обозначение	Хромофор	Набор замен
iLOV-K489t	флавин	Q489K/L470T
iLOV-K489a1	флавин	Q489K/L470D/G487S
iLOV-K489a2	флавин	Q489K/L470E/L472N
iLOV-K489a3	флавин	Q489K/L470N/L472D
iLOV-K392	флавин	V392K/F410V/A426S
iLOV-aK392	8-аминофлавин	V392K/F410V/A426S/Q489A
iLOV-aK489ss	8-аминофлавин	Q489K/L470S/G487S
iLOV-mK392	8-метиламинофлавин	V392K/F410V/A426S
iLOV-mK489t	8-метиламинофлавин	Q489K/L470T
iLOV-mK489ss	8-метиламинофлавин	Q489K/L470S/G487S
iLOV-dK392	1-дезафлавин	V392K/F410V/A426S
iLOV-dK489tt	1-дезафлавин	Q489K/L470T/L472T

Список литературы

1. Taylor B.L., Zhulin I.B. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1999. – Vol. 63, № 2. – P. 479–506.
2. Huala E. Arabidopsis NPH1: A Protein Kinase with a Putative Redox-Sensing Domain // *Science*. – 1997. – Vol. 278, № 5346. – P. 2120–2123.
3. Briggs W.R., Christie J.M. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors // *Trends in Plant Science*. – 2002. – Vol. 7, № 5. – P. 204–210.
4. Glantz S.T., Carpenter E.J., Melkonian M., et al. Functional and topological diversity of LOV domain photoreceptors // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2016. – Vol. 113, № 11. – P. E1442–E1451.
5. Losi A., Gärtner W. Solving Blue Light Riddles: New Lessons from Flavin-binding LOV Photoreceptors // *Photochemistry and Photobiology*. – 2017. – Vol. 93, № 1. – P. 141–158.
6. Losi A., Gärtner W. The evolution of flavin-binding photoreceptors: An ancient chromophore serving trendy blue-light sensors // *Annual Review of Plant Biology*. – 2012. – Vol. 63. – P. 49–72.
7. Kritsky M.S., Telegina T.A., Vechtomova Y.L., et al. Excited flavin and pterin coenzyme molecules in evolution // *Biochemistry (Moscow)*. – 2010. – Vol. 75, № 10. – P. 1200–1216.
8. Jurk M., Dorn M., Kikhney A., et al. The Switch that Does Not Flip: The Blue-Light Receptor YtvA from *Bacillus subtilis* Adopts an Elongated Dimer Conformation Independent of the Activation State as Revealed by a Combined AUC and SAXS Study // *Journal of Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 403, № 1. – P. 78–87.

9. Losi A., Gärtner W. Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: Flavins in blue light-sensing photoreceptors // *Photochemistry and Photobiology*. – 2011. – Vol. 87, № 3. – P. 491–510.
10. Yee E.F., Diensthuber R.P., Vaidya A.T., et al. Signal transduction in light-oxygen-voltage receptors lacking the adduct-forming cysteine residue // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6.
11. Harper S.M., Neil L.C., Gardner K.H. Structural basis of a phototropin light switch // *Science*. – 2003. – Vol. 301, № 5639. – P. 1541–1544.
12. Halavaty A.S., Moffat K. N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from *Avena sativa* // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46, № 49. – P. 14001–14009.
13. Zayner J.P., Antoniou C., Sosnick T.R. The Amino-Terminal Helix Modulates Light-Activated Conformational Changes in AsLOV2 // *Journal of Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 419, № 1–2. – P. 61–74.
14. Freddolino P.L., Gardner K.H., Schulten K. Signaling mechanisms of LOV domains: new insights from molecular dynamics studies // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2013. – Vol. 12, № 7. – P. 1158.
15. Iuliano J.N., Collado J.T., Gil A.A., et al. Unraveling the Mechanism of a LOV Domain Optogenetic Sensor: A Glutamine Lever Induces Unfolding of the J α Helix // *ACS Chemical Biology*. – 2020. – Vol. 15, № 10. – P. 2752–2765.
16. Nash A.I., Ko W.H., Harper S.M., Gardner K.H. A conserved glutamine plays a central role in LOV domain signal transmission and its duration // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47, № 52. – P. 13842–13849.
17. Möglich A., Moffat K. Structural Basis for Light-dependent Signaling in the Dimeric LOV Domain of the Photosensor YtvA // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 373, № 1. – P. 112–126.
18. Raffelberg S., Mansurova M., Gärtner W., Losi A. Modulation of the photocycle of

- a LOV domain photoreceptor by the hydrogen-bonding network // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Vol. 133, № 14. – P. 5346–5356.
19. Polverini E., Schackert F.K., Losi A. Interplay among the “flipping” glutamine, a conserved phenylalanine, water and hydrogen bonds within a blue-light sensing LOV domain // *Photochemical and Photobiological Sciences*. Royal Society of Chemistry, – 2020. – Vol. 19, № 7. – P. 892–904.
 20. Möglich A., Moffat K. Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools // *Photochemical and Photobiological Sciences*. – 2010. – Vol. 9, № 10. – P. 1286–1300.
 21. Christie J.M., Corchnoy S.B., Swartz T.E., et al. Steric interactions stabilize the signaling state of the LOV2 domain of phototropin 1 // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46, № 32. – P. 9310–9319.
 22. Losi A., Gardner K.H., Möglich A. Blue-Light Receptors for Optogenetics // *Chemical Reviews*. – 2018. – Vol. 118, № 21. – P. 10659–10709.
 23. Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience // *Nature Neuroscience*. – 2015. – Vol. 18, № 9. – P. 1213–1225.
 24. Entcheva E., Kay M.W. Cardiac optogenetics: a decade of enlightenment // *Nature Reviews Cardiology*. – 2021. – Vol. 18, № 5. – P. 349–367.
 25. Tsukamoto H., Furutani Y. Optogenetic Modulation of Ion Channels by Photoreceptive Proteins. – 2021. – P. 73–88.
 26. Shcherbakova D.M., Shemetov A.A., Kaberniuk A.A., Verkhusha V. V. Natural Photoreceptors as a Source of Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools // *Annual Review of Biochemistry*. – 2015. – Vol. 84, № 1. – P. 519–550.
 27. Wu Y.I., Frey D., Lungu O.I., et al. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells // *Nature*. – 2009. – Vol. 461, № 7260. – P. 104–108.

28. Tan P., He L., Huang Y., Zhou Y. Optophysiology: Illuminating Cell Physiology with Optogenetics // *Physiological Reviews*. – 2022. – Vol. 102, № 3. – P. 1263–1325.
29. Hoffmann M.D., Bubeck F., Eils R., Niopek D. Controlling Cells with Light and LOV // *Advanced Biosystems*. – 2018. – Vol. 2, № 9. – P. 1800098.
30. Fischer A.A.M., Kramer M.M., Radziwill G., Weber W. Shedding light on current trends in molecular optogenetics // *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd, – 2022. – Vol. 70. – P. 102196.
31. Alizadeh S., Esmaeili A., Barar J., Omidi Y. Optogenetics: A new tool for cancer investigation and treatment // *BioImpacts*. – 2022. – Vol. 12, № 4. – P. 295–299.
32. Kennis J.T.M., van Stokkum I.H.M., Crosson S., et al. The LOV2 Domain of Phototropin: A Reversible Photochromic Switch // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126, № 14. – P. 4512–4513.
33. Pudasaini A., El-Arab K.K., Zoltowski B.D. LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2015. – Vol. 2.
34. Gregor C., Sidenstein S.C., Andresen M., et al. Novel reversibly switchable fluorescent proteins for RESOLFT and STED nanoscopy engineered from the bacterial photoreceptor YtvA // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 1–9.
35. Swartz T.E., Corchnoy S.B., Christie J.M., et al. The Photocycle of a Flavin-binding Domain of the Blue Light Photoreceptor Phototropin // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276, № 39. – P. 36493–36500.
36. Drepper T., Eggert T., Circolone F., et al. Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen // *Nature Biotechnology*. – 2007. – Vol. 25, № 4. – P. 443–445.
37. Walter J., Hausmann S., Drepper T., et al. Flavin Mononucleotide-Based Fluorescent Proteins Function in Mammalian Cells without Oxygen Requirement //

- PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. 1–8.
38. Chapman S., Faulkner C., Kaiserli E., et al. The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – Vol. 105, № 50. – P. 20038–20043.
 39. Nakasako M., Iwata T., Matsuoka D., Tokutomi S. Light-Induced Structural Changes of LOV Domain-Containing Polypeptides from Arabidopsis Phototropin 1 and 2 Studied by Small-Angle X-ray Scattering † // Biochemistry. – 2004. – Vol. 43, № 47. – P. 14881–14890.
 40. Du Y., Liu T., Qin Y., et al. Insertion of exogenous genes within the orf1a coding region of porcine astrovirus // Viruses. – 2021. – Vol. 13, № 11. – P. 1–14.
 41. Ren T., Min X., Mo Q., et al. Construction and characterization of a full-length infectious clone of Getah virus in vivo // Virologica Sinica. The Authors, – 2022. – Vol. 37, № 3. – P. 348–357.
 42. Tsai T.-H., Chang C.-Y., Wang F.-I. THE FEASIBILITY OF CONSTRUCTING A PORCINE TESCHOVIRUS INFECTIOUS cDNA CLONE TAGGED WITH iLOV FLUORESCENT PROTEIN RESCUED AS A VISIBLE MARKER VIRUS // Taiwan Veterinary Journal. – 2021. – Vol. 47, № 03n04. – P. 81–96.
 43. Röder J., Dickmeis C., Fischer R., Commandeur U. Systemic infection of nicotiana benthamiana with Potato virus X nanoparticles presenting a fluorescent iLOV polypeptide fused directly to the coat protein // BioMed Research International. – 2018. – Vol. 2018.
 44. Mukherjee A., Walker J., Weyant K.B., Schroeder C.M. Characterization of Flavin-Based Fluorescent Proteins: An Emerging Class of Fluorescent Reporters // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 5.
 45. Christie J.M., Hitomi K., Arvai A.S., et al. Structural tuning of the fluorescent protein iLOV for improved photostability // Journal of Biological Chemistry. –

2012. – Vol. 287, № 26. – P. 22295–22304.
46. Mukherjee A., Weyant K.B., Agrawal U., et al. Engineering and characterization of new LOV-based fluorescent proteins from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Vaucheria frigida* // *ACS Synthetic Biology*. – 2015. – Vol. 4, № 4. – P. 371–377.
 47. Wingen M., Jaeger K.E., Gensch T., Drepper T. Novel Thermostable Flavin-binding Fluorescent Proteins from Thermophilic Organisms // *Photochemistry and Photobiology*. – 2017. – Vol. 93, № 3. – P. 849–856.
 48. Nazarenko V. V., Remeeva A., Yudenko A., et al. A thermostable flavin-based fluorescent protein from *Chloroflexus aggregans*: A framework for ultra-high resolution structural studies // *Photochemical and Photobiological Sciences*. Royal Society of Chemistry, – 2019. – Vol. 18, № 7. – P. 1793–1805.
 49. Potzkei J., Kunze M., Drepper T., et al. Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor // *BMC Biology*. – 2012. – Vol. 10.
 50. Jensen F. *Introduction to Computational Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, – 2007. 619 p.
 51. Mackerell A.D., Feig M., Brooks C.L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations // *Journal of Computational Chemistry*. – 2004. – Vol. 25, № 11. – P. 1400–1415.
 52. MacKerell A.D., Bashford D., Bellott M., et al. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins † // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 1998. – Vol. 102, № 18. – P. 3586–3616.
 53. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. Development and testing of a general amber force field // *Journal of Computational Chemistry*. – 2004. – Vol. 25, № 9. – P. 1157–1174.

54. Phillips J.C., Braun R., Wang W., et al. Scalable molecular dynamics with NAMD // *Journal of Computational Chemistry*. – 2005. – Vol. 26, № 16. – P. 1781–1802.
55. Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems // *The Journal of Chemical Physics*. – 1993. – Vol. 98, № 12. – P. 10089–10092.
56. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields // *Journal of Computational Chemistry*. – 2009. – P. NA-NA.
57. Mayne C.G., Saam J., Schulten K., Tajkhorshid E., Gumbart J.C. Rapid parameterization of small molecules using the force field toolkit // *Journal of Computational Chemistry*. – 2013. – Vol. 34, № 32. – P. 2757–2770.
58. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // *Journal of Molecular Graphics*. – 1996. – Vol. 14, № 1. – P. 33–38.
59. Senn H.M., Thiel W. QM/MM Methods for Biological Systems // *Atomistic Approaches in Modern Biology*. – 2006. № November 2006. – P. 173–290.
60. Adamo C., Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model // *The Journal of Chemical Physics*. – 1999. – Vol. 110, № 13. – P. 6158–6170.
61. Grimme S. Improved second-order Møller–Plesset perturbation theory by separate scaling of parallel- and antiparallel-spin pair correlation energies // *The Journal of Chemical Physics*. – 2003. – Vol. 118, № 20. – P. 9095–9102.
62. Valiev M., Bylaska E.J., Govind N., et al. NWChem: A comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations // *Computer Physics Communications*. – 2010. – Vol. 181, № 9. – P. 1477–1489.
63. 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.
64. 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. Royal Society of Chemistry*, – 2019. – Vol. 18, № 1. – P. 177–189.
 65. Метелешко Ю.И., Немухин А.В., Хренова М.Г. Моделирование Фотофизических Свойств Компонентов Fret-Пар На Основе Флавинсодержащих Флуоресцентных Белков И Их Аналогов // *Химическая Физика*. – 2019. – Vol. 38, № 6. – P. 3–7.
 66. 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.
 67. Khrenova M.G., Nemukhin A. V., Domratcheva T. Theoretical characterization of the flavin-based fluorescent protein iLOV and its Q489K mutant // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. – Vol. 119, № 16. – P. 5176–5183.
 68. Davari M.D., Kopka B., Wingen M., et al. Photophysics of the LOV-Based Fluorescent Protein Variant iLOV-Q489K Determined by Simulation and Experiment // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – Vol. 120, № 13. – P. 3344–3352.
 69. Silva-Junior M.R., Mansurova M., Gärtner W., Thiel W. Photophysics of Structurally Modified Flavin Derivatives in the Blue-Light Photoreceptor YtvA: A Combined Experimental and Theoretical Study // *ChemBioChem*. – 2013. – Vol. 14, № 13. – P. 1648–1661.
 70. Tyagi A., Penzkofer A., Mathes T., Hegemann P. Photophysical characterisation and photo-cycle dynamics of LOV1-His domain of phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii* with roseoflavin monophosphate cofactor // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Elsevier B.V.*, – 2010. – Vol. 101,

- № 1. – P. 76–88.
71. Zirak P., Penzkofer A., Mathes T., Hegemann P. Photo-dynamics of roseoflavin and riboflavin in aqueous and organic solvents // *Chemical Physics*. – 2009. – Vol. 358, № 1–2. – P. 111–122.
72. Tyagi A., Zirak P., Penzkofer A., et al. Absorption and emission spectroscopic characterisation of 8-amino-riboflavin // *Chemical Physics*. Elsevier B.V., – 2009. – Vol. 364, № 1–3. – P. 19–30.
73. Tyagi A., Penzkofer A., Mathes T., Hegemann P. Photo-degradation behaviour of roseoflavin in some aqueous solutions // *Chemical Physics*. Elsevier B.V., – 2010. – Vol. 369, № 1. – P. 27–36.
74. Slavov C., Mansurova M., Holzwarth A.R., Gärtner W. Excited state processes in 1-deazariboflavin studied by ultrafast fluorescence kinetics // *Photochemistry and Photobiology*. – 2010. – Vol. 86, № 1. – P. 31–38.
75. Kobayashi H., Ogawa M., Alford R., Choyke P.L., Urano Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging // *Chemical Reviews*. – 2010. – Vol. 110, № 5. – P. 2620–2640.
76. Potzkei J., Kunze M., Drepper T., et al. Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor // *BMC Biology*. BioMed Central Ltd, – 2012. – Vol. 10, № 1. – P. 28.
77. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Berlin: Springer, – 2006. 954 p.
78. Schermelleh L., Ferrand A., Huser T., et al. Super-resolution microscopy demystified // *Nature Cell Biology*. Springer US, – 2019. – Vol. 21, № 1. – P. 72–84.
79. Vetschera P., Mishra K., Fuenzalida-Werner J.P., et al. Characterization of Reversibly Switchable Fluorescent Proteins in Optoacoustic Imaging // *Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 90, № 17. – P. 10527–10535.

80. Losi A., Gärtner W., Raffelberg S., et al. A photochromic bacterial photoreceptor with potential for super-resolution microscopy // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2013. – Vol. 12, № 2. – P. 231–235.
81. Glykos N.M. Software news and updates carma: A molecular dynamics analysis program // *Journal of Computational Chemistry.* – 2006. – Vol. 27, № 14. – P. 1765–1768.
82. Koukos P.I., Glykos N.M. Grcarma: A fully automated task-oriented interface for the analysis of molecular dynamics trajectories // *Journal of Computational Chemistry.* – 2013. – Vol. 34, № 26. – P. 2310–2312.
83. Röllén K., Granzin J., Remeeva A., et al. The molecular basis of spectral tuning in blue- And red-shifted flavin-binding fluorescent proteins // *Journal of Biological Chemistry. Elsevier B.V.* – 2021. – Vol. 296. – P. 100662.
84. Wehler P., Armbruster D., Günter A., et al. Experimental Characterization of In Silico Red-Shift-Predicted iLOV L470T/Q489K and iLOV V392K/F410V/A426S Mutants // *ACS Omega.* – 2022. – Vol. 7, № 23. – P. 19555–19560.
85. Kabir M.P., Ouedraogo D., Orozco-gonzalez Y., Gadda G., Gozem S. An Alternative Strategy for Spectral Tuning of Flavin-binding Fluorescent Proteins. – 2023. – P. 1–28.

Приложение А

Таблица А.1. Оптимизированные заряды CGenFF для флавиномононуклеотида.
Нумерация атомов приведена на рисунке А.1.

Атом	Заряд	Атом	Заряд	Атом	Заряд	Атом	Заряд
<i>O1P</i>	-0.900	<i>H3'</i>	0.090	<i>H9</i>	0.115	<i>H6</i>	0.115
<i>P</i>	1.100	<i>O3'</i>	-0.650	<i>C8</i>	0.004	<i>C10</i>	0.325
<i>O2P</i>	-0.900	<i>HO3</i>	0.419	<i>C8M</i>	-0.270	<i>C4A</i>	0.270
<i>O3P</i>	-0.900	<i>C2'</i>	0.138	<i>H81</i>	0.090	<i>N5</i>	-0.220
<i>O5'</i>	-0.400	<i>H2'</i>	0.090	<i>H82</i>	0.090	<i>C4</i>	0.326
<i>C5'</i>	-0.180	<i>O2'</i>	-0.650	<i>H83</i>	0.090	<i>O4</i>	-0.500
<i>H51</i>	0.090	<i>HO2</i>	0.419	<i>C7</i>	0.000	<i>N3</i>	-0.280
<i>H52</i>	0.090	<i>C1'</i>	-0.010	<i>C7M</i>	-0.270	<i>H3</i>	0.274
<i>C4'</i>	0.144	<i>H11</i>	0.113	<i>H71</i>	0.090	<i>C2</i>	0.636
<i>H4</i>	0.090	<i>H12</i>	0.113	<i>H72</i>	0.090	<i>N1</i>	-0.390
<i>O4'</i>	-0.650	<i>N10</i>	-0.420	<i>H73</i>	0.090	<i>O2</i>	-0.610
<i>HO4</i>	0.419	<i>C9A</i>	-0.140	<i>C5A</i>	0.222		
<i>C3'</i>	0.145	<i>C9</i>	0.157	<i>C6</i>	-0.110		

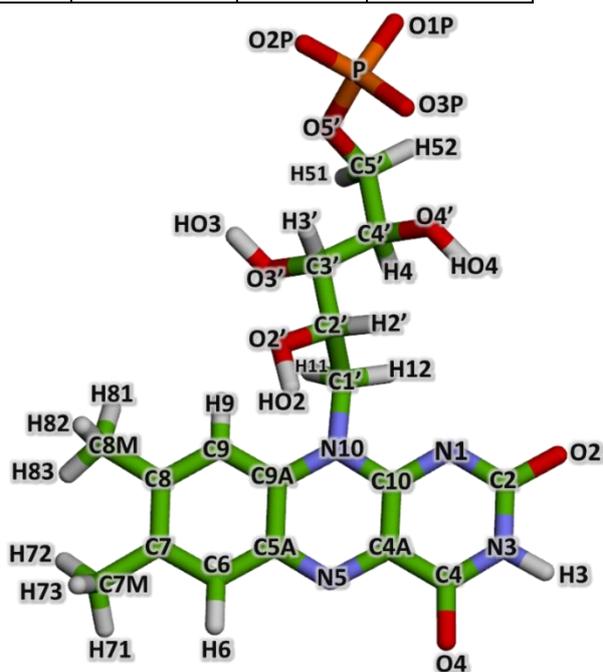


Рисунок А.1. Обозначение атомов флавиномононуклеотида.

Таблица А.2. Оптимизированные заряды CGenFF для 8-аминофлавинмононуклеотида. Нумерация атомов приведена на рисунке А.2.

Атом	Заряд	Атом	Заряд	Атом	Заряд	Атом	Заряд
<i>O1P</i>	-0.900	<i>H3'</i>	0.090	<i>H9</i>	0.115	<i>C10</i>	0.413
<i>P</i>	1.100	<i>O3'</i>	-0.654	<i>C8</i>	-0.137	<i>C4A</i>	0.136
<i>O2P</i>	-0.900	<i>H03</i>	0.419	<i>N8M</i>	-0.692	<i>N5</i>	-0.336
<i>O3P</i>	-0.900	<i>C2'</i>	0.138	<i>H81</i>	0.382	<i>C4</i>	0.499
<i>O5'</i>	-0.402	<i>H2'</i>	0.090	<i>H82</i>	0.382	<i>O4</i>	-0.483
<i>C5'</i>	-0.178	<i>O2'</i>	-0.647	<i>C7</i>	0.324	<i>N3</i>	-0.410
<i>H51</i>	0.090	<i>HO2</i>	0.419	<i>C7M</i>	-0.319	<i>H3</i>	0.285
<i>H52</i>	0.090	<i>C1'</i>	-0.091	<i>H71</i>	0.090	<i>C2</i>	0.534
<i>C4'</i>	0.144	<i>H11</i>	0.119	<i>H72</i>	0.090	<i>N1</i>	-0.336
<i>H4</i>	0.090	<i>H12</i>	0.119	<i>H73</i>	0.090	<i>O2</i>	-0.538
<i>O4'</i>	-0.653	<i>N10</i>	-0.443	<i>C5A</i>	0.057		
<i>HO4</i>	0.419	<i>C9A</i>	0.249	<i>C6</i>	-0.165		
<i>C3'</i>	0.145	<i>C9</i>	-0.049	<i>H6</i>	0.115		

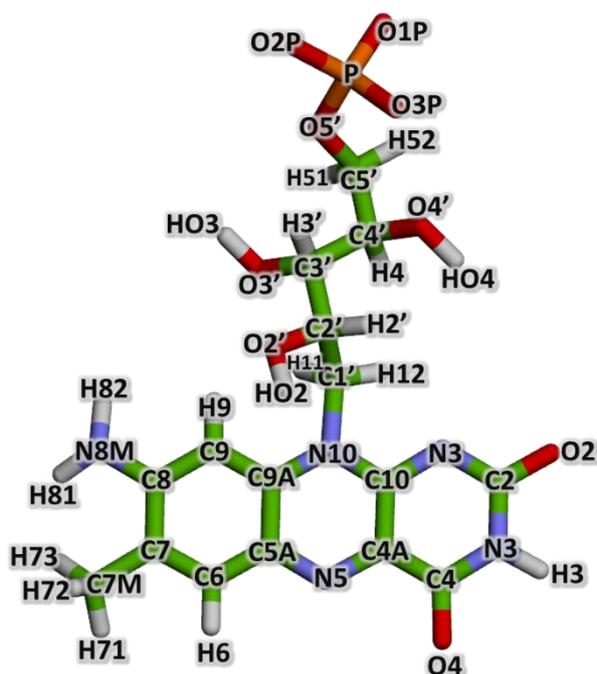


Рисунок А.2. Обозначение атомов 8-аминофлавинмононуклеотида.

Таблица А.3. Оптимизированные заряды CGenFF для 8-метиламинофлавинмононуклеотида. Нумерация атомов приведена на рисунке А.3.

Атом	Заряд	Атом	Заряд	Атом	Заряд	Атом	Заряд
<i>O1P</i>	-0.900	<i>H3'</i>	0.090	<i>H9</i>	0.115	<i>C5A</i>	0.098
<i>P</i>	1.100	<i>O3'</i>	-0.654	<i>C8</i>	-0.020	<i>C6</i>	0.081
<i>O2P</i>	-0.900	<i>HO3</i>	0.419	<i>N8M</i>	-0.420	<i>H6</i>	0.115
<i>O3P</i>	-0.900	<i>C2'</i>	0.138	<i>C81</i>	-0.171	<i>C10</i>	0.410
<i>O5'</i>	-0.402	<i>H2'</i>	0.090	<i>H80</i>	0.368	<i>C4A</i>	0.192
<i>C5'</i>	-0.178	<i>O2'</i>	-0.647	<i>H81</i>	0.090	<i>N5</i>	-0.265
<i>H51</i>	0.090	<i>HO2</i>	0.419	<i>H82</i>	0.090	<i>C4</i>	0.229
<i>H52</i>	0.090	<i>C1'</i>	-0.001	<i>H83</i>	0.090	<i>O4</i>	-0.474
<i>C4'</i>	0.144	<i>H11</i>	0.135	<i>C7</i>	-0.051	<i>N3</i>	-0.181
<i>H4</i>	0.090	<i>H12</i>	0.135	<i>C7M</i>	-0.190	<i>H3</i>	0.338
<i>O4'</i>	-0.653	<i>N10</i>	-0.422	<i>H71</i>	0.090	<i>C2</i>	0.315
<i>HO4</i>	0.419	<i>C9A</i>	0.093	<i>H72</i>	0.090	<i>N1</i>	-0.328
<i>C3'</i>	0.145	<i>C9</i>	-0.138	<i>H73</i>	0.090	<i>O2</i>	-0.503

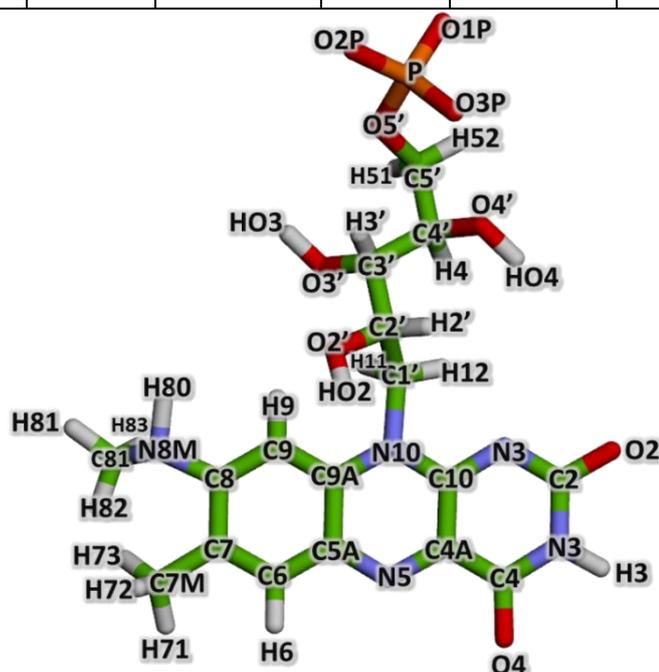


Рисунок А.3. Обозначение атомов 8-метиламинофлавинмононуклеотида

Таблица А.4. Оптимизированные заряды CGenFF для 1-дезафлавинмононуклеотида. Нумерация атомов приведена на рисунке А.4.

Атом	Заряд	Атом	Заряд	Атом	Заряд	Атом	Заряд
<i>O1P</i>	-0.900	<i>H3'</i>	0.090	<i>H9</i>	0.115	<i>H6</i>	0.115
<i>P</i>	1.100	<i>O3'</i>	-0.654	<i>C8</i>	-0.061	<i>C10</i>	0.455
<i>O2P</i>	-0.900	<i>HO3</i>	0.419	<i>C8M</i>	-0.223	<i>C4A</i>	0.095
<i>O3P</i>	-0.900	<i>C2'</i>	0.138	<i>H81</i>	0.090	<i>N5</i>	-0.420
<i>O5'</i>	-0.402	<i>H2'</i>	0.090	<i>H82</i>	0.090	<i>C4</i>	0.316
<i>C5'</i>	-0.178	<i>O2'</i>	-0.647	<i>H83</i>	0.090	<i>O4</i>	-0.483
<i>H51</i>	0.090	<i>HO2</i>	0.419	<i>C7</i>	-0.100	<i>N3</i>	-0.255
<i>H52</i>	0.090	<i>C1'</i>	-0.091	<i>C7M</i>	-0.129	<i>H3</i>	0.320
<i>C4'</i>	0.144	<i>H11</i>	0.119	<i>H71</i>	0.090	<i>C2</i>	0.372
<i>H4</i>	0.090	<i>H12</i>	0.119	<i>H72</i>	0.090	<i>C1</i>	-0.193
<i>O4'</i>	-0.653	<i>N10</i>	-0.369	<i>H73</i>	0.090	<i>O2</i>	-0.537
<i>HO4</i>	0.419	<i>C9A</i>	0.003	<i>C5A</i>	0.343	<i>H1</i>	0.009
<i>C3'</i>	0.145	<i>C9</i>	-0.077	<i>C6</i>	-0.069		

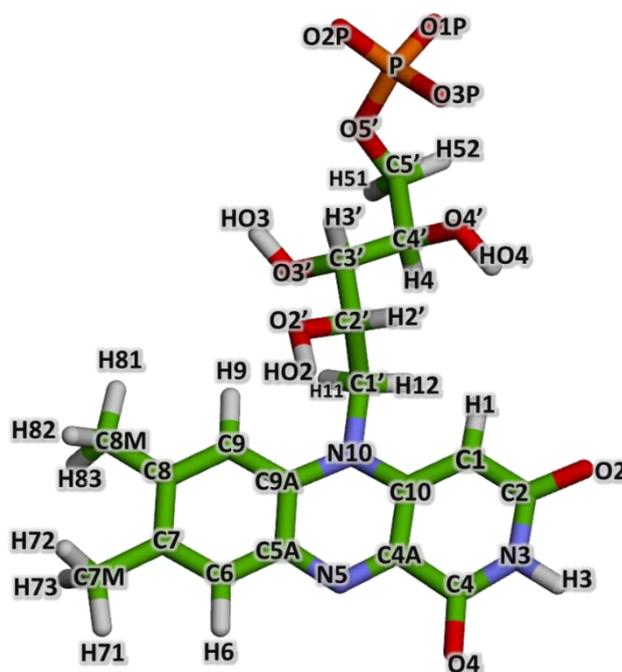
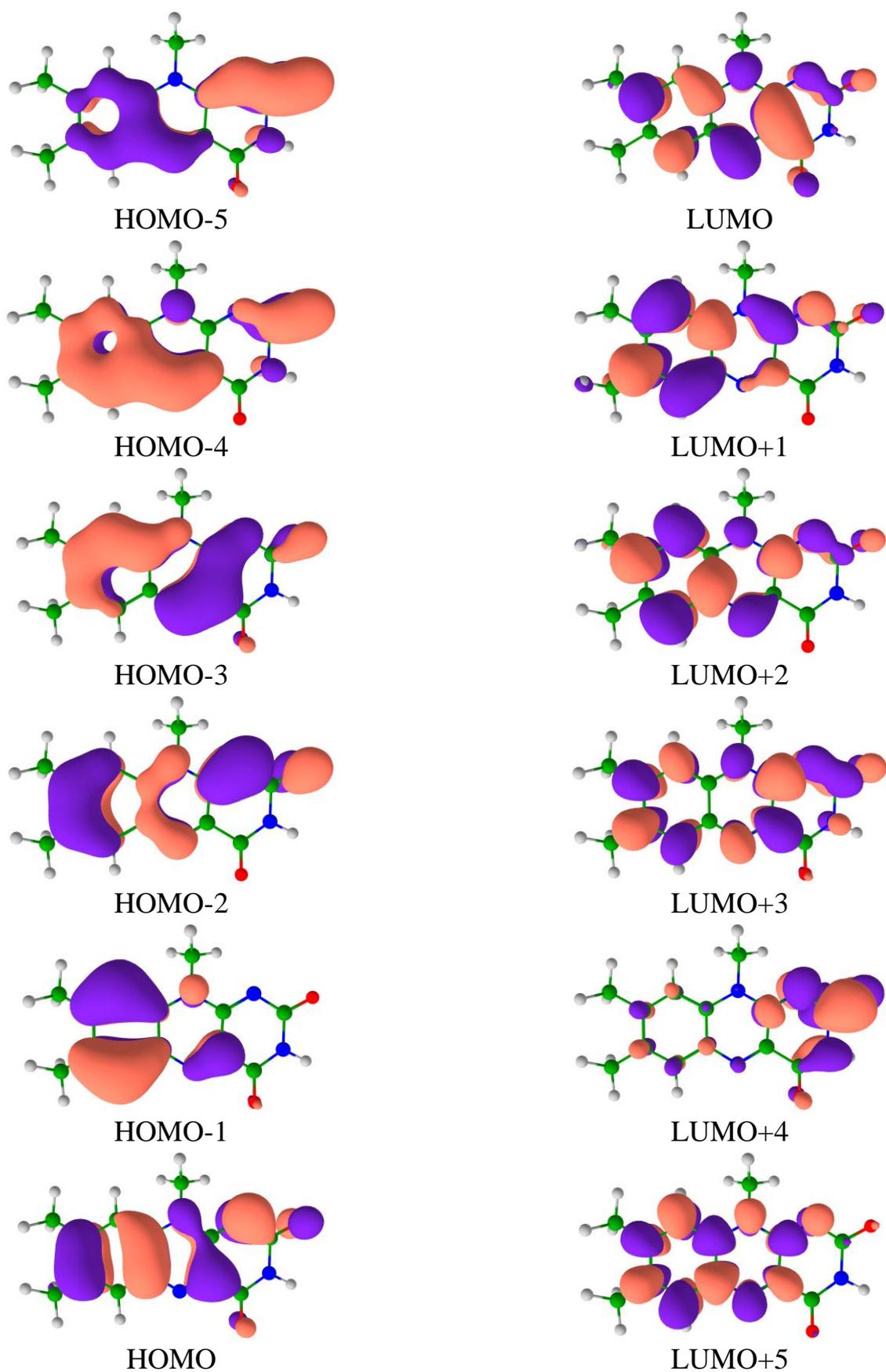


Рисунок А.4. Обозначение атомов 1-дезафлавинмононуклеотида.

Приложение Б

Рисунок Б1. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для $i\text{LOV}_{in}$

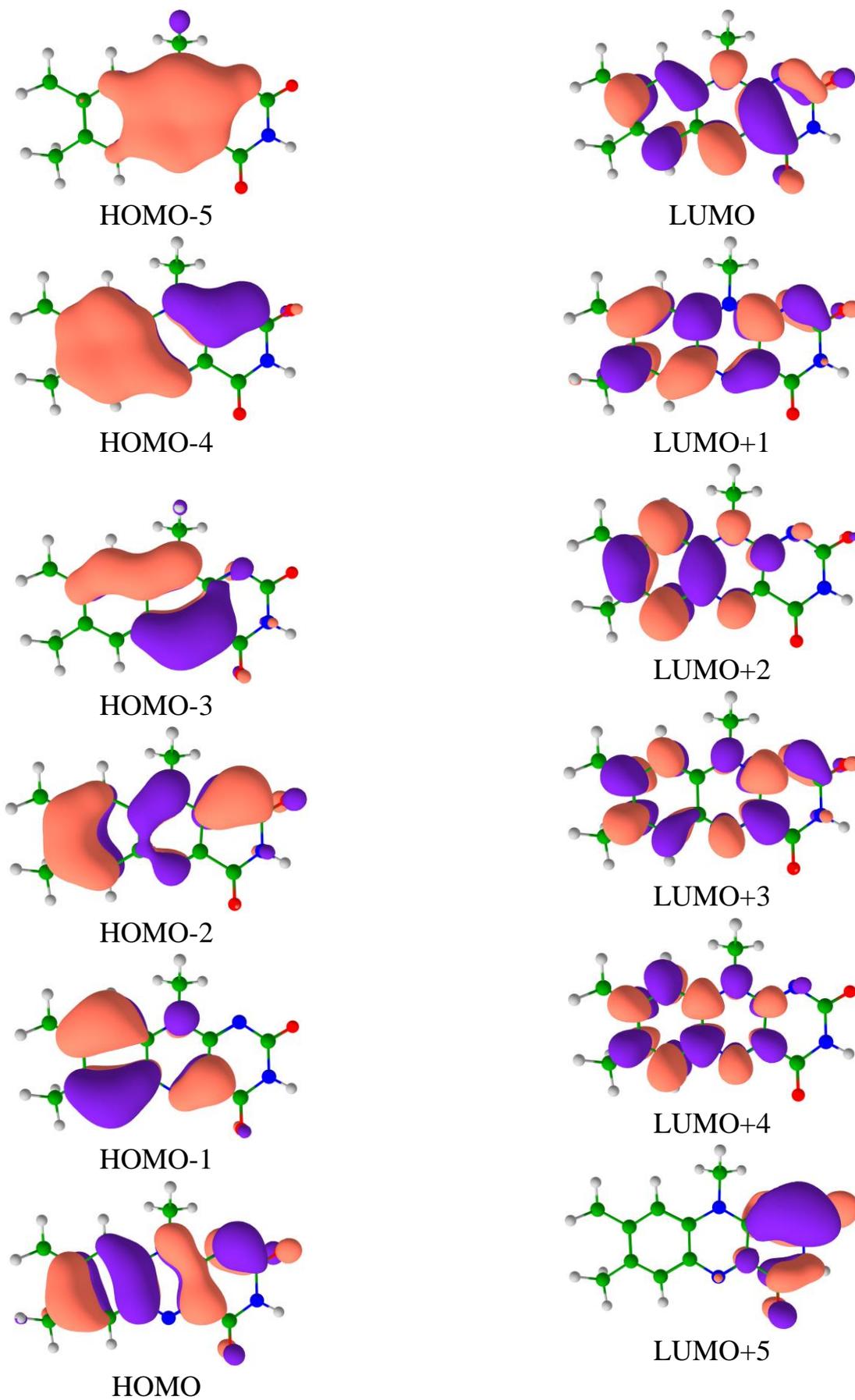


Рисунок Б2. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для $i\text{LOV}_{\text{out}}$

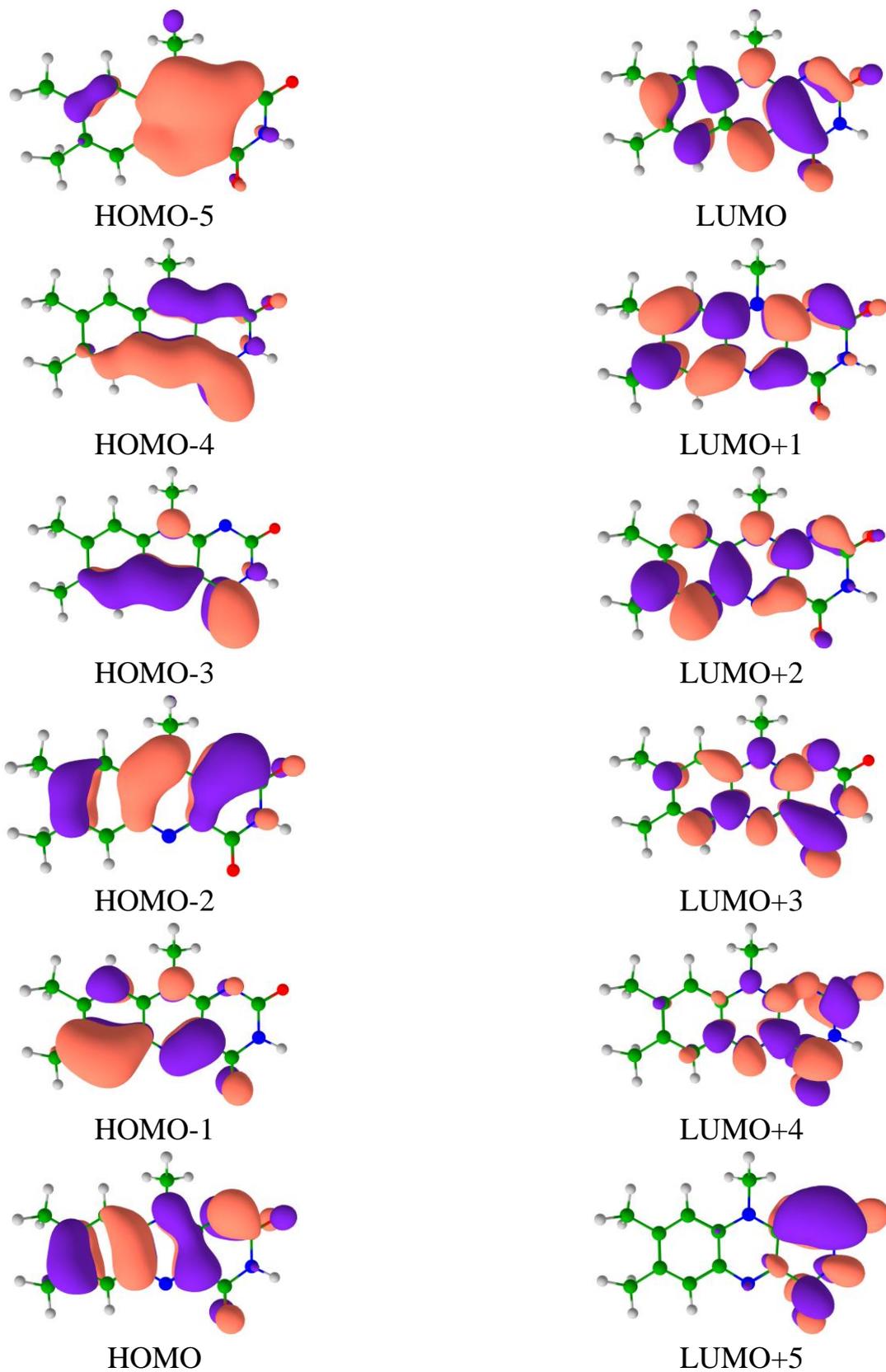


Рисунок Б3. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-Q489K

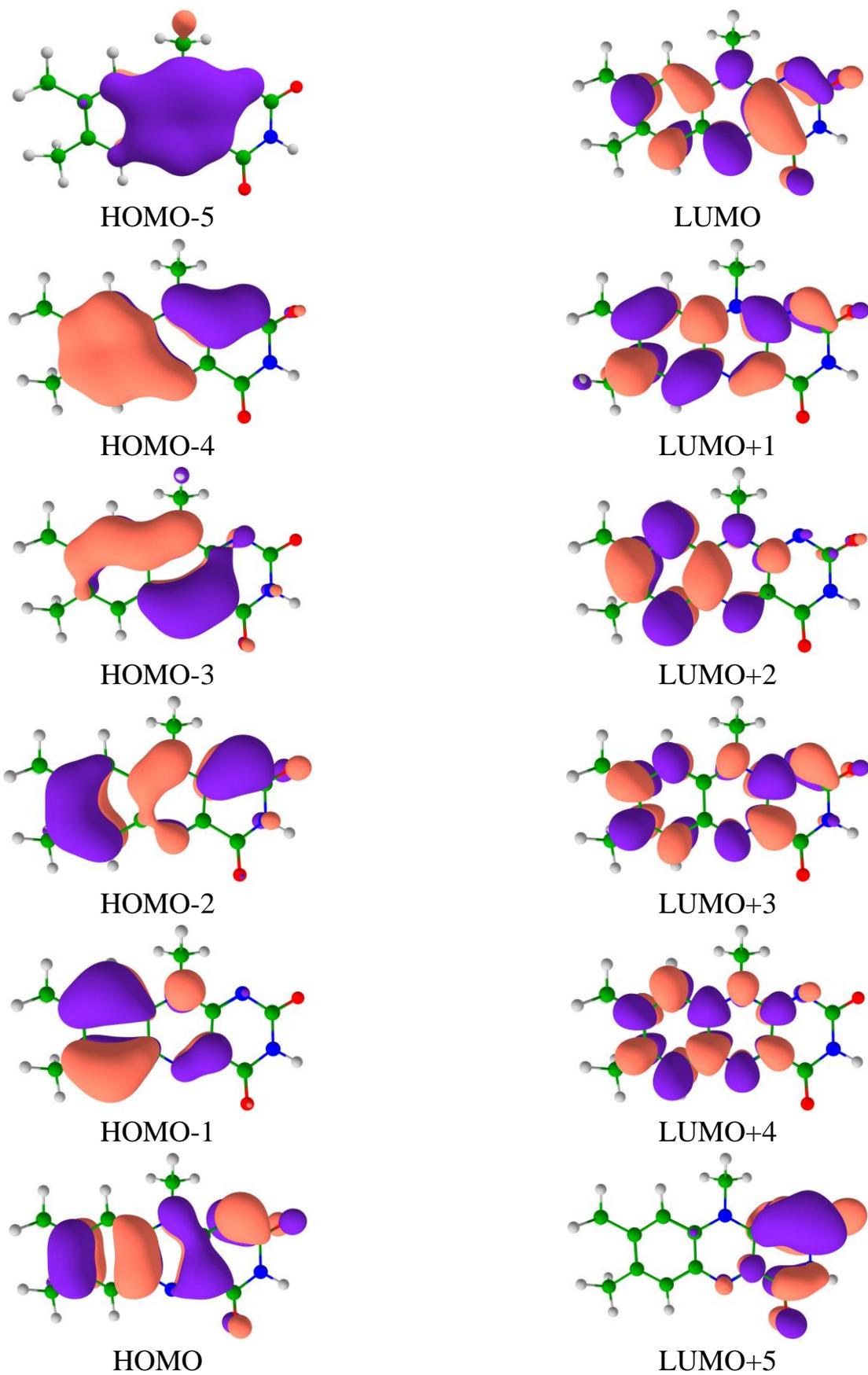


Рисунок Б4. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-K489a1

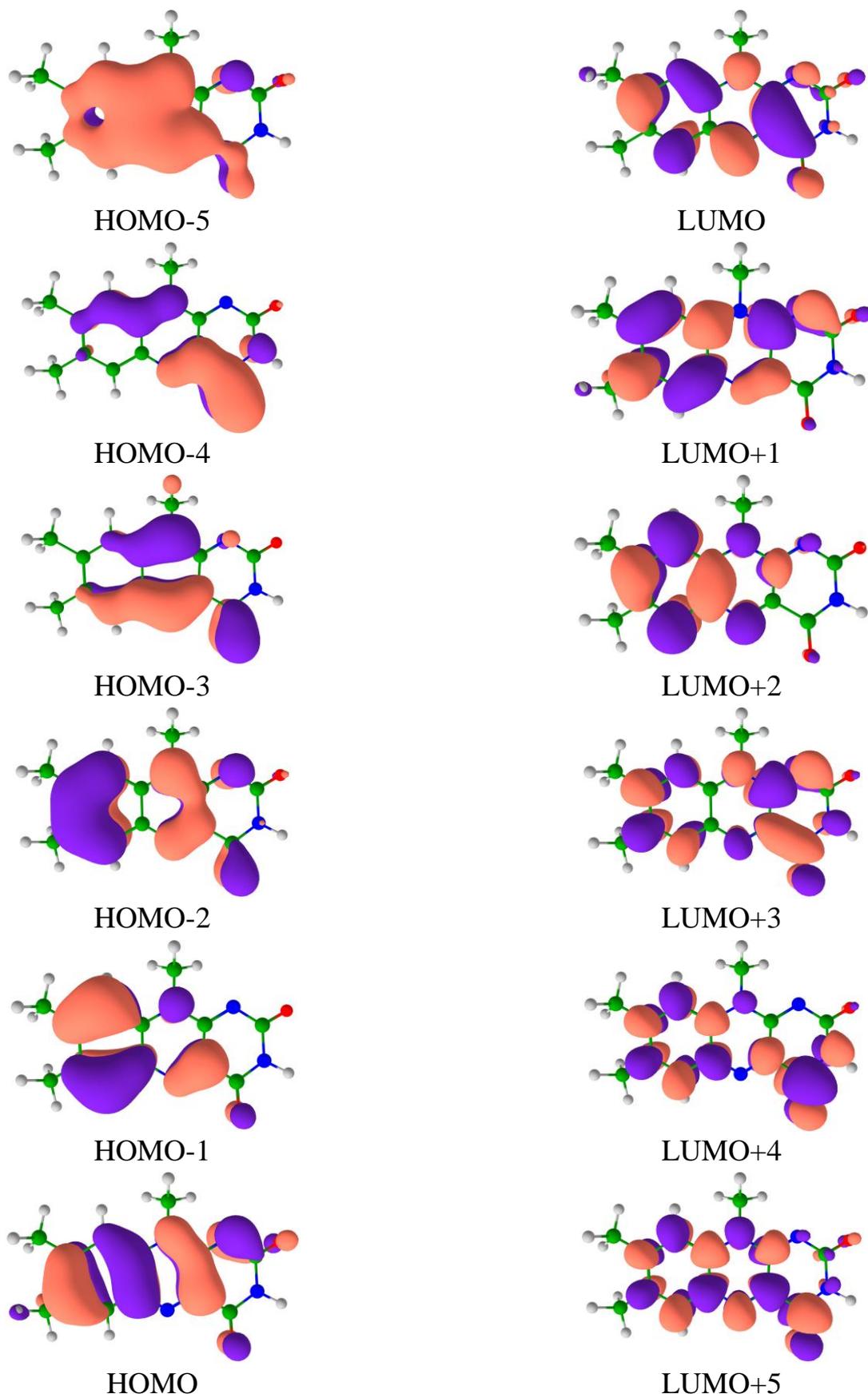


Рисунок Б5. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-K489a2

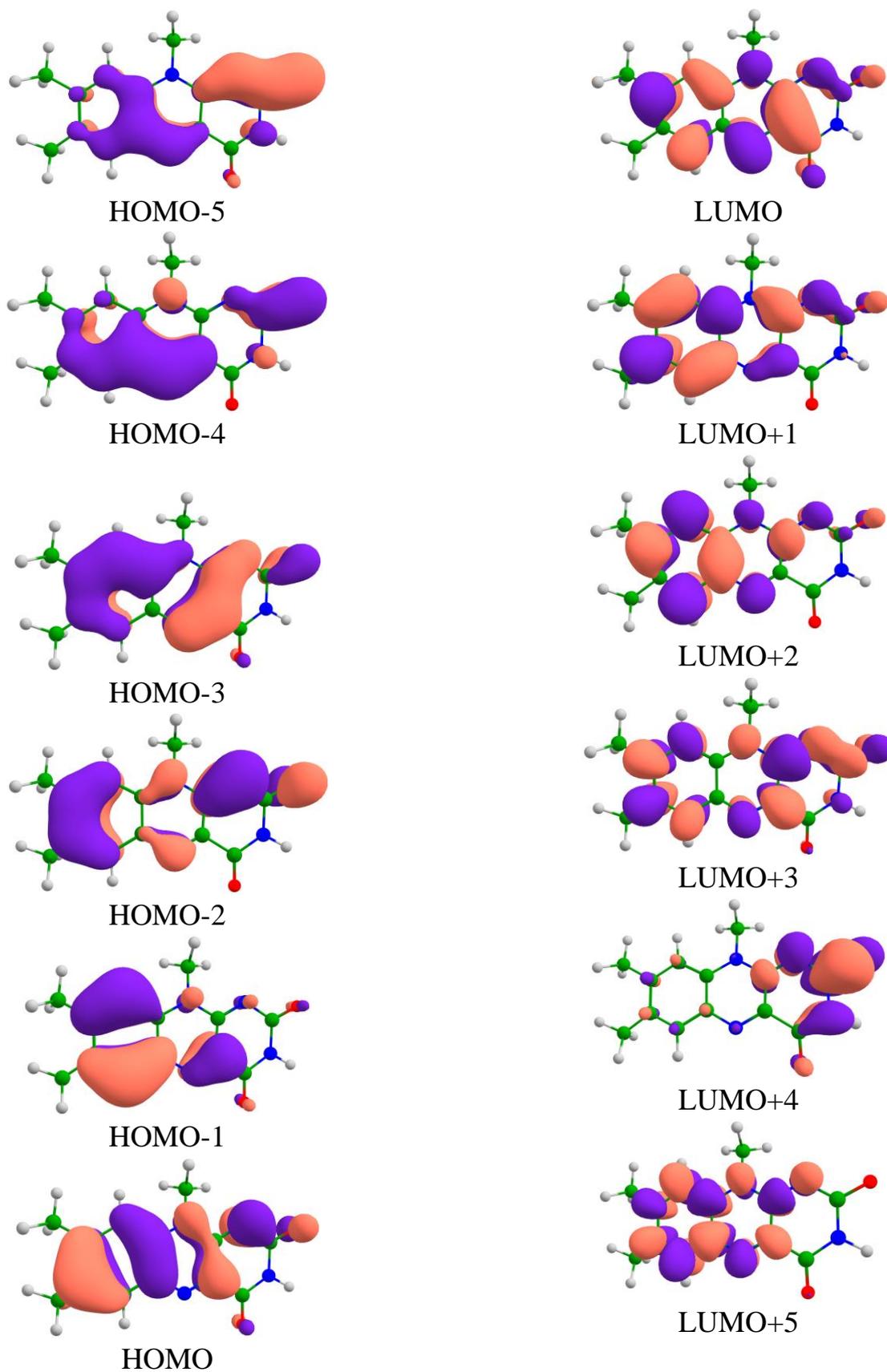


Рисунок Б6. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-K489a3

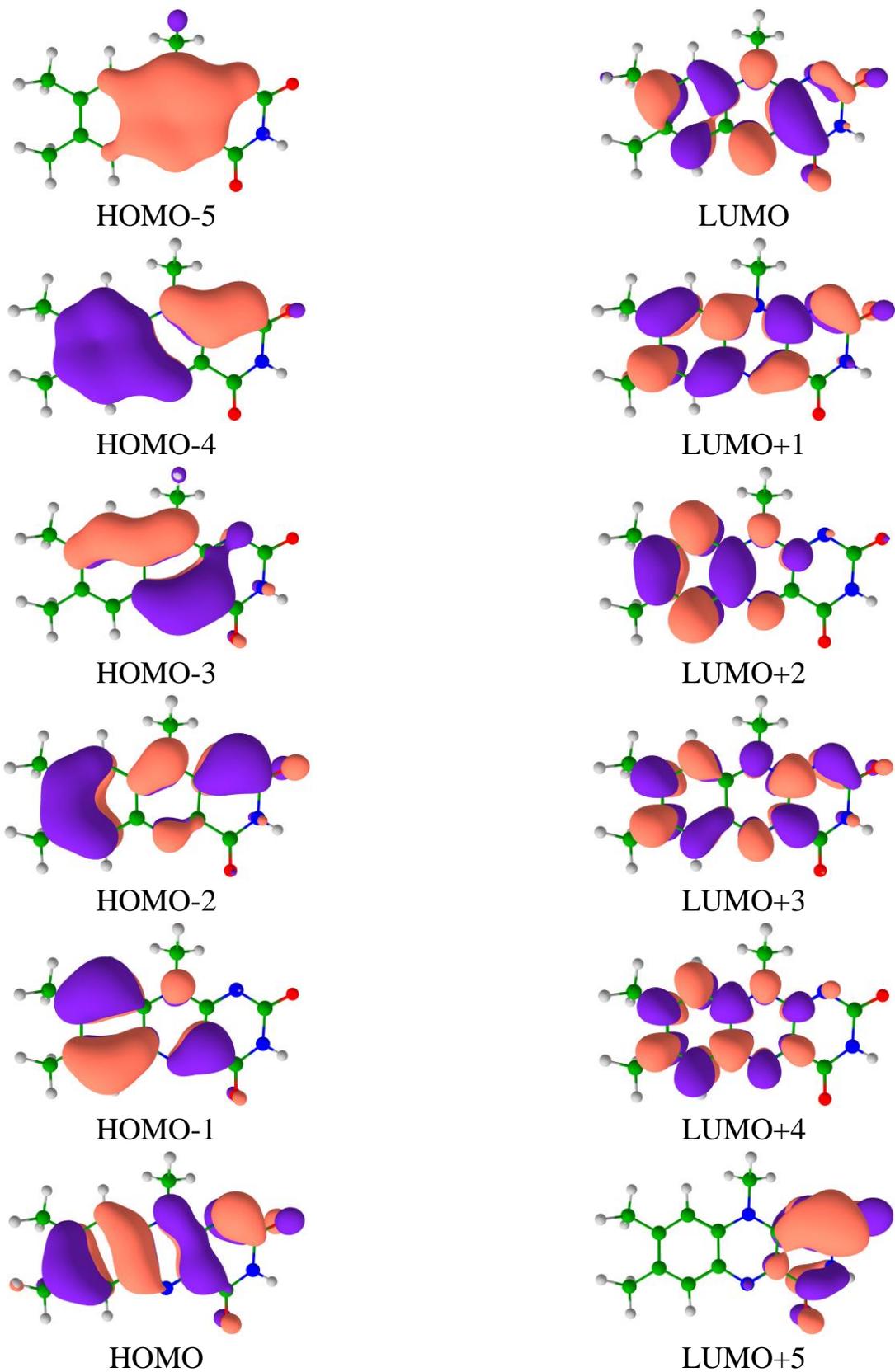


Рисунок Б7. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-K489t

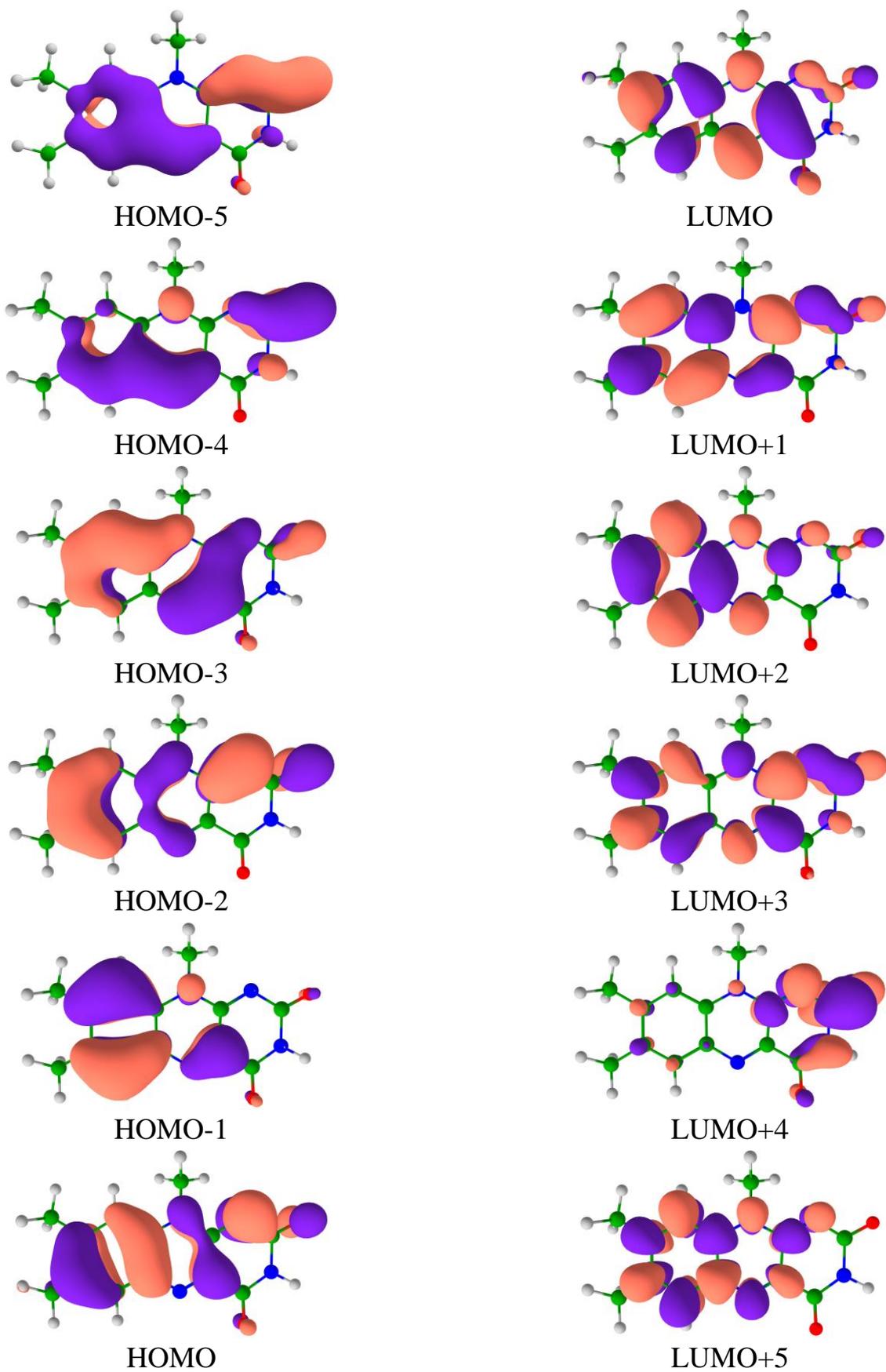


Рисунок Б8. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-K392

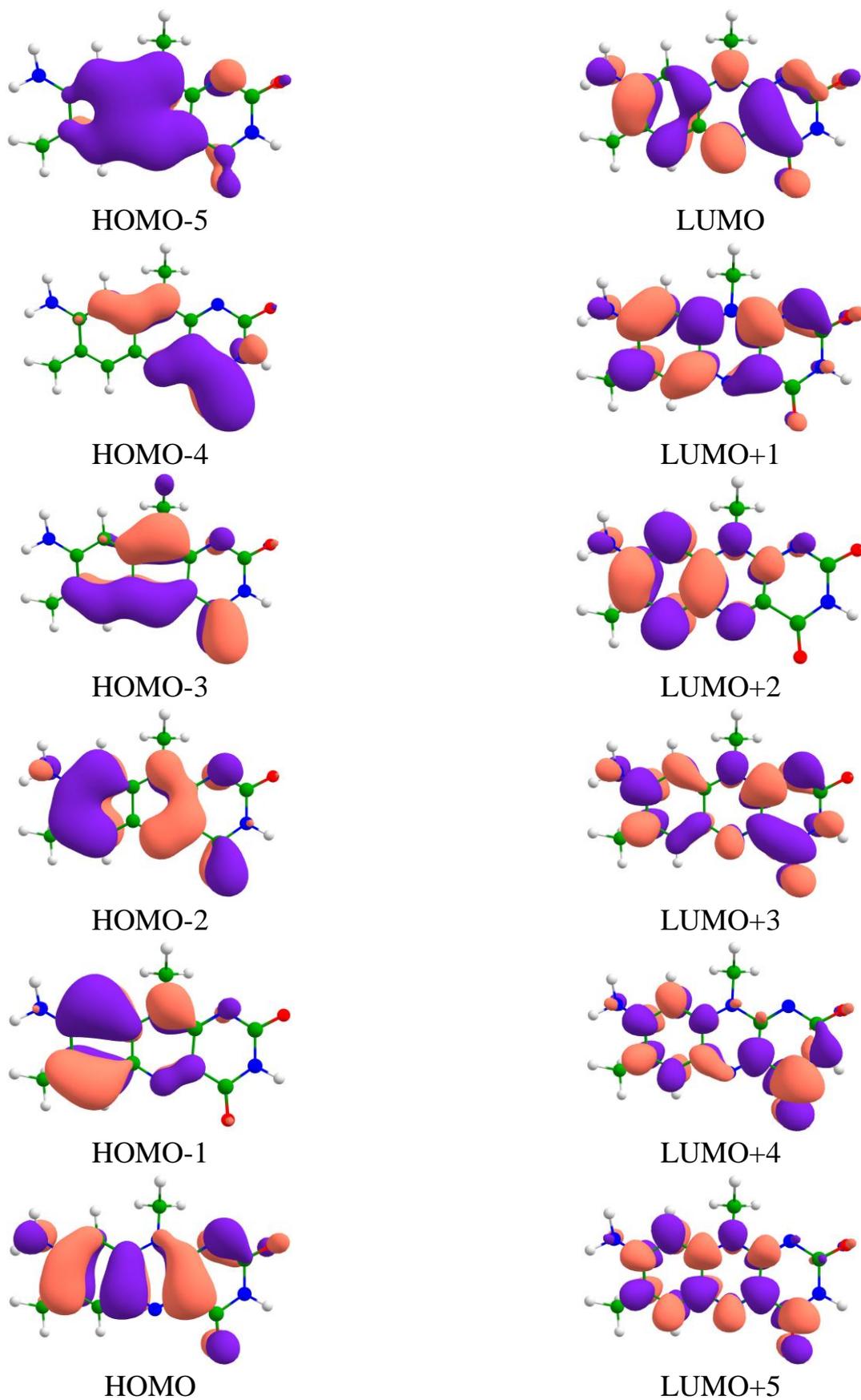


Рисунок Б9. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-a

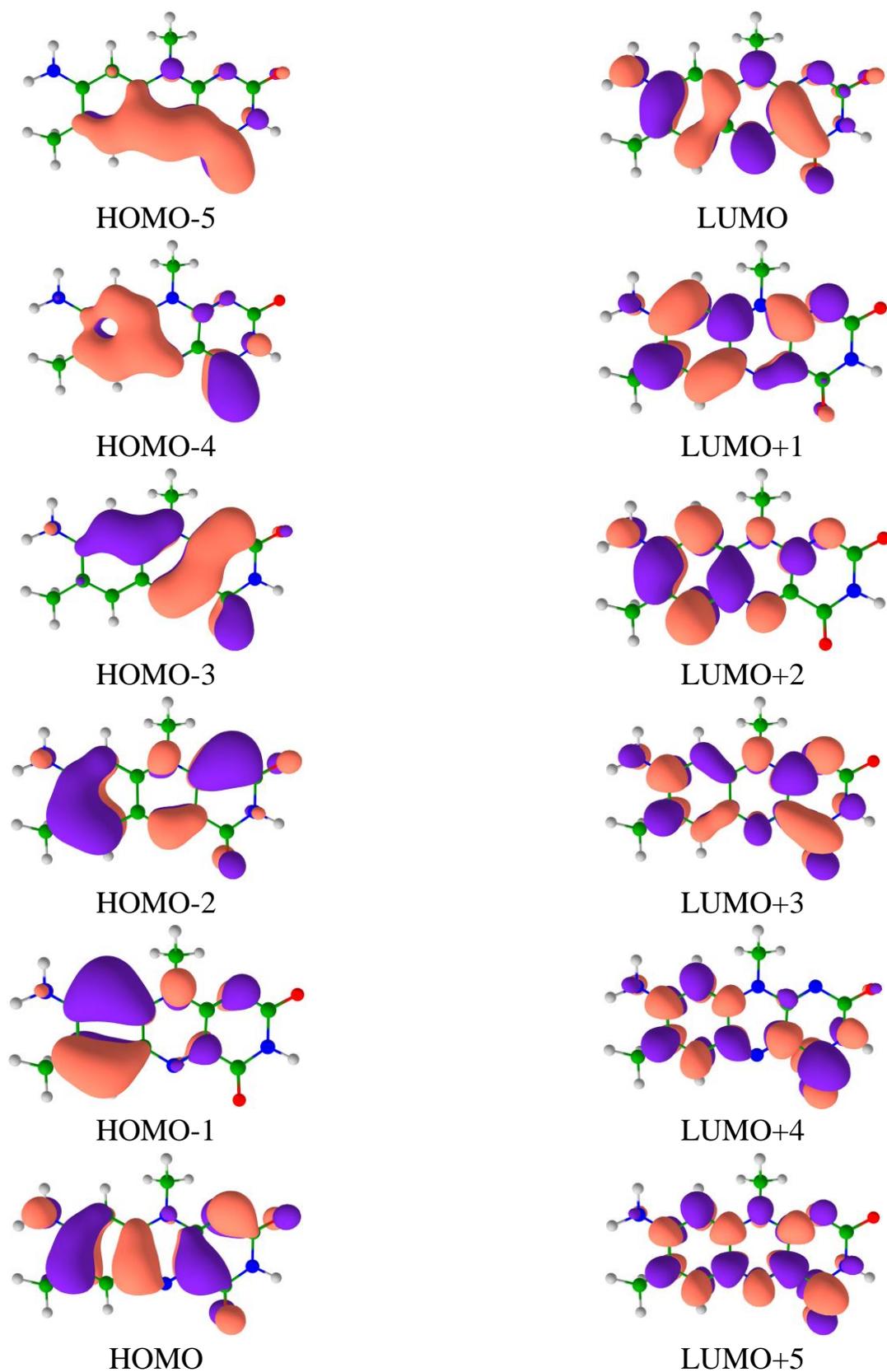


Рисунок Б10. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-aK392

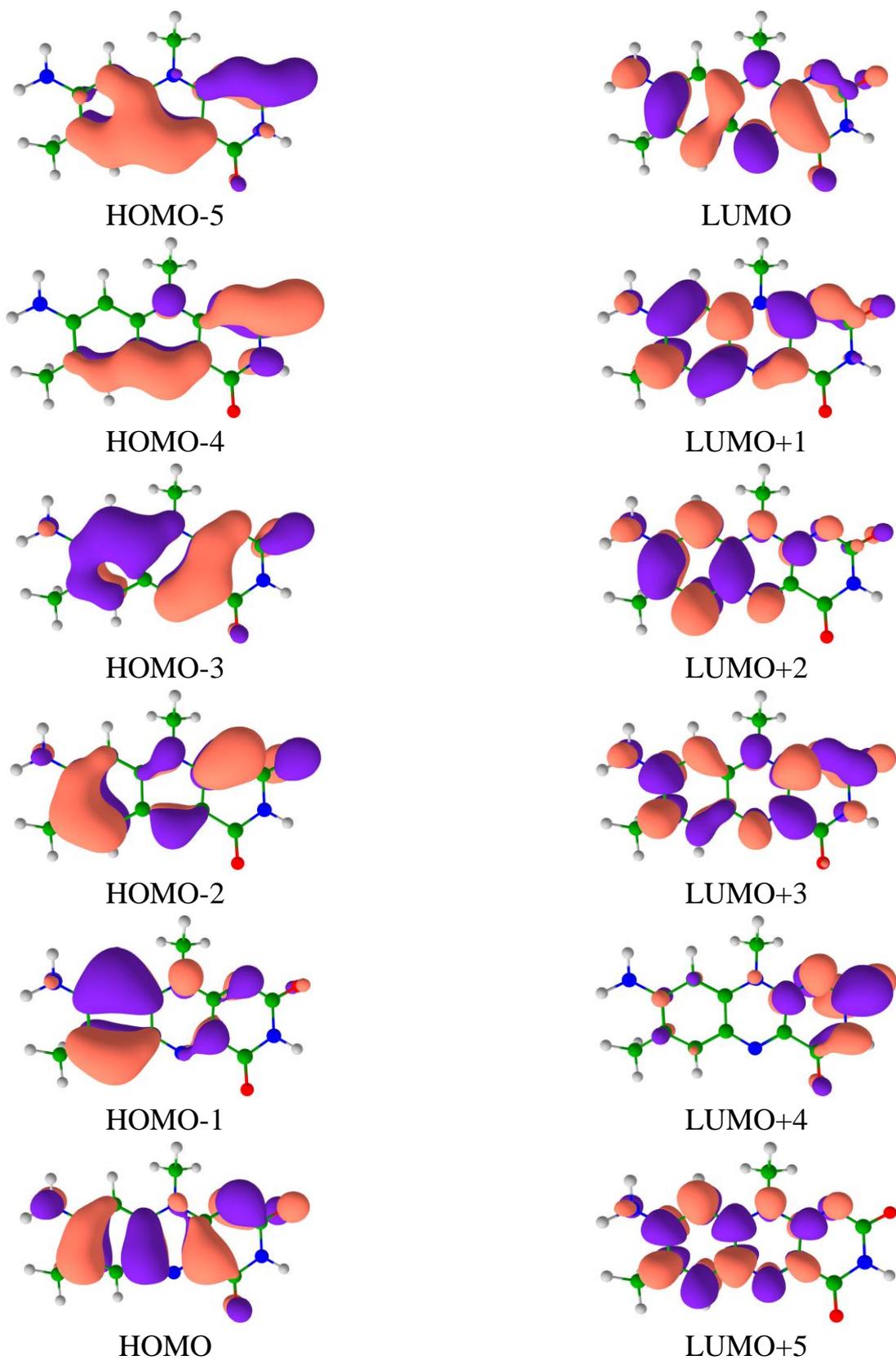


Рисунок Б11. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-aK489ss

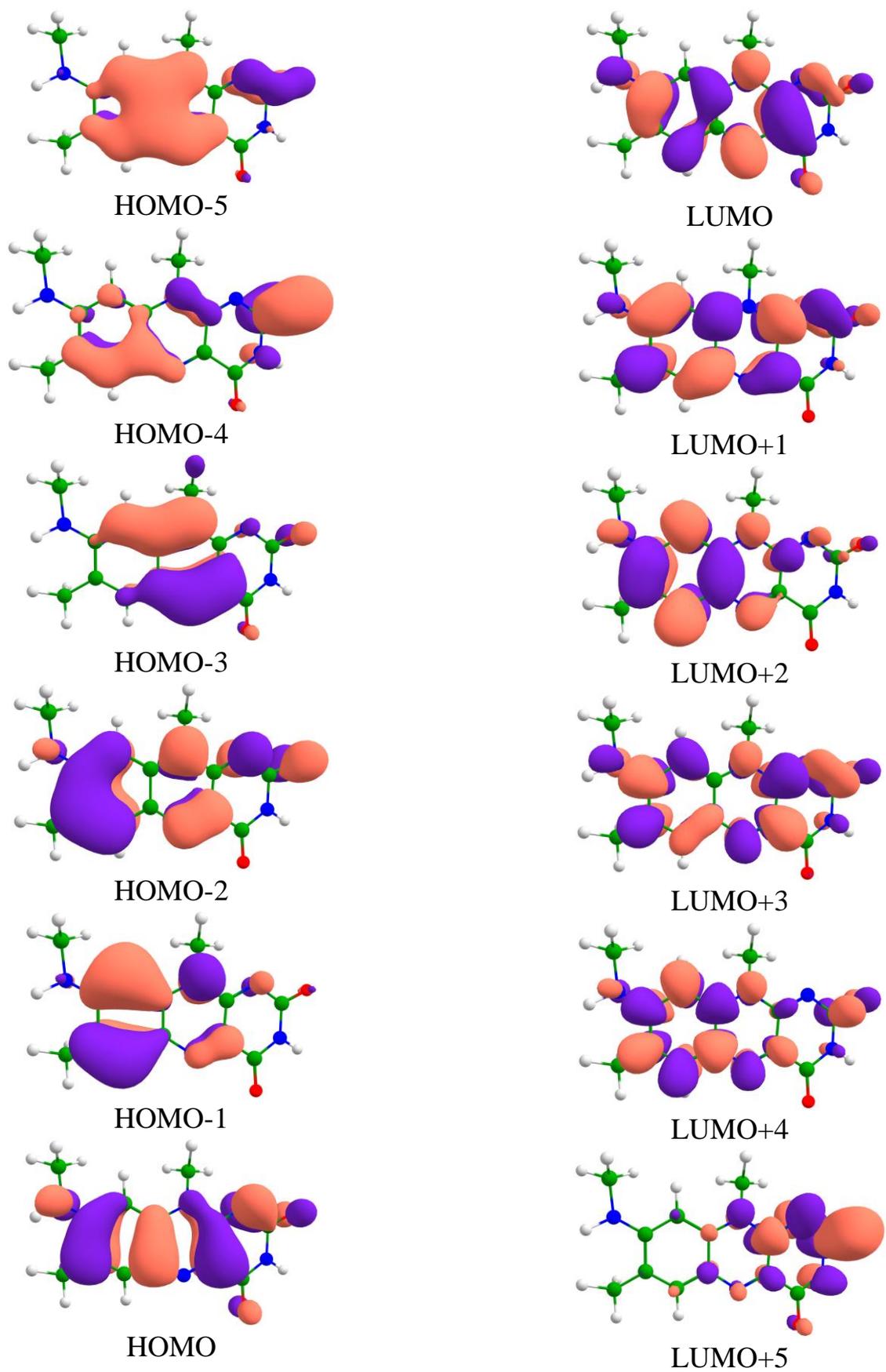


Рисунок Б12. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-m

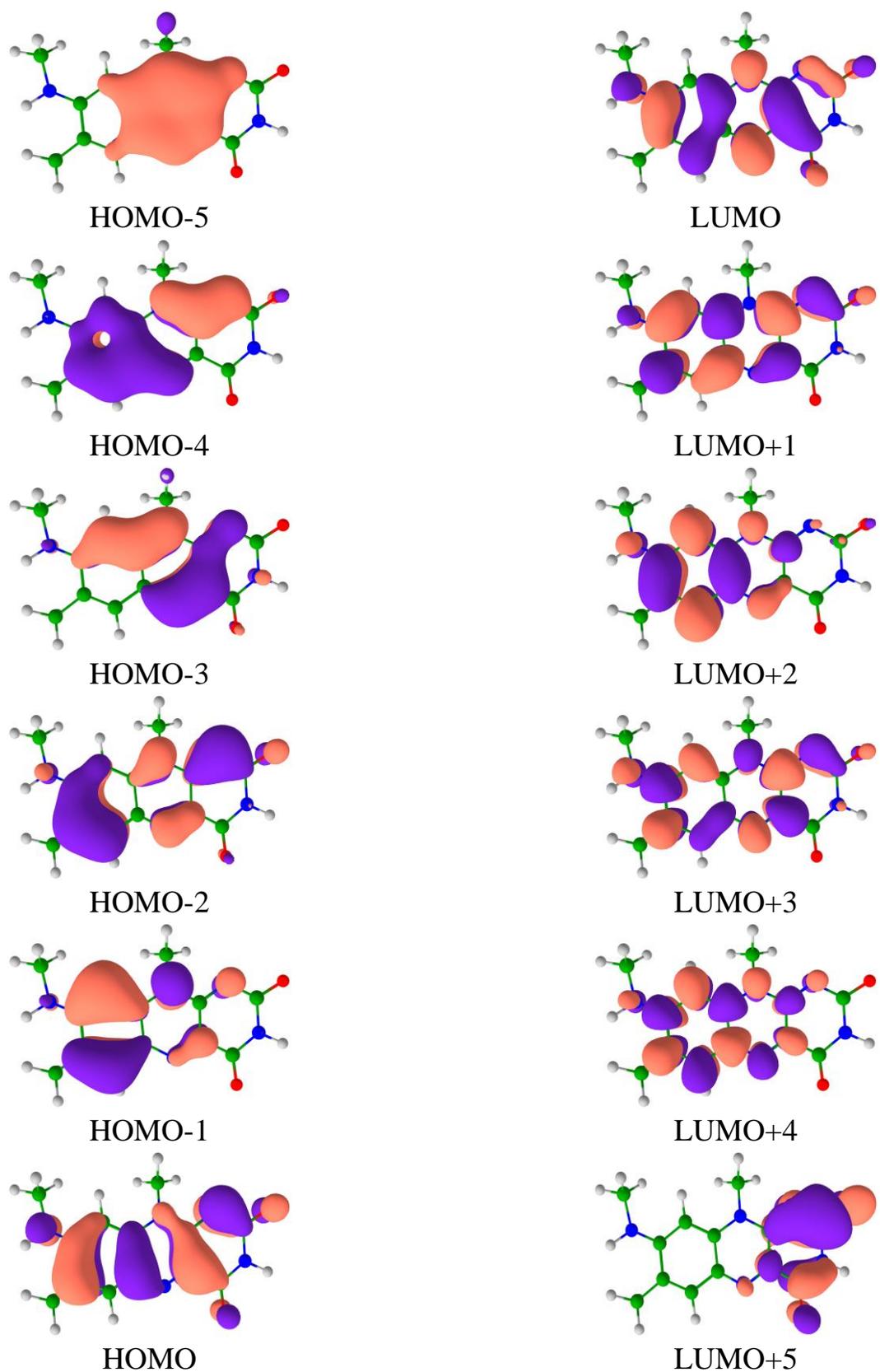


Рисунок Б13. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-mK392

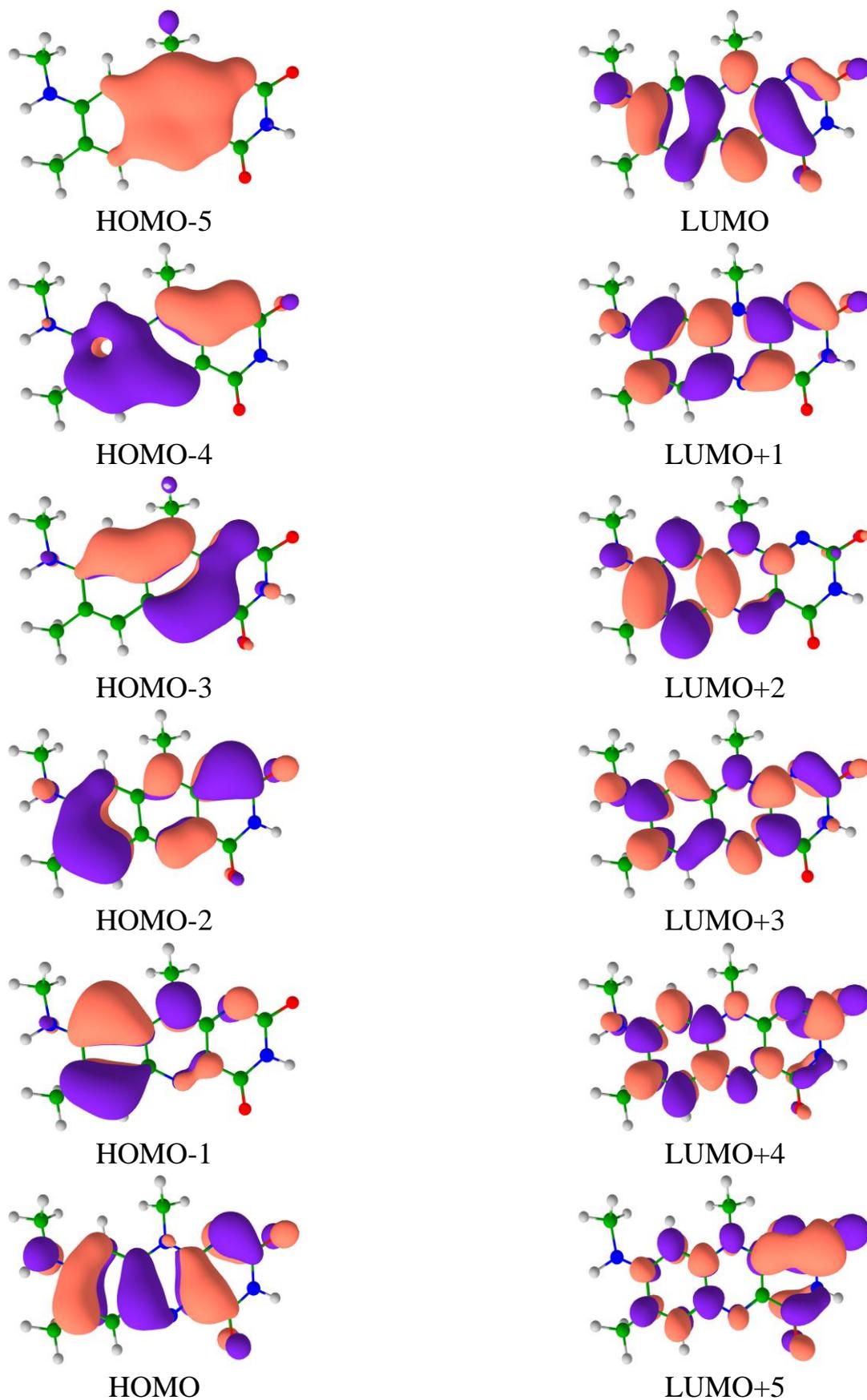


Рисунок Б14. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-mK489t

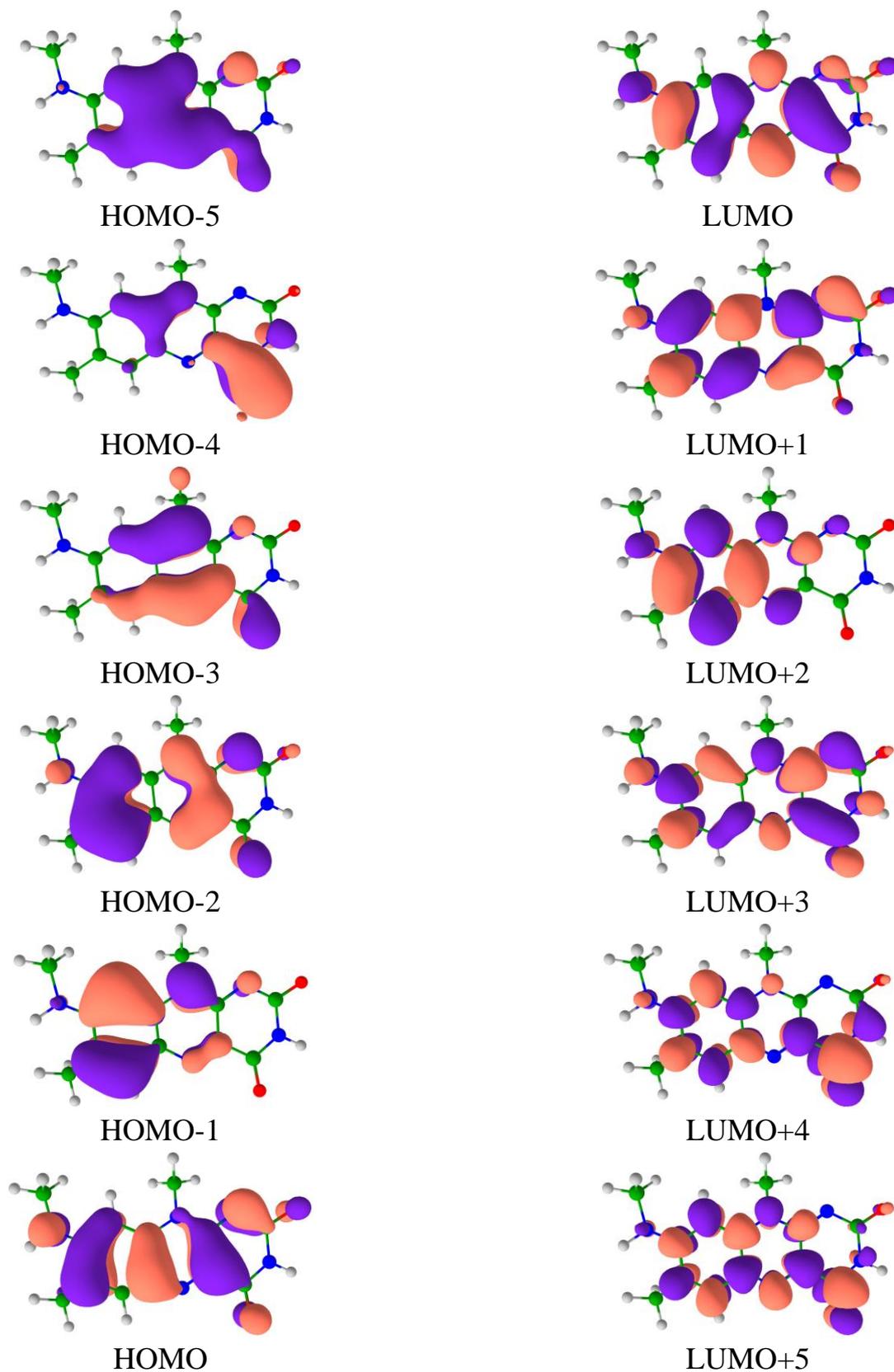
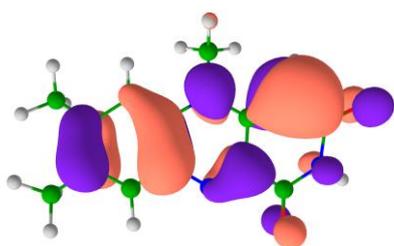
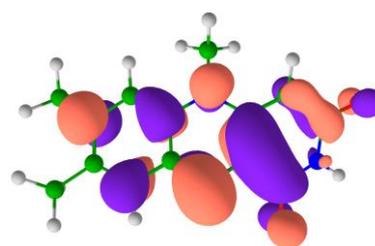


Рисунок Б15. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-mK489ss

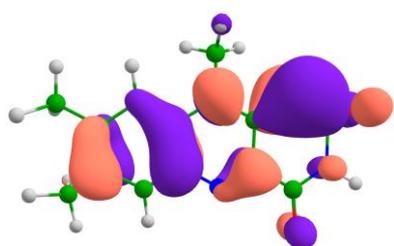


HOMO

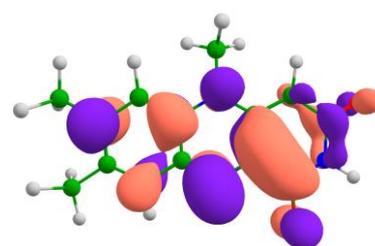


LUMO

Рисунок Б16. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-d

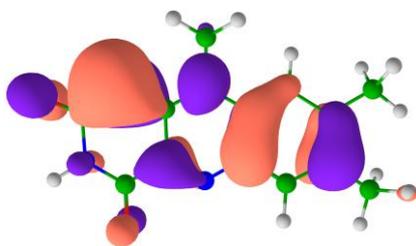


HOMO

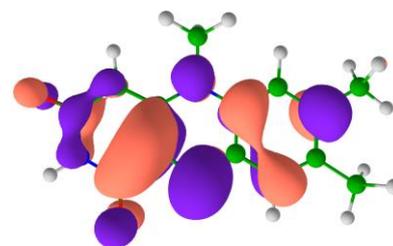


LUMO

Рисунок Б17. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-dK392



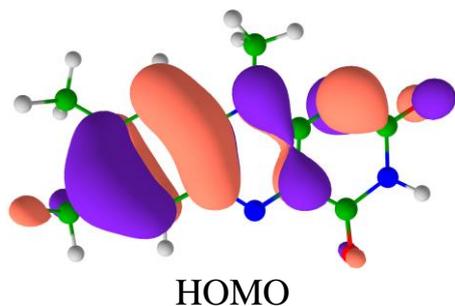
HOMO



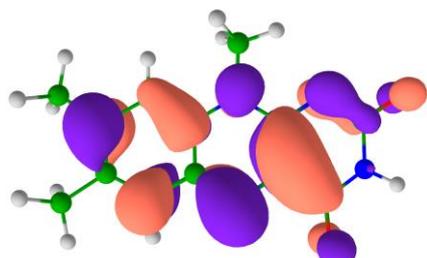
LUMO

Рисунок Б18. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(12/12) для iLOV-dK489tt

Приложение В

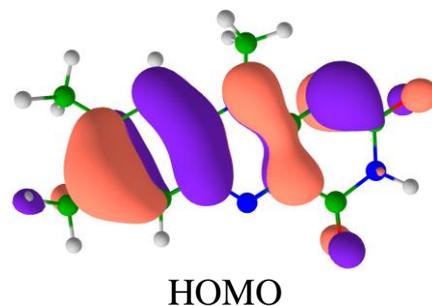


HOMO

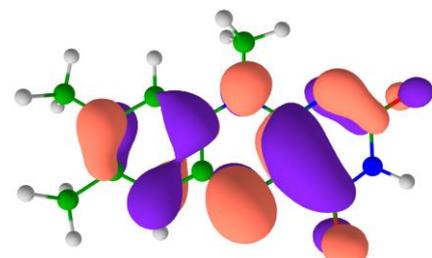


LUMO

Рисунок В1. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(2/2) для iLOV_{in}

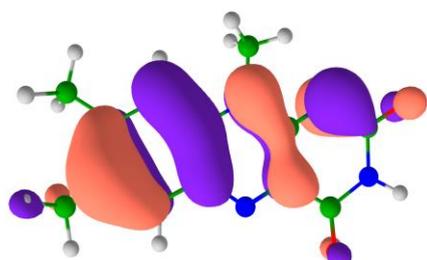


HOMO

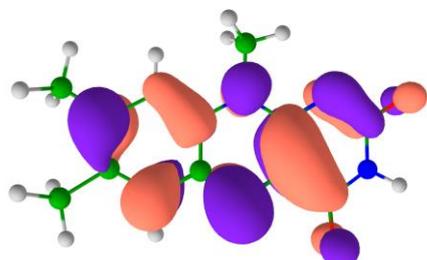


LUMO

Рисунок В3. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(2/2) для iLOV-Q489K

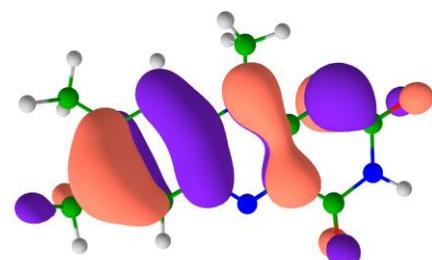


HOMO

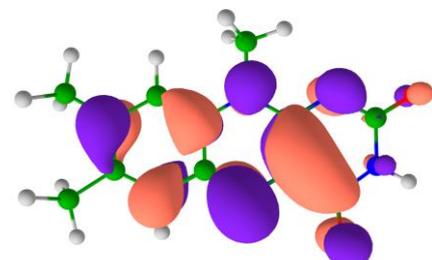


LUMO

Рисунок В2. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(2/2) для iLOV_{out}

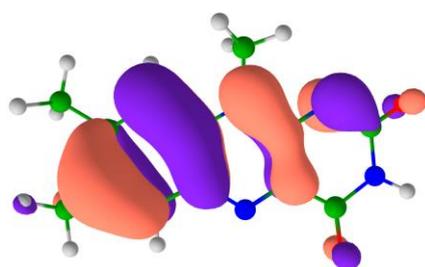


HOMO

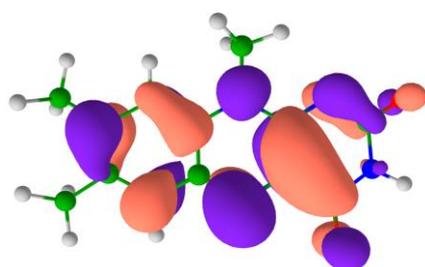


LUMO

Рисунок В4. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(2/2) для iLOV-K489a1

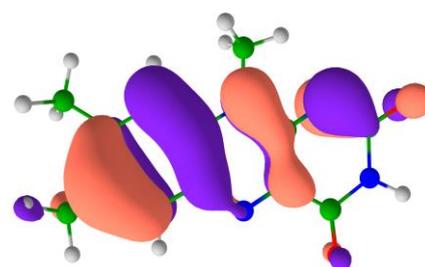


HOMO

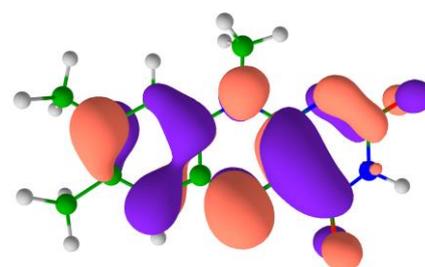


LUMO

Рисунок В5. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(2/2) для iLOV-K489a2

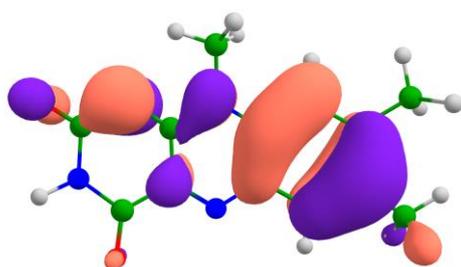


HOMO

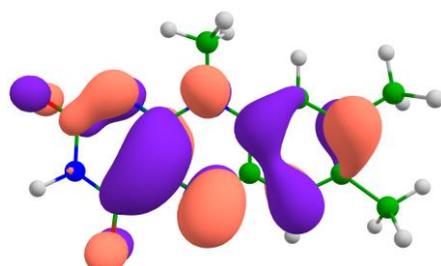


LUMO

Рисунок В7. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(2/2) для iLOV-K489t

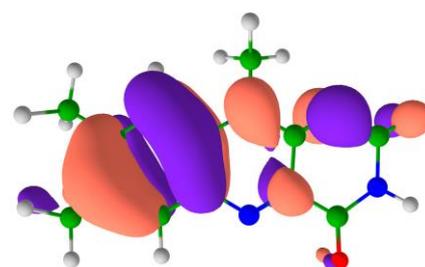


HOMO

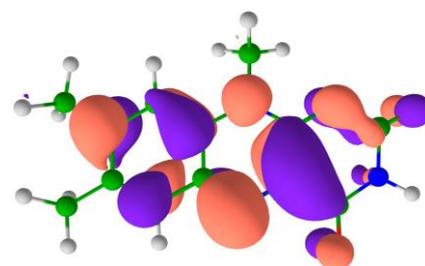


LUMO

Рисунок В6. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(2/2) для iLOV-K489a3

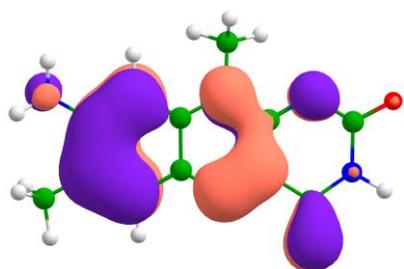


HOMO

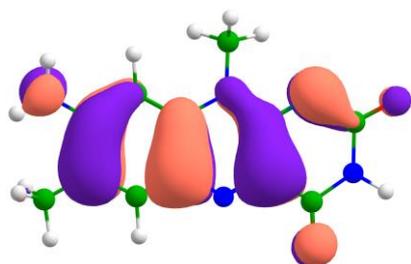


LUMO

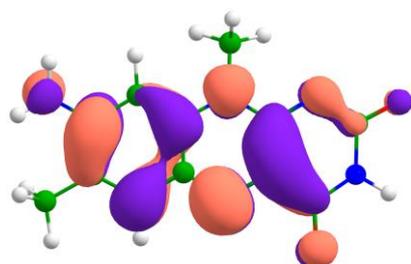
Рисунок В8. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(2/2) для iLOV-K392



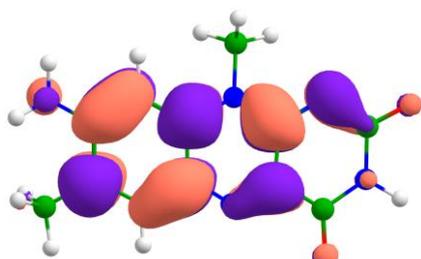
HOMO -1



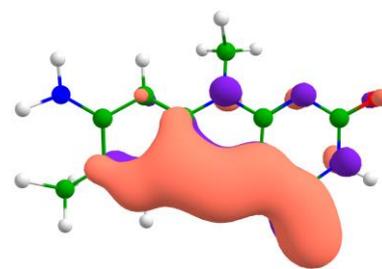
HOMO



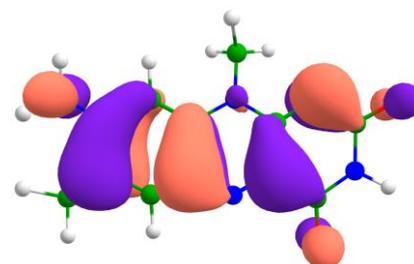
LUMO



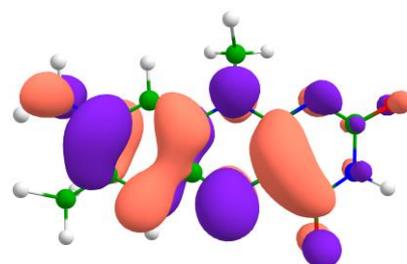
LUMO + 1



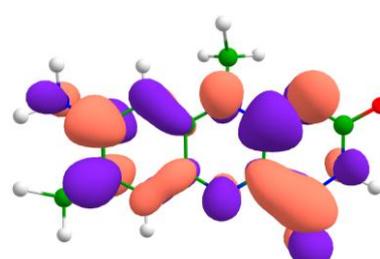
HOMO-1



HOMO



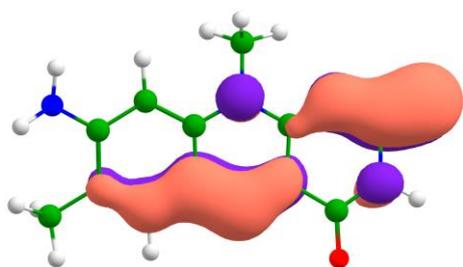
LUMO



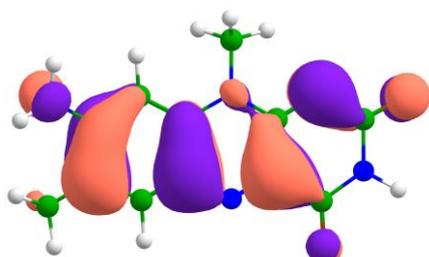
LUMO+1

Рисунок В9. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-a

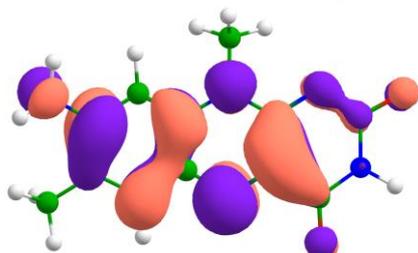
Рисунок В10. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-aK392



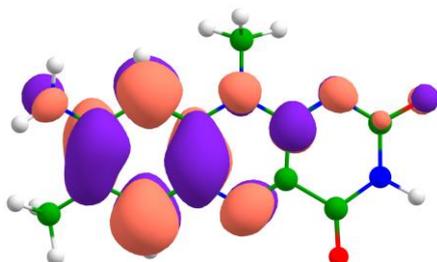
HOMO-1



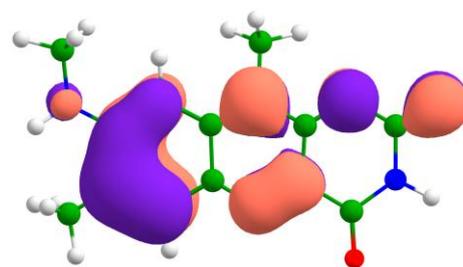
HOMO



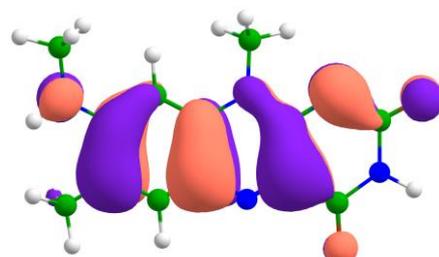
LUMO



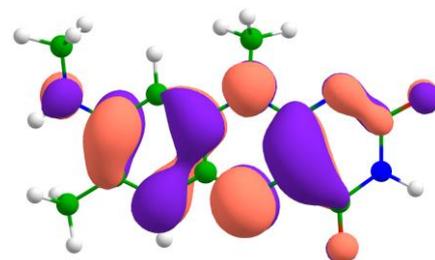
LUMO+1



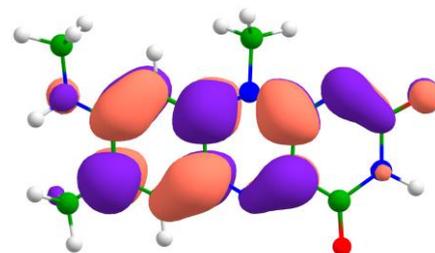
HOMO-1



HOMO



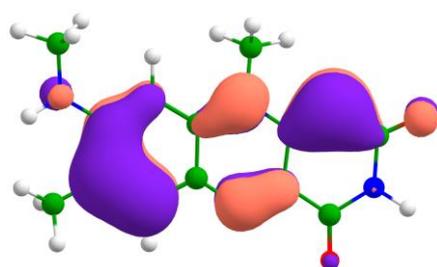
LUMO



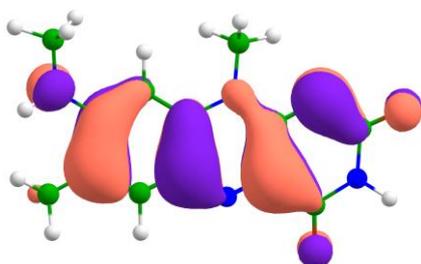
LUMO + 1

Рисунок В11. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-aK489ss

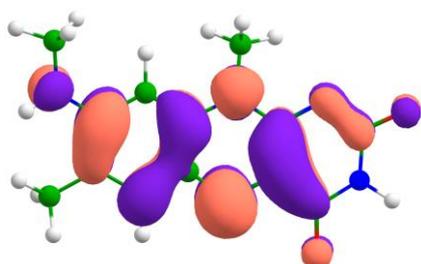
Рисунок В12. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-m



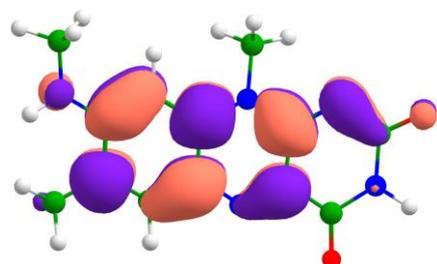
HOMO-1



HOMO

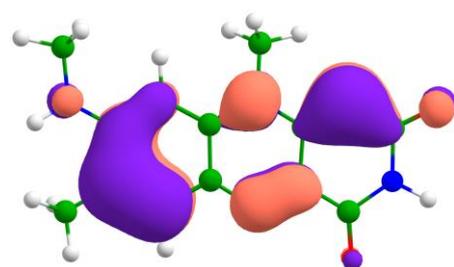


LUMO

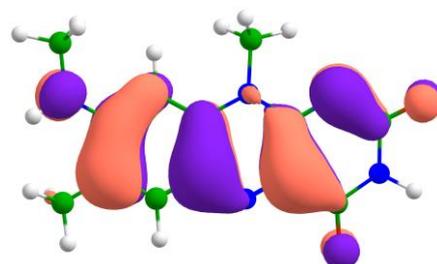


LUMO+1

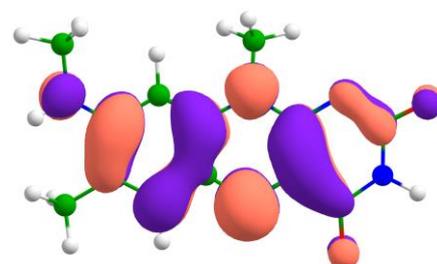
Рисунок В13. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-mK392



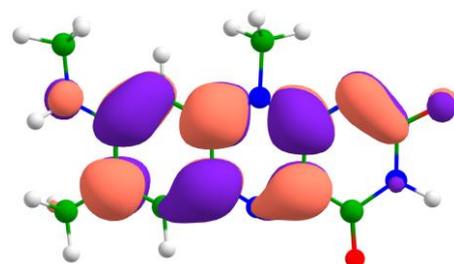
HOMO-1



HOMO



LUMO



LUMO+1

Рисунок В14. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-mK489t

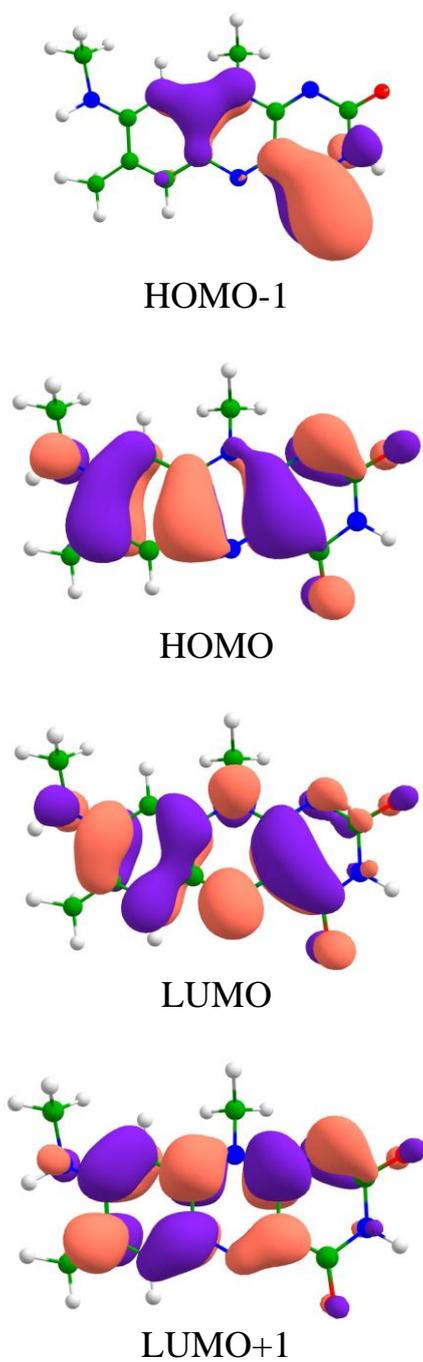


Рисунок В15. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-mK489ss

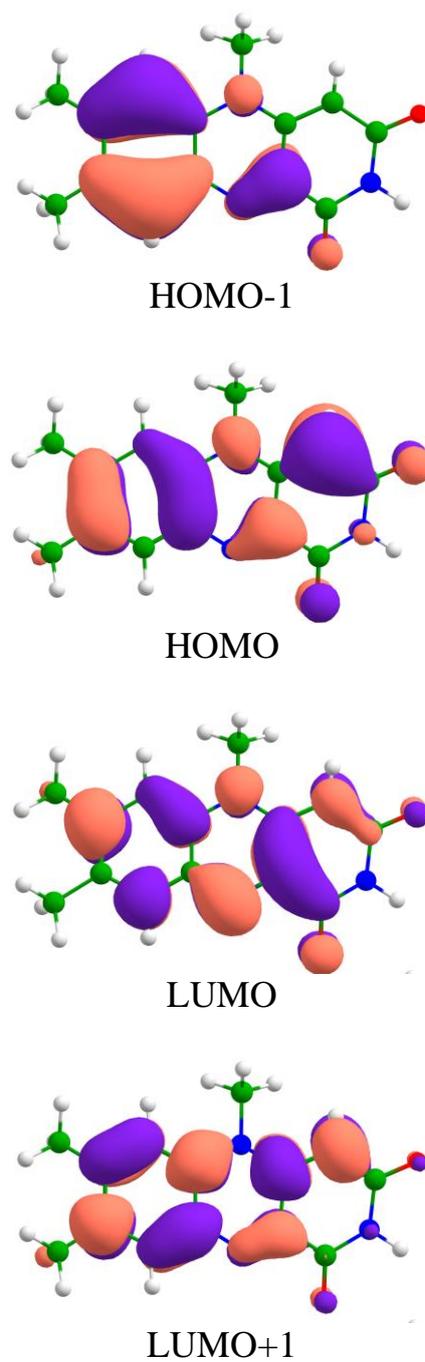
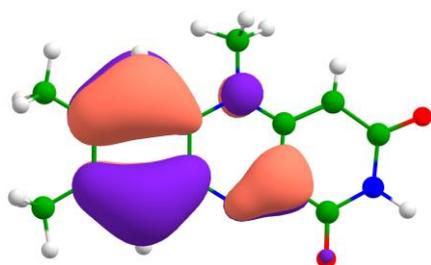
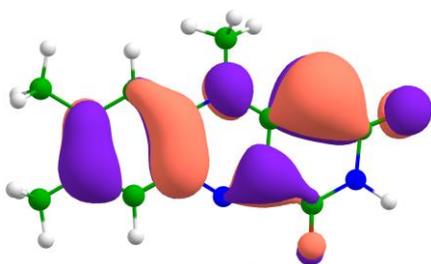


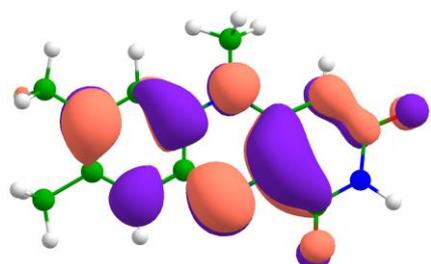
Рисунок В16. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-d



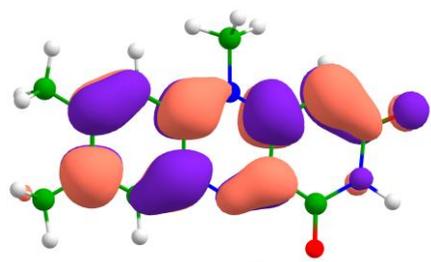
HOMO-1



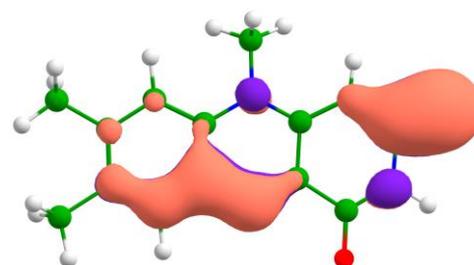
HOMO



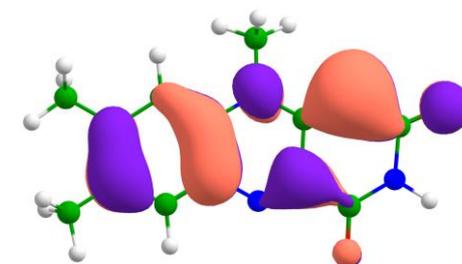
LUMO



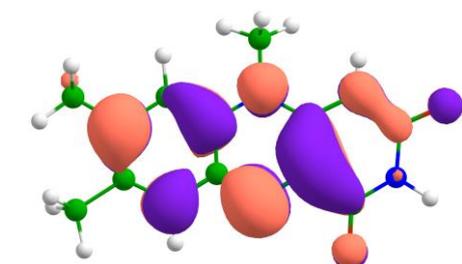
LUMO+1



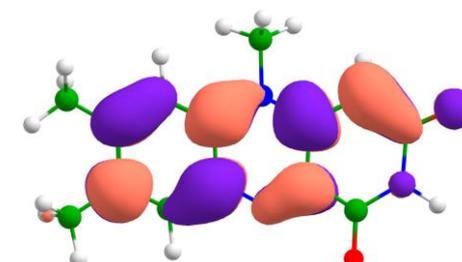
HOMO-1



HOMO



LUMO



LUMO+1

Рисунок В17. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-dK392

Рисунок В18. Выбор орбиталей в активное пространство CAS(4/4) для iLOV-dK489tt

Приложение Г

Таблица Г1. Максимумы полос поглощения в нм, рассчитанные различными методами.

Метод \ Система	XMCQDPT2/ CASSCF(12/12)/ cc-pvdz	TD-DFT/ ω B97X-D3/ cc-pvdz	TD-DFT/ B3LYP/ def2-SVP
iLOV _{in}	441	339	822
iLOV _{out}	439	335	608
iLOV-Q489K	437	336	591
iLOV-K489a1	455	409	1169