

УДК 577.332

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПОНЕНТОВ FRET-ПАР НА ОСНОВЕ ФЛАВИНСОДЕРЖАЩИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ И ИХ АНАЛОГОВ

© 2019 г. Ю. И. Метелешко<sup>1</sup>, А. В. Немухин<sup>1,2</sup>, М. Г. Хренова<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха при Федеральном исследовательском центре “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

\*E-mail: khrenova.maria@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2018;

после доработки 25.12.2018;

принята в печать 21.01.2019

Для флуоресцентных белков на основе iLOV с полосами поглощения и флуоресценции, смещенными в длинноволновую область, методами молекулярного моделирования определены фотофизические свойства, необходимые для рационального дизайна FRET-пар.

*Ключевые слова:* белок iLOV, FRET-пары, флаavin.

**DOI:** 10.1134/S0207401X19060074

### ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные белки на основе флавина становятся все более популярными маркерами для молекулярной биологии [1], а также являются перспективными объектами для использования в оптогенетике [2] и для дизайна FRET-пар (FRET – фёрстеровский резонансно-индуктивный перенос энергии). Они получены из LOV2-домена белка фототропина 2 растения *A. thaliana* введением специфической мутации С450А и последующим случайным мутагенезом [3, 4]. В результате были достигнуты улучшенные значения квантового выхода и фотостабильности. В частности, одним из наиболее перспективных вариантов оказался белок iLOV [3].

Известно, что все белки семейства LOV имеют близкие максимумы полос поглощения (около 450 нм) и флуоресценции (около 495 нм), обусловленными их хромофором – флавиномононуклеотидом. Эти значения находятся далеко от окна прозрачности (650–900 нм), в котором свет проникает через ткани млекопитающих, что затрудняет использование этих белков в живых организмах. Также эти белки невозможно использовать в многоцветной визуализации, для которой необходимо, чтобы максимумы полос флуоресценции были разнесены не менее чем на 50–60 нм. Поэтому расширение цветовой палитры и разработка новых вариантов флуоресцентных белков на основе флавина со спектрами флуоресценции, смещенными

в красную область, являются актуальными задачами.

В наших предыдущих работах [5–7] методы молекулярного моделирования использованы для исследования белковых систем с флавином и его производными, а также для систем с дополнительными точечными мутациями аминокислотных остатков в хромофорсодержащей области белка. В результате предложены варианты белка iLOV со смещенными в более длинноволновую область спектра полосами поглощения и флуоресценции. Для мутантных форм с флавиномонуклеотидом в качестве хромофора смещения рассчитанных энергий вертикальных переходов  $S_{0,max}-S_1$  (поглощение) (см. табл. 2 и 3 в [5]) и  $S_{1,min}-S_0$  (флуоресценция) составили соответственно до 50 и до 40 нм (см. табл. 2 и 3 в [5]), а для мутантных форм с аналогами флавина – от 50 до 160 нм и от 40 до 360 нм для энергий вертикальных переходов  $S_{0,min}-S_1$  и  $S_{1,min}-S_0$  (см. табл. 7 и 8 в [6]) соответственно.

Фёрстеровский резонансно-индуктивный перенос энергии происходит между двумя близко расположенными в пространстве хромофорами. Его эффективность зависит от индивидуальных фотофизических свойств хромофоров, а также от взаимной ориентации дипольных моментов перехода для флуоресценции донора и поглощения акцептора [8]. Для эффективного переноса энер-

гии необходимо, чтобы полоса флуоресценции донора значительно перекрывалась с полосой поглощения акцептора, а также важны высокий квантовый выход флуоресценции донора и большой коэффициент экстинкции акцептора. Взаимное расположение донора и акцептора определяется ориентационным фактором – величиной, принимающей значения от 0 до 4 в зависимости от взаимной ориентации дипольных моментов перехода для флуоресценции донора и поглощения акцептора.

Среди рассматриваемых систем наиболее перспективными для создания новых FRET-пар являются [6]: 1) iLOV с iLOV-K489t (Q489K/L470T) и iLOV с iLOV-K392 (V392K/F410V/A426S), содержащие флавиномононуклеотид в качестве хромофора; 2) iLOV-a с iLOV-aK392 (V392K/F410V/A426S/Q489A) и iLOV-a с iLOV-aK489ss (Q489K/L470S/G487S), содержащие 8-аминофлавин. Для этих пар рассчитанные энергии вертикального электронного перехода  $S_{1,min}-S_0$  донора близки к энергиям вертикального перехода  $S_{0,min}-S_1$  акцептора.

Цель данной работы – предоставление новых данных о флуоресцентных белках на основе флавина и его аналогов, которые необходимы для рационального дизайна FRET-пар, а также для разработки новых мутантов со спектрами поглощения и флуоресценции, смещенными в длинноволновую область.

## МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

Для исследуемых систем равновесные геометрические конфигурации, включающие белковую макромолекулу, хромофор и слой воды толщиной 5 Å, были рассчитаны в работах [5–7] комбинированным методом квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ) в варианте КМ (PBE0-D3/cc-pvdz)/ММ (AMBER) в программном пакете NWChem [9–12]. В качестве хромофоров рассматривались флавин, 8-аминофлавин, 8-метиламинофлавин и 1-дезафлавин. В квантовую часть входили изоаллоксазиновое кольцо хромофора и боковые цепи аминокислот, образующих водородные связи с хромофором, а для мутантных форм также боковая цепь лизина 392 или 489 и боковые цепи аминокислот и молекулы воды, образующие водородные связи с ним.

Дипольные моменты перехода рассчитаны методом ХМCQDPT2/CASSCF(12/12)/cc-pvdz [13] для систем с флавином, 8-аминофлавином и 8-метиламинофлавином и ХМCQDPT2/CASSCF(2/2)/cc-pvdz для систем с 1-дезафлавином в программном пакете Firefly QC [14], частично основанном на исходном коде GAMESS (US) [15]. Равновесные геометрические конфигурации молекуляр-

ных кластеров для расчетов были взяты из работ [5–7].

Атомные заряды рассчитывались по схеме Малликена для основного электронного состояния, волновые функции были получены в расчетах CASSCF(12/12)/cc-pvdz [13] для систем с флавином, 8-аминофлавином и 8-метиламинофлавином и CASSCF(2/2)/cc-pvdz для систем с 1-дезафлавином с усреднением по двум нижшим синглетным состояниям.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Дипольные моменты перехода*

В работе рассматривается 16 модельных систем: четыре из них не содержат точечных мутаций в белковой макромолекуле и различаются хромофорами, двенадцать – содержат точечные мутации и различные хромофоры. Все дипольные моменты переходов, рассчитанные для исследуемых систем, находятся в плоскости изоаллоксазинового кольца хромофора (рис. 1). Для систем серий iLOV-m с 8-метиламинофлавином в качестве хромофора и iLOV-d с 1-дезафлавином направление дипольных моментов переходов меняется незначительно при введении точечных мутаций в белковую макромолекулу. Для систем серий iLOV-a наблюдается большая вариативность – для мутантной формы iLOV-aK489ss направление дипольного момента перехода  $S_{0,min}-S_1$  сильно отличается от остальных систем. Возможно, это связано с окружением хромофора – набор мутаций для данной системы (V392K/F410V/A426S/Q489A) не повторяется полностью в системах с другими хромофорами и содержит мутацию в положении 489 на неполярную аминокислоту, в то время как в остальных моделях в позиции 489 находится полярная аминокислота. Для всех систем, кроме iLOV-aK489ss, направления дипольных моментов перехода лежат в промежутке между условно проведенными линиями, соединяющими атомы N3–N10 и N3–C7.

### *Заряды на атомах хромофора*

Для исследованных систем рассчитывались атомные заряды по Малликену и изучалась их зависимость от величины сдвига полос поглощения (табл. 1). Каждая мутантная форма содержит основную замену на лизин в положении 392 или 489, за счет которой и возникает красный сдвиг в спектрах поглощения и флуоресценции; образуются дополнительные водородные связи между атомами O4 или O4 и N5 хромофора и положительно заряженной аминокислотной группой лизина. Дополнительные компенсирующие замены аминокислот в хромофорсодержащей области предназначе-

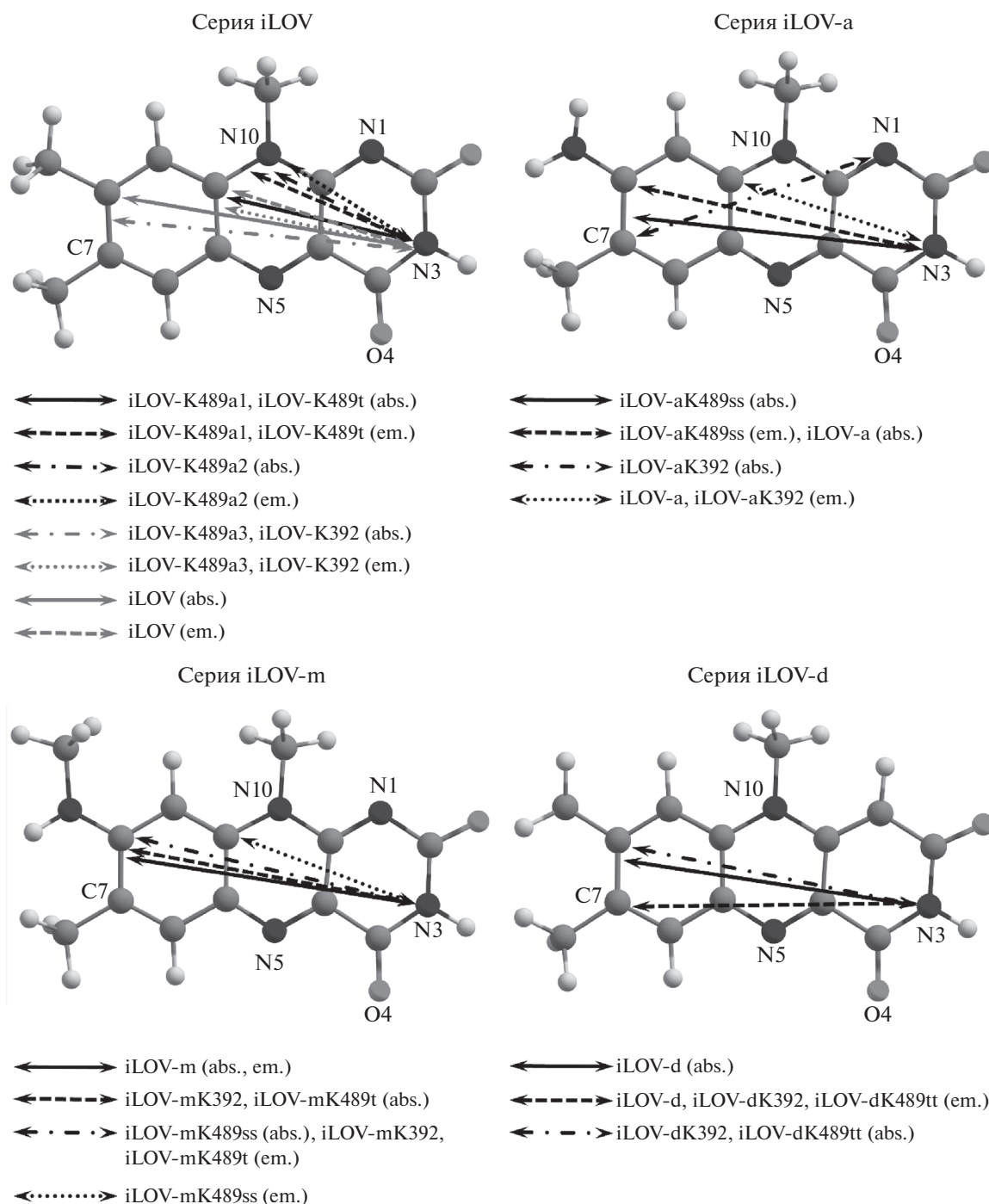
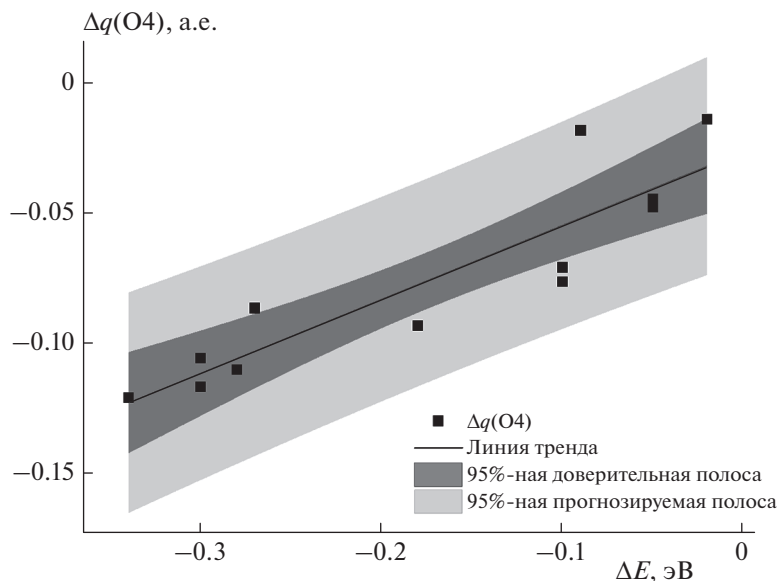


Рис. 1. Дипольные моменты переходов  $S_{0,min}-S_1$  (abs.) и  $S_{1,min}-S_0$  (em.) рассматриваемых систем.

ны для фиксации функциональной группы лизина вблизи хромофора. При возбуждении системы в первое синглетное возбужденное состояние наиболее значительные изменения электронной плотности происходят в области атомов O4, N5 и N1 [7]. При этом на атомах O4 и N5 электронная плотность увеличивается, а на атоме N1 – уменьшается. Эти атомы были выбраны для более детального

анализа. Нами не было обнаружено зависимостей между сдвигами энергий вертикальных переходов  $S_{0,min}-S_1$  и  $S_{1,min}-S_0$  переходов мутантных форм по отношению к флуоресцентным белкам с неизменной аминокислотной последовательностью ( $\Delta E_{abs}$ ) и изменениями зарядов на атомах. В основном электронном состоянии заряд на атоме N1 практически не изменяется при введении то-



**Рис. 2.** Зависимость изменения заряда  $\Delta q = 0.284\Delta E - 0.0265$  на атоме O4 хромофора в основном электронном состоянии в мутантных формах от величины сдвига энергии вертикального перехода  $S_{0,min}-S_1$  мутантных форм по отношению к флуоресцентным белкам с соответствующими хромофорами без мутаций;  $R^2 = 0.8113$ .

чечных мутаций в белок, что, по всей видимости, связано с отсутствием изменений локального окружения этого атома. Заряд на атоме N5 изменяется в более широком диапазоне значений, однако четкой зависимости со сдвигом энергии вертикального электронного перехода не просматривается. Вероятнее всего, это связано с тем, что в части структур присутствует водородная связь

атома азота с протонированной группой лизина, а в других – нет. Подтверждением этому является наличие закономерности между изменением заряда на атоме O4 и смещением энергии вертикального перехода  $S_{0,min}-S_1$ ; атом O4 во всех мутантных формах образует водородную связь с лизином (рис. 2). Эта зависимость является общей для зарядов на атоме O4 всех мутантных форм с

**Таблица 1.** Рассчитанные вертикальные энергии переходов  $S_{0,min}-S_1$  ( $E_{abs}$ ) [5–7] и атомные заряды по Малликену ( $q$ ) в основном электронном состоянии для исследованных систем

Система	$E_{abs}$ , эВ	$\Delta E_{abs}$ , 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

флавином или его аналогами. Полученная зависимость (рис. 2) является линейной и демонстрирует, что концентрация отрицательного заряда на атоме O4 приводит к уменьшению энергии вертикального перехода  $S_{0, min} - S_1$ .

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами молекулярного моделирования определены направления дипольных моментов переходов, соответствующих поглощению и флуоресценции белков на основе iLOV. Установлена зависимость между изменением значения заряда на атоме O4 хромофора в основном электронном состоянии и сдвигом вертикальной энергии перехода  $S_{0, min} - S_1$  в случае добавления точечных мутаций в белковую макромолекулу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским научным фондом (проект № 17-13-01051) с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Elgamoudi B.A., Ketley J.M.* // Res. Microbiol. 2018. V.169. P. 108.
2. *Losi A., Gardner K.H., Möglich A.* // Chem. Rev. 2018. V. 118. P. 10659.
3. *Chapman S., Faulkner C., Kaiserli E. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. V. 105. P. 20038.
4. *Christie J.M., Hitomi K., Arvai A.S. et al.* // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 22295.
5. *Khrenova M.G., Meteleshko Y.I., Nemukhin A.V.* // J. Phys. Chem. B. 2017. V. 121. P. 10018.
6. *Meteleshko Y.I., Nemukhin A.V., Khrenova M.G.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2018; <https://doi.org/10.1039/c8pp00361k>
7. *Khrenova M.G., Nemukhin A.V., Domratcheva T.* // J. Phys. Chem. B. 2015. V. 119. P. 5176.
8. *Lakowicz J.R.* Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. Berlin: Springer, 2006.
9. *Adamo C., Barone V.* // J. Chem. Phys. 1999. V. 110. P. 6158.
10. *Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H.* // Ibid. 2010. V. 132. P. 154104.
11. *Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I. et al.* // J. Amer. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 5179.
12. *Valiev M., Bylaska E.J., Govind N. et al.* // Comput. Phys. Comm. 2010. V. 181. P. 1477.
13. *Granovsky A.A.* // J. Chem. Phys. 2011. V. 134. P. 214113.
14. <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>
15. *Schmidt M.W., Baldridge K.K., Boatz J.A. et al.* // J. Comput. Chem. 1993. V. 14. P. 1347.