

## СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.322.9

### КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУР ОБРАТИМО ПЕРЕКЛЮЧАЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ С LOV-ДОМЕНАМИ

© 2021 г. Ю. И. Метелешко<sup>1</sup>, М. Г. Хренова<sup>1,2,\*</sup>, А. В. Немухин<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

\*E-mail: wasabiko@lcc.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 06.08.2020 г.

После доработки 14.09.2020 г.

Принята к публикации 16.09.2020 г.

Методами молекулярного моделирования впервые построены полноатомные трехмерные структуры новых обратимо переключаемых флавинодержущих белков с LOV-доменами (Light, Oxygen, Voltage), используемых в микроскопии сверхвысокого разрешения. Для вариантов белков rsLOV1 и rsLOV2 известны первичные последовательности, но не пространственные модели. При построении моделей rsLOV1 и rsLOV2 за основу взята структура PDB ID: 2MWG фоторецепторного белка YtvA из *Bacillus subtilis* и выполнены необходимые точечные замены аминокислотных остатков. Построенные модели заключены в водные оболочки, для которых выполнены расчеты молекулярно-динамических траекторий и проведен динамический сетевой анализ. Показано, что динамические свойства нативной и мутантных структур различаются прежде всего в отношении  $\alpha$ -спирали, ответственной за передачу сигнала при фотовозбуждении.

DOI: 10.31857/S0023476121050143

#### ВВЕДЕНИЕ

Интерес к флавинодержущим белкам с LOV-доменами (Light, Oxygen, Voltage) объясняется их применением в качестве флуоресцентных маркеров в живых системах, а в последнее время – в составе оптогенетических конструкций [1, 2]. По сравнению с известными маркерами семейства зеленого флуоресцентного белка флуоресцентные белки на основе LOV-доменов обладают рядом преимуществ: небольшой размер, применимость в анаэробных условиях, возможность применения в широком диапазоне pH (от 4 до 11) [3]. В качестве хромофора большинство LOV-доменов связывает флавиномононуклеотид, широко распространенный в клетках.

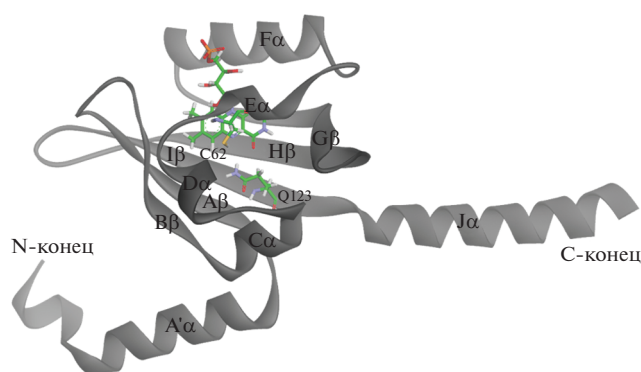
Фотопереключение белков с LOV-доменом основано на реакциях образования и разрыва ковалентной связи между атомом серы консервативного аминокислотного остатка цистеина и C4a-атомом флавина. В активном, флуоресцентном состоянии “ON” связи между цистеином и флавином нет, но при освещении синим цветом (488 нм) формируется связь (Cys)S–C4a, и белок переходит в нефлуоресцентное состояние “OFF”. В природных объектах образование ковалентно-связанного аддукта запускает ряд структурных

изменений белка, при которых сигнал передается белку-эффектору. При освещении УФ-светом (408 нм) аддукт распадается, и восстанавливается состояние “ON”.

Первые попытки создать обратимо фотопереключаемый маркер были предприняты для белка YtvA-LOV из *Bacillus subtilis* [4]. Однако слабая флуоресценция и низкая эффективность переключения во флуоресцентное состояние под действием УФ-света не способствовали практическому применению природного белка. В [5] были получены новые варианты обратимо фотопереключаемых белков, названных rsLOV1 и rsLOV2, демонстрирующие повышенную яркость и улучшенную кинетику переключения. Данные белки были синтезированы олигонуклеотид-направленным мутагенезом на основе YtvA-LOV.

В отличие от исходного природного белка YtvA-LOV, для которого известна пространственная структура (рис. 1), для rsLOV1 и rsLOV2 ранее была известна только первичная последовательность. Знание пространственной структуры необходимо для анализа путей передачи сигнала при фотиндуцированном возбуждении.

Для решения задачи построения трехмерных полноатомных структур rsLOV1 и rsLOV2 в данной работе использованы современные методы



**Рис. 1.** Структура домена YtvA-LOV, построенная на основе PDB ID: 2MWG. Стержневой моделью показаны хромофор и аминокислотные остатки Cys62 и Gln123.

молекулярного моделирования. Анализ литературы показывает, что подобные подходы могут оказаться успешными при изучении структурных изменений, происходящих в LOV-доменах [6].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полноатомные молекулярные модели rsLOV1 и rsLOV2, мутантов YtvA-LOV, получены на основе известной структуры YtvA *Bacillus subtilis* (PDB ID: 2MWG). Модели построены с тем же количеством аминокислотных остатков, что и в [5]: 1-146 для YtvA-LOV и 1-142 для rsLOV1 и rsLOV2. Для получения структур rsLOV1 и rsLOV2 проведены точечные замены в соответствии с известными первичными последовательностями (рис. 2).

Боковые цепи аминокислот лизина и аргинина предполагались положительно заряженными, глутаминовой и аспарагиновой кислот – отрицательно заряженными. Модельные системы были сольватированы в водных оболочках размером  $94 \times 74 \times 76 \text{ \AA}^3$  для YtvA-LOV и  $91 \times 74 \times 76 \text{ \AA}^3$  для rsLOV1 и rsLOV2. Для нейтрализации зарядов систем были добавлены ионы натрия и хлора таким

образом, чтобы ионная сила раствора составляла 0.15 М.

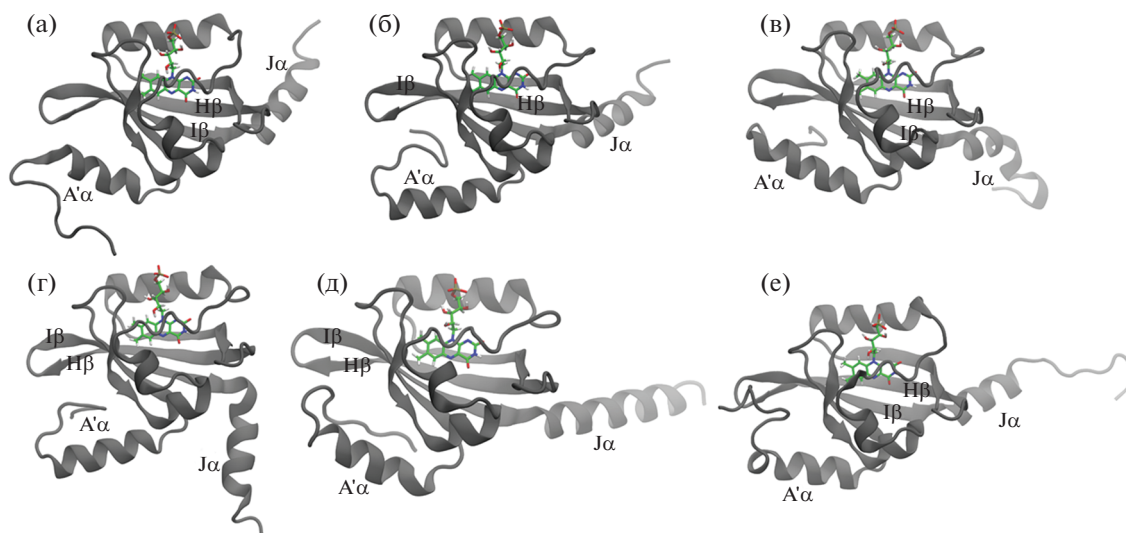
Молекулярно-динамические (МД) расчеты проводили с использованием программного пакета NAMD [7]. Для каждой системы рассчитано по три МД-траектории длительностью 100 нс (шаг интегрирования 1 фс). Динамику Ланжевена использовали для сохранения температуры 300 К и давления 1 атм в NPT-ансамбле. Для электростатических взаимодействий использовали алгоритм PME [8]. Энергии и силы вычисляли с силовым полем CHARMM36 [9] для белковой макромолекулы, TIP3P для молекул воды [10]. Для хромофора использовали параметры и типы атомов CGenFF [11], оптимизированные в [12]. Сетевой динамический анализ выполняли с использованием программ VMD [13] и Carma [14, 15].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

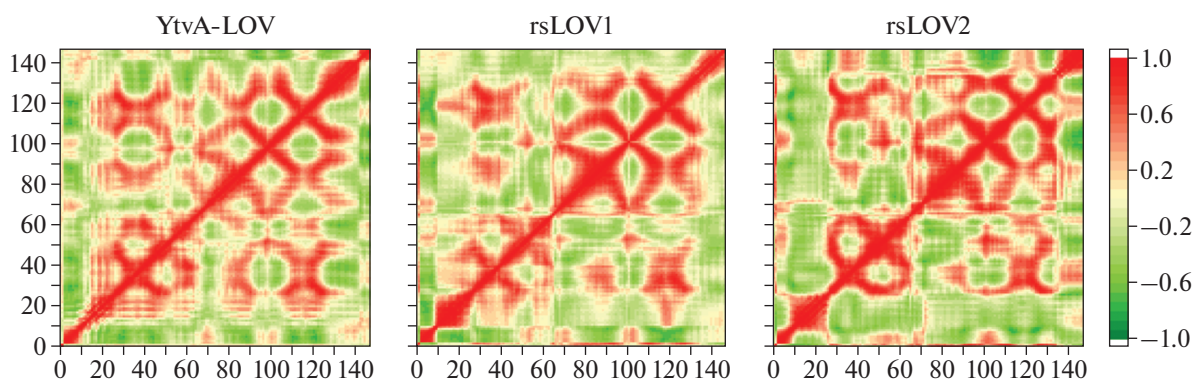
Анализ полученных МД-траекторий показывает, что самое активное движение наблюдается для A'α- и Jα-спиралей (рис. 1), на рис. 3 представлены все варианты их положения. Как видно из рисунка, A'α-спираль либо контактирует с петлей Hβ-Iβ (при этом N-концевая часть находится или под спиралью (рис. 3а), или за ней (рис. 3в)), либо находится ниже N-концевой части белка (рис. 3б, 3г, 3е). Последние два завитка Jα-спирали обладают повышенной подвижностью, причем в некоторых траекториях они стремятся потерять свою структуру (рис. 3в), а в одной траектории, для YtvA-LOV, половина Jα-спирали полностью развернулась (рис. 3е). Для rsLOV2 также наблюдалось необычное движение A'α- и Jα-спиралей навстречу друг другу (на рис. 3г показано их максимальное сближение), после чего они вернулись в обычные позиции. Отметим, что для YtvA-LOV во всех траекториях A'α-спираль располагается ниже N-концевой части белка (рис. 3д, 3е).

YtvA-LOV	1	M A S F Q S F G I P G Q L E V I K K A L D H I R V G V V I T D P A L E D N P I V Y V N Q G F V Q M T
rsLOV1	1	M T R F Q S F G I S G Q L E V I K K A L D H I R V G V V I T D P A R E D N P I V Y V N Q G F V Q M T
rsLOV2	1	M T R F Q S F G I S G Q L E V I K K A L D H I R V G V V I T D P A R E D N P V Y V N N G F V Q M T
YtvA-LOV	51	G Y E T E E I L G K N C R F L Q G K H T D P A E V D N I R T A L Q N K E P V T V Q I I N Y K K D G T
rsLOV1	51	G Y E A E E I L G K N C R I L Q G E H T D P A E V D I I R T A L Q N K E P V T V Q I I L N Y R K D G T
rsLOV2	51	G Y E A E E I L G K S C R I L Q G E H T D P A E V D I I R T A L Q N K E P V T V Q I I L N Y R K D G T
YtvA-LOV	101	M F W N E L N I D P M E I E D K T Y F V G I Q N D I T K Q K E Y E K L L E D S L T E I T A L
rsLOV1	101	M F W N L L H I V P I V I E G K T Y F V G N Q N D I T K Q K E Y E K L L E R P H R G ----
rsLOV2	101	M F W N L L H I V P I V I E G K T Y F V G N Q N D I T K Q K E Y E K L L E R P H R G ----

**Рис. 2.** Выравненные аминокислотные последовательности YtvA-LOV, rsLOV1 и rsLOV2. Цветом выделены различия.



**Рис. 3.** Характерные конфигурации из молекулярно-динамических траекторий: а, б, г – rsLOV2, в – rsLOV1, д, е – YtvA-LOV.



**Рис. 4.** Дисперсионно-ковариационные матрицы. По осям отложены номера узлов сети. Узлы 0 и 1 отвечают флавинову (изоалоксазиновому кольцу и рибитиловому хвосту соответственно), узлы от 2 до 148 соответствуют аминокислотам 1–146.

Дополнительную информацию о сходстве и различии структур исследуемых систем предоставляет сетевой динамический анализ. На рис. 4 представлены дисперсионно-ковариационные матрицы. Области, отвечающие скоррелированному движению аминокислотных остатков, отмечены более темными цветами; у rsLOV1 и rsLOV2 они шире, чем у YtvA-LOV. Существенное отличие наблюдается 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).

Для исследуемых систем также рассмотрены изменения, происходящие в хромофорсодержащем кармане. Самой подвижной боковой цепью в этой области обладает остаток Gln123 (рис. 1). Известно, что аналогичный остаток глутамин сохраняется во всех LOV-доменах и играет важную роль в передаче сигнала [6]. Чтобы проиллюстрировать поведение боковой цепи Gln123, были

рассмотрены такие параметры, как двугранный угол NE2–CD–CG–CB и расстояние между атомом NE2 глутамин и N5 флавина (рис. 5). Из графиков видно, что для природного белка YtvA-LOV характерны расстояния от 4 до 5.5 Å и величины угла от 10° до 70° (рис. 6а). Для белков rsLOV1 и rsLOV2 наблюдается большая заселенность состояний в области около 3–3.5 Å и от 150° до –120° (рис. 6б). Также для rsLOV2 наблюдается слабо заселенное состояние с расстояниями больше 6 Å (рис. 6в), где боковая цепь Gln123 направлена в сторону Jα-спирали.

Для численного сравнения подвижности боковой цепи глутамин для каждой системы была подсчитана доля кадров в МД-траекториях, в которых расстояние NE–N5 не превышало 3.5 Å: 2.6% для YtvA-LOV, 15.9% для rsLOV1 и 13.7% для rsLOV2.

Таким образом, впервые исследованы структуры новых обратимо переключаемых белков

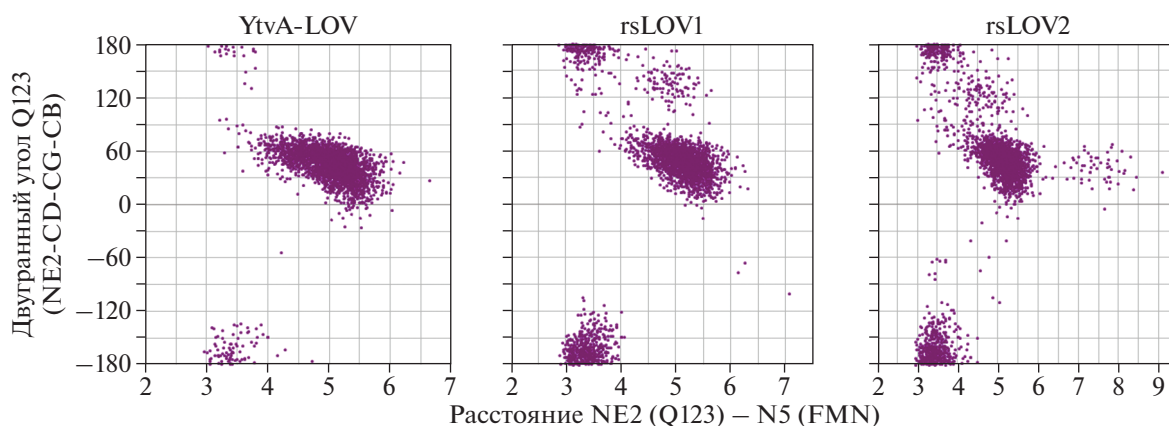


Рис. 5. Графики зависимости расстояния NE2–N5 (Å) от угла NE2–CD–CG–CB для Gln123.

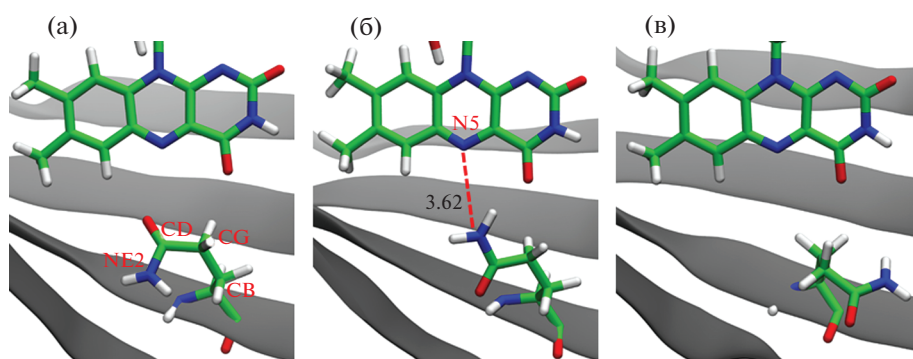


Рис. 6. Конформеры Gln123 с разной величиной угла NE2–CD–CG–CB: а – 50°, б – 160°, в – 50°.

rsLOV1 и rsLOV2 и проведено их сравнение со структурой YtvA-LOV. Выявлены отличия в поведении Gln123, находящегося в хромофорсвязывающем кармане. В белках rsLOV1 и rsLOV2 боковая цепь Gln123 обладает большей подвижностью и гибкостью, чем в YtvA-LOV.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-13-01051) с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shcherbakova D.M., Shemetov A.A., Kaberniuk A.A. et al. // *Annu. Rev. Biochem.* 2015. V. 84. P. 519. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034411>
2. Losi A., Gardner K.H., Möglich A. // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. P. 10659. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00163>
3. Mukherjee A., Walker J., Weyant K.B. et al. // *PLoS ONE.* 2013. V. 8. P. e64753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064753>
4. Losi A., Gärtner W., Raffelberg S. et al. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2013. V. 12. P. 231. <https://doi.org/10.1039/C2PP25254F>
5. Gregor C., Sidenstein S.C., Andresen M. et al. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19947-1>
6. Freddolino P.L., Gardner K.H., Schulten K. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2013. V. 12. P. 1158. <https://doi.org/10.1039/c3pp25400c>
7. Phillips J.C., Braun R., Wang W. et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. P. 1781. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
8. Darden T., York D., Pedersen L. // *J. Chem. Phys.* 1993. V. 98. P. 10089. <https://doi.org/10.1063/1.464397>
9. Best R.B., Zhu X., Shim J. et al. // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. V. 8. P. 3257. <https://doi.org/10.1021/ct300400x>
10. Jorgensen W.L., Madura J.D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1983. V. 105. P. 1407. <https://doi.org/10.1021/ja00344a001>
11. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C. et al. // *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. P. 671. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>
12. Khrenova M.G., Meteleshko Y.I., Nemukhin A.V. // *J. Phys. Chem. B.* 2017. V. 121. P. 10018. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b07533>
13. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. P. 33. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
14. Glykos N.M. // *J. Comput. Chem.* 2006. V. 27. P. 1765. <https://doi.org/10.1002/jcc.20482>
15. Koukos P.I., Glykos N.M. // *J. Comput. Chem.* 2013. V. 34. P. 2310. <https://doi.org/10.1002/jcc.23381>