



УДК 577.112.6

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ОРАНЖЕВО-КРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БИОМАРКЕРА DiB3-F53L

© 2025 г. А. В. Россохин*, **, #, И. В. Артемьев*, С. Ф. Архипова*,
В. З. Плетнев*, Н. В. Плетнева*

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Научный центр неврологии, Институт мозга, Россия, 105064 Москва, пер. Обуха, 5

Поступила в редакцию 14.04.2025 г.

После доработки 26.04.2025 г.

Принята к публикации 27.04.2025 г.

Расчетным методом молекулярной динамики (МД) изучена пространственная организация флуоресцентного белка DiB3-F53L – оранжево-красного флуоресцентного нековалентного комплекса генно-инженерного варианта бактериального белка липокалина B1c в комплексе с синтетическим GFP-подобным хромофором M739. Показано, что хромофор сильнее взаимодействует с мутированным белком DiB3-F53L по сравнению с нативным белком DiB3. Расчеты позволили установить аминокислотные остатки из окружения хромофора в сайте связывания, вносящие наибольший вклад в энергию взаимодействия хромофор–белок. Комплекс белка DiB3-F53L с хромофором M739 обладает повышенной яркостью флуоресценции по отношению к известному родительскому биомаркеру DiB3, что выдвигает его в число перспективных маркеров для мечения биологических объектов в клеточной биологии, а также в качестве стартового объекта для последующего дизайна новых более ярких биологических маркеров.

Ключевые слова: хромофор, флуороген-активирующий белок, молекулярная динамика

DOI: 10.7868/S1998286025060071

ВВЕДЕНИЕ

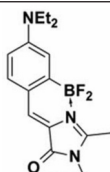
Природные липокалины представляют собой семейство небольших белков, встречающихся в различных биологических системах [1]. Они имеют общую β -структурную укладку и обладают способностью к комплексообразованию малых молекул для различных физиологических целей. Охарактеризована серия различных изотипов липокалина с разной специфичностью к лиганду и физиологической функцией. Биомаркеры группы DiB1-3 – первые примеры использования бактериального липокалина B1c для создания новых флуоресцентных биомаркеров на основе нековалентных комплексов генно-инженерных ва-

риантов B1c (в качестве флуороген-активирующего белка, ~20 кДа) с синтетическим GFP-подобным хромофором M739 (табл. 1) [2–5]. Длина волны эмиссии DiB3-F53L располагается в оранжево-красной области спектра. Флуороген M739 демонстрирует быстрое проникновение в клетку и обратимое мечение, что позволяет легко настраивать плотность мечения в живых клетках. Это значительно упрощает окрашивание клеток, позволяя проводить более сложные эксперименты. В одном эксперименте можно комбинировать различные системы мечения с временным разделением на основе флуорогена.

Сокращения: МД – молекулярная динамика; DiB3-F53L – оранжево-красный флуоресцентный нековалентный комплекс рекомбинантного липокалина B1c с синтетическим GFP-подобным хромофором M739.

Автор для связи: (тел.: +8 (916) 488-69-29; эл. почта: alrossokhin@yandex.ru).

Таблица 1. Фотофизические характеристики биомаркеров [3]

Характеристики	DiB3-F53L [3]	DiB3 [3]	M739
Квантовый выход QY	0.26	0.16	
1	546	546	
1	562	565	

Липокалин B1c, использованный для связывания различных малых молекул, оказался многообещающим каркасом для создания систем маркировки на основе флуорогена. Полученные комплексы демонстрируют яркую флуоресценцию и существенно более высокую фотостабильность, чем коммерческие биомаркеры mKate и EGFP, и представляют собой первые примеры дизайна новых флуоресцентных биомаркеров с использованием липокалина.

Целью данной работы было при помощи расчетных методов исследовать взаимодействие GFP-подобного хромофора M739 как с диким типом белка DiB3, так и с мутантом DiB3-F53L.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стартовая модель оранжево-красного белка DiB3-F53L для молекулярно-динамических (МД) расчетов получена с помощью программы молекулярной графики COOT [5] на основе рентгеновской пространственной структуры DiB1 [3] с предварительным введением соответствующих аминокислотных замен на стереографической станции. Данный комплекс обладает повышенной яркостью флуоресценции по отношению к родительскому биомаркеру DiB3, что выдвигает его в число перспективных маркеров для мечения биологических объектов в клеточной биологии, а также в качестве стартового объекта для последующего дизайна новых более ярких биологических маркеров.

Устойчивость пространственной структуры модели белка DiB3-F53L исследовали при помощи метода МД (см. раздел “Эксперим. часть”). На рис. 1а показано изменение величины RMSD белков DiB3 и DiB3-F53L в течение 10 нс МД. Хорошо видно, что кривые RMSD быстро выходят на насыщение, подтверждая, таким образом, устойчивость стартовых структур белков в водном растворителе. Средние значения RMSD для DiB3

и DiB3-F53L составили 1.135 ± 0.004 и 1.136 ± 0.0043 (здесь и далее среднее \pm стандартная ошибка среднего) соответственно.

Протяжку синтетического GFP-подобного хромофора M739 во внутренней полости белков DiB3 и DiB3-F53L осуществляли при помощи метода управляемой МД [12]. Для определения энергетического профиля M739 в связывающей полости нативного и мутированного белков мы провели пять независимых коротких симуляций длительностью 2 нс, отличающихся стартовыми скоростями атомов модели.

На рис. 1б показано изменение величин RMSD в течение 2 нс МД, управляемой DiB3 и DiB3-F53L при протяжке молекулы хромофора вглубь связывающей ниши белков. Средние значения RMSD для DiB3 и DiB3-F53L составили 0.911 ± 0.005 и 0.933 ± 0.007 соответственно. Таким образом, можно заключить, что протяжка молекулы M739 не влияет на конформацию нативного и мутированного белков.

На рис. 1в представлено изменение расстояния между центром масс хромофора M739 и C α -атомом остатка Q141 на дне внутренней полости в численных экспериментах по протяжке молекулы хромофора. На рис. 1г показано изменение энергии взаимодействия хромофор–белок при протяжке хромофора M739 в полости белка. Видно, что поступательное движение молекулы хромофора вглубь полости (рис. 1в) сопровождается ростом энергии взаимодействия (в абсолютных значениях) как в нативном, так и в мутированном белках. По мере продвижения хромофора наблюдается расхождение энергетических кривых белков DiB3 и DiB3-F53L. В мутированном белке энергия взаимодействия хромофор–белок по мере продвижения M739 вглубь ниши становится больше по сравнению с нативным белком, что коррелирует с увеличением интенсивности флуоресценции.

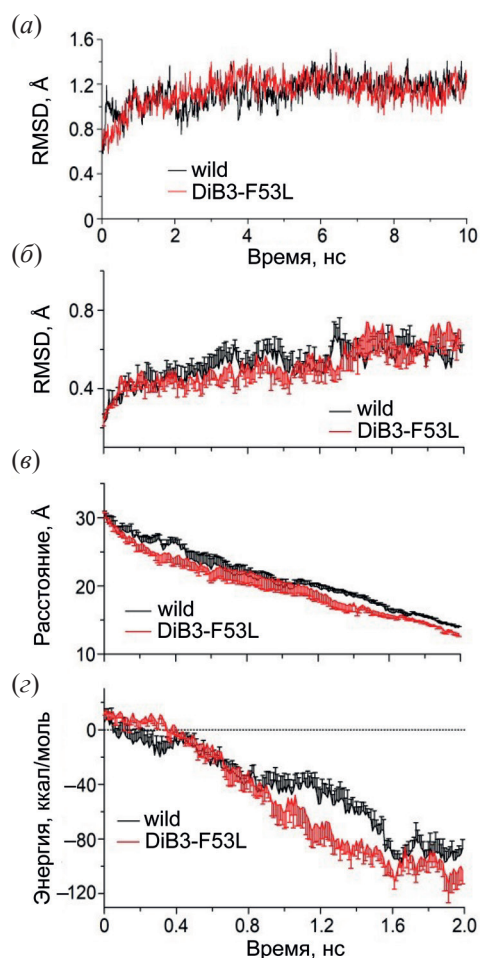


Рис. 1. Графическое представление результатов расчетов молекулярной динамики нативного DiB3 (wild, дикий тип) и мутанта DiB3-F53L. (а) – Зависимость RMSD белка от времени симуляции; (б) – зависимость RMSD белка от времени симуляции при протяжке молекулы хромофора вглубь связывающей полости белка; (в) – расстояние между центром масс молекулы хромофора и Ca-атомом Q141 при протяжке хромофора вглубь связывающей полости белка; (г) – энергия взаимодействия хромофор–белок при протяжке хромофора вглубь связывающей полости белка.

Анализ двух рядов данных, соответствующих энергиям взаимодействия хромофор–белок для DiB3 и DiB3-F53L, по критерию χ^2 показал статистическую значимость их различия ($p < 0.0001$).

На рис. 2 показана структурная модель белка DiB3-F53L в комплексе с хромофором M739, полученная в одной из пяти независимых протяжек M739 вглубь полости белка и соответствующая минимуму кривой энергетического профиля хромофор–белок (рис. 1г).

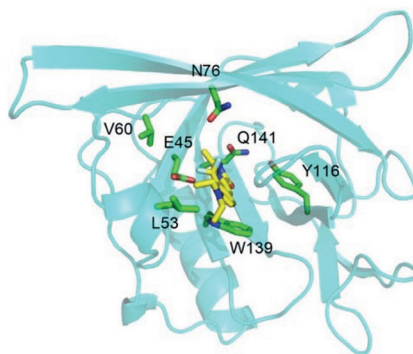


Рис. 2. Положение хромофора в активном центре белка DiB3-F53L.

МД-расчеты позволили установить энергетически предпочтительное аминокислотное окружение хромофора из 7 а.о. в активном центре белка (рис. 2).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения МД-вычислений использовали компьютерную программу NAMD [6], для визуализации траекторий и обработки расчетных данных – программу VMD [7]. Общую энергию рассчитывали как сумму энергетических вкладов, соответствующих отклонениям от равновесных значений длин связей, валентных и торсионных углов, а также вкладов, отвечающих ван-дер-ваальсовым и электростатическим взаимодействиям несвязанных пар атомов. Расчеты проведены в рамках полноатомного приближения с силовым полем CHARMM36 [8]. Температура была установлена при 300 К, давление поддерживали на стандартном уровне 1 атм. с использованием динамики Ланжевена. Применяли модель явного растворителя (TIP3P) с добавлением 0.15 M NaCl. Для учета вклада от электростатических взаимодействий атомов использовали метод Particle Mesh Ewald [9, 10], для параметризации лиганда (молекулы хромофора) – сетевой ресурс CGenFF (<https://cgenff.com/>).

Расчеты проводили по следующей схеме: минимизация общей энергии, термодинамическое уравнивание (4 нс) и молекулярная динамика (10 нс). На первых двух этапах положение (координаты) атомов основной цепи белка и тяжелых атомов молекулы хромофора фиксировали при помощи системы пространственных ограничителей. На этапе молекулярной динамики

все ограничители снимали. Расчеты проводили с использованием временного шага интегрирования 2 фс. Протяжку молекулы хромофора M739 вглубь ниши белка осуществляли при помощи системы коллективных переменных (colvars). Конформационную стабильность модели нативного белка DiB3 и белка с мутацией F53L исследовали расчетным методом молекулярной динамики (МД) [11]. Конформационную устойчивость белка оценивали по изменению среднеквадратического отклонения (RMSD) координат атомов (C, O, Ca, N) основной цепи. Расчеты проводили на суперкомпьютере Ломоносов-2 (Т-Платформы, Россия) Центра высокопроизводительных вычислений МГУ им. М.В. Ломоносова.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентная визуализация объектов в живых клетках остается технически сложной задачей, в основном из-за фоторазложения флуоресцентных меток. Эта проблема эффективно решается на основе современного подхода путем использования нековалентных комплексов флуороген-активирующих белков с синтетическими красителями – флуорогенами. После фотообесцвечивания флуороген в комплексе заменяется новым доступным в растворе интактным флуорогеном. В этом направлении была создана серия новых флуоресцентных нековалентных комплексов серии DiB – генно-инженерных вариантов бактериального мембранного белка липокалина Blc в комплексе с синтетическим GFP-подобным хромофором.

В настоящей работе представлены результаты изучения методом молекулярной динамики пространственной организации мутанта DiB3-F53L, а также его комплекса с GFP-подобным хромофором M739. Мы построили структурные модели белков DiB3 и DiB3-F53L и определили остатки в сайте связывания, вносящие наибольший вклад в энергию взаимодействия хромофор-белок. Мы установили, что мутантный белок DiB3-F53L сильнее взаимодействует с M739 по сравнению с белком дикого типа DiB3. Комплекс DiB3-F53L с хромофором M739 обладает повышенной яркостью флуоресценции по отношению к родительскому белку DiB3, что делает его перспективным объектом для использования в биологических исследованиях, а также для последующего дизайна новых более ярких биологических маркеров.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Проведение расчетов, написание статьи – АВР, ВЗП, НВП; анализ данных, подготовка рисунков – ИВА, СФА.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rothe C., Skerra A. // *BioDrugs*. 2018. V. 32. P. 233–243.
<https://doi.org/10.1007/s40259-018-0278-1>
2. Campanacci V., Bishop R.E., Blangy S., Tegoni M., Cambillau C. // *FEBS Lett*. 2006. V. 580. P. 877–883.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.086>
3. Muslinkina L., Gavrikov A.S., Bozhanova N.G., Mishin A.S., Baranov M.S., Meiler J., Pletneva N.V., Pletnev V.Z., Pletnev S. // *ACS Chem. Biol*. 2020. V. 15. P. 2456–2465.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00440>
4. Bozhanova N.G., Baranov M.S., Klementieva N.V., Sarkisyan K.S., Gavrikov A.S., Yampolsky I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *Chem. Sci*. 2017. V. 8. P. 7138–7142.
<https://doi.org/10.1039/C7SC01628J>
5. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // *Acta Crystal. Section D. Biol. Crystal*. 2010. V. 66. P. 486–501.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
6. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kale L., Schulten K. // *J. Computat. Chem*. 2005. V. 26. P. 1781–1802.

7. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. P. 33–38.
[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
8. Lee J., Cheng X., Swails J.M., Yeom M.S., Eastman P.K., Lemkul J.A., Wei S., Buckner J., Jeong J.C., Qi Y., Jo S., Pande V.S., Case D.A., Brooks C.L., 3rd, MacKerell A.D., Jr., Klauda J.B., Im W. // *J. Chem. Theory Computat.* 2016. V. 12. P. 405–413.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
9. Darden T., York D., Pedersen L. // *J. Chem. Phys.* 1993. V. 103. P. 8577–8593.
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
10. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G. // *J. Chem. Phys.* 1995. V. 98. P. 10089–10092.
<https://doi.org/10.1063/1.470117>
11. Karplus M., Petsko G.A. // *Mol. Dynam. Simulat. Biol. Nat.* 1990. V. 347. P. 631–639.
<https://doi.org/10.1038/347631a0>
12. Isralewitz B., Baudry J., Gullingsrud J., Kosztin D., Schulten K. // *J. Mol. Graph. Model.* 2001. V. 19. P. 13–25.
[https://doi.org/10.1016/s1093-3263\(00\)00133-9](https://doi.org/10.1016/s1093-3263(00)00133-9)

Three-Dimensional Structure of the Orange-Red Fluorescent Biomarker DiB3-F53L

A. V. Rossohin*, **, #, I. V. Artemiev*, S. F. Arhipova*, V. Z. Pletnev*, and N. V. Pletneva*

Phone: +7 (905) 540-75-85; e-mail: vzpletnev@gmail.com

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklykho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Research Center of Neurology, Institute of Brain, per. Obukha 5, Moscow, 105064 Russia

The 3D structure of the fluorescent protein DiB3-F53L, an orange-red fluorescent non-covalent complex of a genetically engineered variant of the bacterial protein lipocalin Blc with a synthetic GFP-like chromophore M739, was studied by the molecular dynamics (MD) computational method. The chromophore was shown to interact more strongly with the mutated DiB3-F53L protein than with the native DiB3 protein. Calculations revealed the amino acids surrounding the chromophore at the binding site that contribute most strongly to the chromophore-protein interaction energy. The DiB3-F53L protein complex with the M739 chromophore exhibits increased fluorescence brightness compared to the known parent biomarker DiB3, making it a promising marker for labeling biological objects in cell biology, as well as a starting point for the subsequent design of new, brighter biological markers.

Keywords: biomarker, three-dimensional structure, molecular dynamics