



УДК 577.112.6;577.322.4

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ТРОЙНОГО МУТАНТА БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОКАЛИНА С ХРОМОФОРОМ DiB3-F53L/F74L/L129M

© 2024 г. А. В. Россохин*, **, Е. А. Горячева*, #, И. В. Артемьев*, С. Ф. Архипова*,
А. Р. Гильванов*, Н. В. Плетнева*, В. З. Плетнев*

* ФГБУН “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 10.11.2023 г.

После доработки 16.11.2023 г.

Принята к публикации 17.11.2023 г.

Методом молекулярной динамики установлена пространственная организация DiB3-F53L/F74L/L129M – тройного мутанта флуоресцентного нековалентного комплекса генно-инженерного варианта бактериального белка липокалина B1c с синтетическим GFP-подобным хромофором M739. Установлено, что область связывания хромофора в исследуемом комплексе близка к DiB1 и отличается от альтернативной области в DiB3. Данный комплекс отличается повышенной яркостью флуоресценции по сравнению с комплексами хромофора с другими генно-инженерными вариантами липокалина, что выдвигает его в число перспективных маркеров биологических объектов в клеточной биологии.

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

DOI: 10.31857/S0132342324030146, **EDN:** NXOXAI

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 с малыми молекулами для различных физиологических целей. Охарактеризовано более десяти различных изоформ липокалина с разной специфичностью к лиганду или физиологической функцией. Биомаркеры группы DiB – первые примеры использования бактериального липокалина B1c для создания новых флуоресцентных биомаркеров на основе нековалентных комплексов генно-инженерных вариантов B1c (в качестве флуороген-активирующего белка, ~20 кДа) с синтетическим GFP-подобным хромофором M739 (рис. 1, табл. 1) [2–4]. При создании систем маркировки для

целей клеточной биологии липокалин B1c оказался многообещающим каркасом для связывания флуорогена M739. Отдельные комплексы липокалина демонстрируют яркую флуоресценцию и существенно более высокую фотостабильность, чем коммерческие GFP-подобные биомаркеры. При этом в одном эксперименте можно на основе флуорогена комбинировать различные системы мечения с временным разделением. В настоящей работе представлены результаты расчета пространственной организации тройного мутанта DiB3-F53L/F74L/L129M методом молекулярной динамики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллическая структура родственного флуоресцентного комплекса DiB1 была установлена рентгеноструктурным методом с разрешением 1.58 Å (PDB: 6UBO) [3]. В отличие от флуорес-

Сокращения: МД – молекулярная динамика; B1c – бактериальный липокалин; GFP – зеленый флуоресцентный белок.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 330-75-10; эл. почта: goryacheva@ibch.ru).

центных GFP-подобных белков с укладкой белковой цепи в виде β -бочонка из 11 антипараллельных β -сегментов, пространственная структура мономера B1c принимает форму β -бочонка из 8 антипараллельных β -сегментов с присоединенным α -спиральным фрагментом на C-концевом участке. Четыре петли, расположенные с противоположной стороны от N-конца, образуют овальный ($8 \times 11 \text{ \AA}$) вход в узкую удлиненную полость белка глубиной $\sim 19 \text{ \AA}$. На дне полости располагаются гидрофильные остатки (Glu45, Glu54, Asn76, Asn141 и Tyr116), а область ближе к выходу заселена в основном гидрофобными остатками (Gly114/115, Val106/130, Pro133, Trp139, включая гидрофобные части Tyr116 и Tyr137).

В исследуемом комплексе полость белка B1c обеспечивает специфическое связывание трициклического хромофора M739 (рис. 2 и 3). Гидро-

фильное пятичленное кольцо хромофора располагается вблизи гидрофильного дна полости липокалина, а гидрофобное шестичленное кольцо – в гидрофобной части у входа в полость. Положение хромофора M739 в полости белка B1c стабилизируется тремя H-связями с боковыми цепями Asn76, Trp139 и Gln141. Дополнительный вклад в специфическое связывание вносит π -стэкинг хромофора с ароматическим остатком Trp139, а также ряд гидрофобных контактов. Три аминокислотные замены Phe53Leu, Phe74Leu и Leu129Met в DiB3 (рис. 1) увеличивают стереохимическую комплементарность хромофора в полости липокалина, что приводит к усилению его связывания, сопровождаемому существенным увеличением яркости и заметным смещением спектральных полос возбуждения и эмиссии (табл. 1). При этом замены конформационно жестких остатков Phe53 и Phe74 на относительно

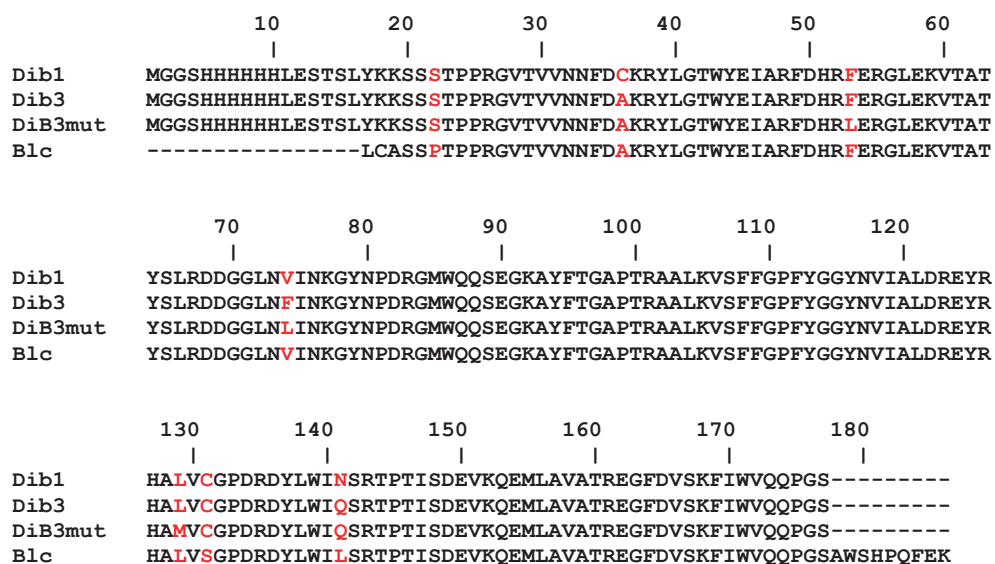


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей родительского бактериального липокалина B1c [2] и его мутантов в комплексах с синтетическим GFP-подобным хромофором M739 [3]. Аминокислотные замены выделены красным цветом. DiB3mut – тройной мутант DiB3-F53L/F74L/L129M.

Таблица 1. Фотофизические свойства флуоресцентных комплексов генно-инженерных вариантов липокалина с GFP-подобным хромофором M739

Флуоресцентный комплекс	λ_{ex} , нм	λ_{em} , нм	QY	EC, $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Относительная яркость *
DiB1 [4]	513	542	32	45 800	0.44
DiB3 [4]	546	565	16	45 600	0.22
DiB3-F53L/F74L/L129M [3]	509	546	51	65 700	1.00

* Яркость, равная произведению квантового выхода (QY) на коэффициент экстинкции (EC), представлена в относительных величинах.

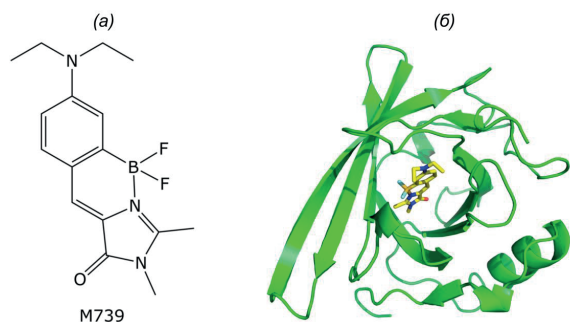


Рис. 2. (а) – Структурная формула хромофора M739; (б) – пространственная структура комплекса липокалина (показан зеленым) с хромофором (показан желтым).

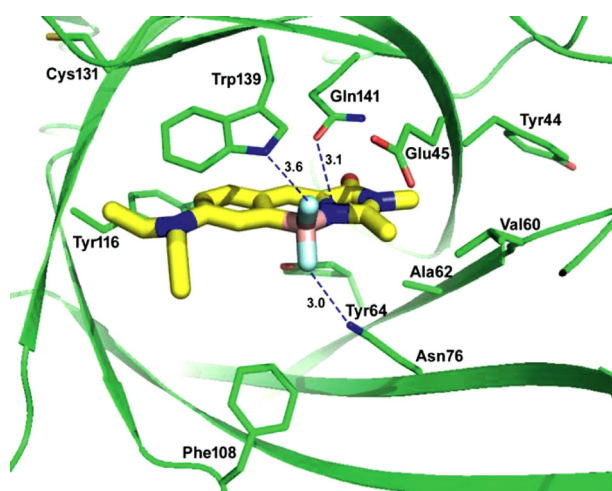


Рис. 3. Ближайшее аминокислотное окружение хромофора M739 в связывающей полости липокалина.

гибкий Leu увеличивают связывание хромофора в полости белка. Существенное увеличение яркости мутанта DiB3-F53L/F74L/L129M по сравнению с родительским белком DiB3 указывает на более сильное связывание хромофора с повышенным экранированием от растворителя.

Суперпозиция структур DiB1 и комплекса флуоресцентного белка сандерцианина с биливердином IX α предполагает наличие в липокалинах двух сайтов связывания, способных к π -стэкингу с хромофором. Первый сайт, установленный в комплексах DiB1 и DiB3-F53L/F74L/L129M, содержит ароматический остаток Trp139 в стэкинг-взаимодействии с хромофором. В сандерцианине он отсутствует, в этой позиции располагается Ser. Второй минорный сайт, установленный в сандерцианине и в других липокалинах, представляет собой “сэндвич” из двух ароматических боковых

цепей Phe53 и Phe108. Аналогично сандерцианину низкоаффинный комплекс DiB3 связывает хромофор в минорном центре за счет π -стэкинга между двумя ароматическими остатками Phe53 и Phe108. При этом, заметное различие фотофизических характеристик DiB3-F53L/F74L/L129M и DiB3 неявным образом подтверждает существование в полости белка обоих центров связывания хромофора.

Расчеты методом молекулярной динамики (МД) продемонстрировали конформационную устойчивость обоих комплексов. Соответствующие значения RMSD (0.95 ± 0.15 и 1.35 ± 0.19) вышли на плато, что указывает на стабильность структур родительского белка и его тройного мутанта (рис. 4а). В случае управляемой процедуры МД при протяжке молекулы хромофора вглубь полости белка структура претерпевает локальные конформационные изменения (рис. 4б), которые не приводят к потере нативной структуры (значения RMSD для DiB3 – 1.0 ± 0.27 и его тройного мутанта – 1.5 ± 0.3). Для тройного мутанта DiB3-F53L/F74L/L129M величина энергии хромофор–белок находится на стабильно более отрицательном уровне по сравнению с DiB3, что предполагает более сильные взаимодействия между хромофором и белком на протяжении практически всей траектории движения хромофора (рис. 5).

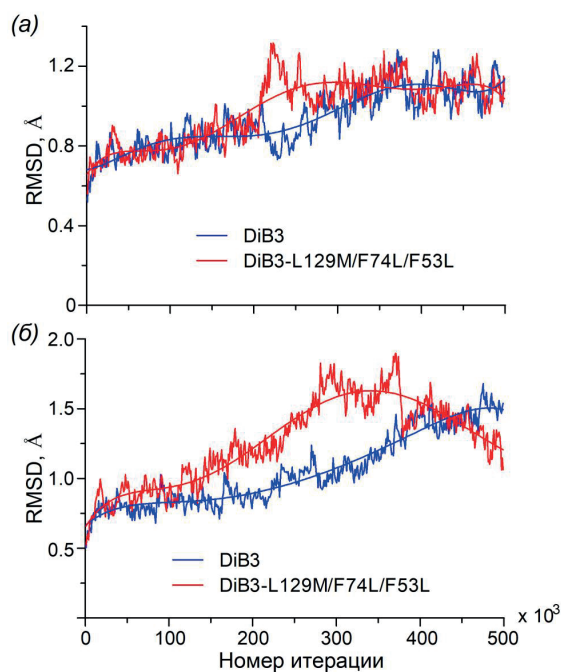


Рис. 4. Зависимость RMSD (Å) атомов основной цепи белка от времени (номер итерации 500 = 1 нс): без хромофора (а) и при протяжке хромофора вдоль полости белка (б).

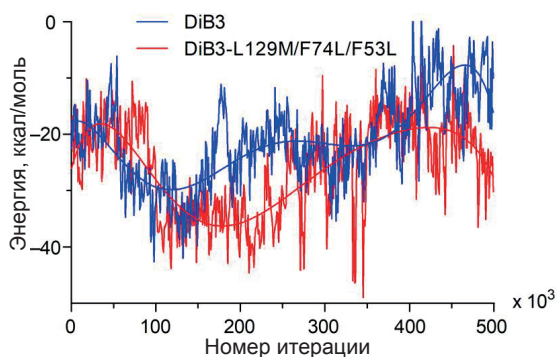


Рис. 5. Зависимость энергии взаимодействия хромофор–белок от времени (номер итерации 500 = 1 нс) при протяжке хромофора внутри связывающей полости.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поиск основного центра связывания в исследуемом тройном мутанте DiB3-F53L/F74L/L129M выполняли расчетным методом молекулярной динамики (МД) [5, 6] при протяжке молекулы хромофора вглубь связывающей полости белка В1с. Стартовую модель белка получали на основе рентгеновской пространственной структуры DiB1 введением соответствующих аминокислотных замен (рис. 1) на стереографической станции с помощью программы молекулярной графики COOT [7].

Расчеты МД выполняли в полноатомном приближении при температуре 300 К на основе силового поля CHARMM36 [8] с использованием модели явного растворителя. Учет энергетического вклада от электростатических взаимодействий атомов проводили по методу Эвальда [9, 10]. Протяжку лиганда в полости белка осуществляли при помощи системы коллективных переменных Colvars, реализованной в программе NAMD [11]. К условной переменной “dist”, определяющей расстояние между центром массы хромофора и С α -атомом реперного остатка Q141 в глубине связывающей полости белка, прикладывали гармонический потенциал с силовой константой 20 (ккал/моль) (\AA^2)⁻¹. При этом 500 000 шагов по данной процедуре привело к уменьшению

расстояния с 20 до 8 \AA – от начальной позиции хромофора у входа в связывающую полость белка до максимально возможной удаленной позиции в глубине полости. Расчеты движения хромофора по траектории в полости белка включали этапы минимизации общей энергии, термодинамического уравнивания и МД (с временным шагом 2 фс). На первых двух этапах положения С α -атомов белка и неводородных атомов хромофора фиксировали. На завершающем этапе МД все ограничители снимали. Для вычислений и визуализации траекторий использовали программы NAMD [11] и VMD [12] соответственно, для параметризации лиганда (молекулы хромофора) – сетевой ресурс CGenFF (<https://cgenff.silcsbio.com/>).

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 флуорогенактивирующих 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 В1с в комплексе с синтетическим GFP-подобным хромофором. Для изучения структурно-функциональной взаимосвязи мы предприняли систематические структурные исследования белков этой серии экспериментальными и расчетными методами. В настоящей работе представлены результаты расчета пространственной организации тройного мутанта DiB3-F53L/F74L/L129M методом молекулярной динамики. Установлено, что область связывания хромофора в белке соответствует рентгеновской кристаллической структуре родственного комплекса DiB1 и отличается от альтернативного центра связывания в родительском белке DiB3.

Исследованный комплекс – наиболее яркий представитель среди известных биомаркеров серии

DiV, представляющий интерес для практического использования в качестве биомаркера в клеточной биологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Расчеты производились на базе центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами ФГБОУ ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00011).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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., Mikhail S., Baranov M.S., Klementieva N.V., Gavrikov A.S., Sarkisyan K.S., Yampolsky I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Konstantin A., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. P. 7138–7142.
<https://doi.org/10.1039/C7SC01628J>
5. *Karplus M., Petsko G.A.* // *Nature*. 1990. V. 347. P. 631–639.
<https://doi.org/10.1038/347631a0>
6. *Sansom M.S., Adcock C., Smith G.R.* // *J. Struct. Biol.* 1998. V. 121. P. 246–262.
<https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3950>
7. *Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 486–501.
<https://doi.org/10.1107/s0907444910007493>
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., MacKerell A.D. Jr., Klauda J.B., Im W.* // *J. Chem. Theor. Comput.* 2016. V. 12. P. 405–413.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
9. *Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G.* // *J. Chem. Phys.* 1995. V. 103. P. 8577–8593.
<https://doi.org/10.1063/1.470117>
10. *Darden T., York D., Pedersen L.* // *J. Chem. Phys.* 1993. V. 98. P. 10089–10092.
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
11. *Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kale L., Schulten K.* // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. P. 1781–1802.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
12. *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)

Tree-Dimensional Structure of the Fluorescent Complex of Bacterial Lipocalin Triple Mutant with Chromophore – DiB3-F53L/F74L/L129M

A. V. Rossokhin^{*, **}, E. A. Goryacheva^{*, #}, I. V. Artemyev^{*}, S. F. Arhipova^{*}, A. R. Gilvanov^{*}, N. V. Pletneva^{*}, and V. Z. Pletnev^{*}

[#]Phone: +7 (495) 330-75-10; e-mail: goryacheva@ibch.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} Research Center of Neurology, per. Obuha 5, Moscow, 105064 Russia

The three dimensional structure of DiB3-F53L/F74L/L129M – a triple mutant of the fluorescent non-covalent complex of a genetically engineered variant of the bacterial protein lipocalin B1c with the synthetic GFP-like chromophore M739, has been studied by molecular dynamics methods. It was found that the chromophore binding site in the complex is similar to DiB1 and differs from the alternative site in DiB3. The complex is characterized by increased fluorescence brightness compared to those with other genetically engineered variants of lipocalin, which makes it one of the promising markers of biological objects in cell biology.

Keywords: chromophore, fluorogen-activating protein, molecular dynamics