



УДК 577.112.6;577.322.4

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ ХРОМОФОРА В НЕКОВАЛЕНТНЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КОМПЛЕКСАХ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОКАЛИНА

© 2023 г. Е. А. Горячева\*, #, И. В. Артемьев\*, С. Ф. Архипова\*, А. В. Россохин\*\*,  
А. Р. Гильванов\*, В. З. Плетнев\*, Н. В. Плетнева\*

\*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 07.02.2023 г.

После доработки 17.02.2023 г.

Принята к публикации 18.02.2023 г.

Расчетным методом молекулярной механики установлена пространственная организация DiB3 – флуоресцентного нековалентного комплекса генно-инженерного варианта бактериального белка липокалина B1c с синтетическим GFP-подобным хромофором M739. По сравнению с кристаллической структурой родственного комплекса DiB1, в расчетной структуре DiB3 установлено наличие альтернативного центра связывания хромофора M739.

*Ключевые слова:* хромофор, флуороген-активирующий белок, молекулярная механика

DOI: 10.31857/S0132342323050020, EDN: AAZYGK

### ВВЕДЕНИЕ

Природные липокалины представляют собой семейство небольших белков, встречающихся в различных биологических системах [1]. Они имеют общую  $\beta$ -структурную укладку и обладают способностью к комплексообразованию малых молекул для различных физиологических целей. Охарактеризовано более десяти различных изоформ липокалина с разной специфичностью к лиганду и физиологической функцией.

Биомаркеры группы DiB1–3 получены 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]. Флуороген M739 демонстрирует быстрое проникновение в клетку и обратимое мечение, что позволяет легко настраивать плотность мечения в живых клетках по требованию. Это значительно упрощает окрашивание клеток, позволяя проводить более сложные эксперименты. В принципе, в одном эксперименте можно комбинировать различные системы мечения с временным разделением на основе флуорогена. Липокалин B1c, использованный для связывания различных малых молекул, оказался многообещающим карка-

сом 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.

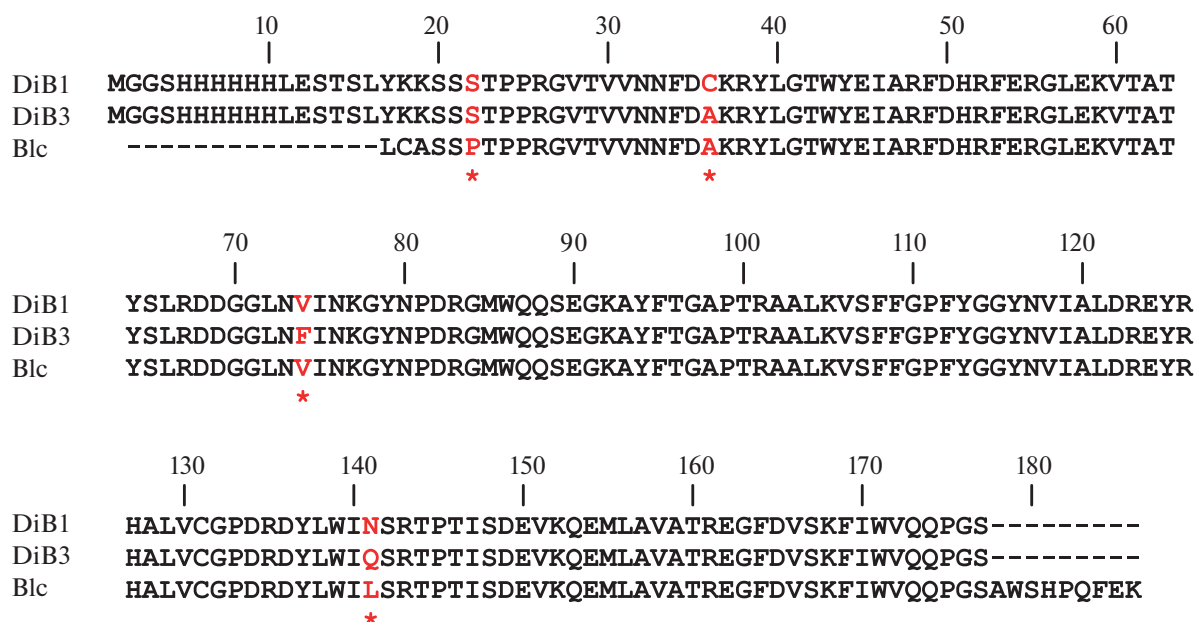
Цель данной работы – установление пространственной организации флуоресцентного нековалентного комплекса DiB3 расчетным методом молекулярной механики и сопоставление полученной расчетной модели DiB3 с кристаллической структурой родственного комплекса DiB1.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллическая структура флуоресцентного комплекса DiB1 была установлена нами ранее рентгеноструктурным методом с разрешением 1.58 Å (PDB: 6UBO) [3]. В отличие от флуоресцентных GFP-подобных белков с укладкой белковой цепи в виде  $\beta$ -бочонка из 11 антипараллельных  $\beta$ -сегментов, пространственная структура мономера B1c принимает форму  $\beta$ -бочонка из 8 антипараллельных  $\beta$ -сегментов с присоединенным  $\alpha$ -спиральным фрагментом на C-концевом участке. Четыре петли, расположенные с противоположной стороны от N-конца, образуют овальный ( $8 \times 11$  Å) вход в узкую удлиненную полость глубиной ~19 Å. На дне полости располагаются гидрофильные остатки (Glu45, Glu54,

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

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



**Рис. 1.** Сравнение аминокислотных последовательностей родительского бактериального липокалина Blc из *E. coli* (GenBank AIW80316.1) [2] и его мутантов в комплексах DiB1 [3] и DiB3 с синтетическим флуорогеном M739. Звездочками отмечены аминокислотные замены.

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).

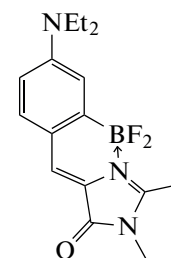
В липокалиновом комплексе DiB1 полость белка Blc обеспечивает специфическое связывание копланарного трициклического хромофора M739 (рис. 2 и 3a). Гидрофильное пятичленное кольцо хромофора располагается вблизи гидрофильного дна полости, а гидрофобное шести-членное кольцо – в гидрофобной части у входа в полость. Положение связанного M739 в полости белка Blc стабилизируется двумя Н-связями между группами C=O и BF2 хромофора с Asn141 и

Asn76 белка соответственно, а также опосредованной через молекулу воды Н-связью между BF2 и Tyr64. Дополнительный вклад в специфическое связывание вносят π-стэкинг-взаимодействие пятичленного и центрального шести-членного колец M739 с ароматическим остатком Trp139, а также ряд гидрофобных контактов.

В липокалиновом комплексе DiB3 (рис. 3б) две аминокислотные замены Val74Phe и Leu141Gln существенно уменьшают стереохимическую комплементарность полости липокалина к хромофору M739, приводя к ~90-кратному снижению аффинности связывания и сильному смещению спектральных полос поглощения и эмиссии (табл. 1).

**Таблица 1.** Фотофизические характеристики комплексов бактериального липокалина Blc с хромофором M739 – DiB1 и DiB3 [4]

Характеристики	DiB1	DiB3	M739
Аминокислотные замены в Blc	Ala36Cys + Leu141Asn	Val74Phe + Leu141Gln	
$K_d$ , мкМ	0.1	9	
Относительная фотостабильность	2×	10×	
$\lambda_{ex}$ , нм	513	546	520
$\lambda_{em}$ , нм	542	565	563
Квантовый выход, QY	0.32	0.15	0.035



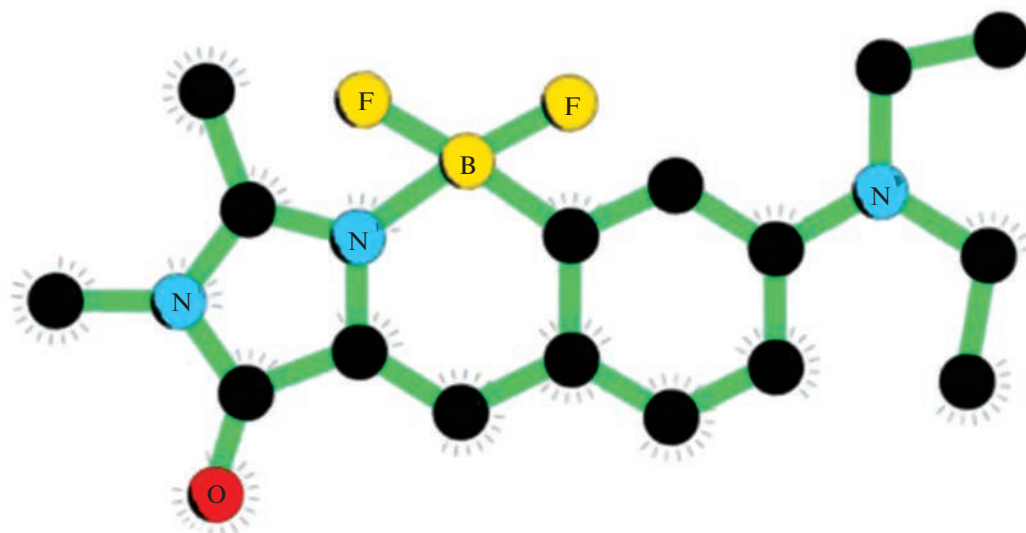


Рис. 2. Структура хромофора M739.

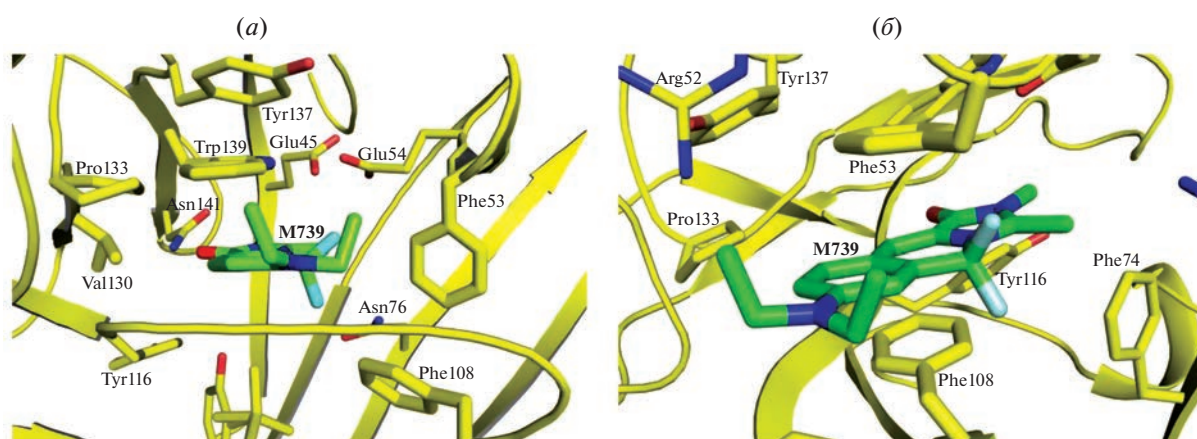


Рис. 3. Области связывания хромофора M739 (показан зеленым цветом): (а) – DiB1 (рентгеновская кристаллическая структура [3]); (б) – DiB3 (расчетная модель).

Было предположено, что объемные остатки Phe74 и Gln141 частично выталкивают хромофор из центра посадки ближе к выходу из полости, нарушая его Н-связывание с остатками Asn141 и Tyr64 белка, наблюдаемое в структуре DiB1. Предполагаемое смещение должно сопровождаться уменьшением эффективности  $\pi$ -стэкинга с Trp139 и ослаблением Н-связывания с Asn76. Небольшой квантовый выход DiB3 ( $QY \sim 0.15$  по сравнению с  $QY$  свободного хромофора  $\sim 0.035$ ) указывает на наличие относительно слабого комплекса, частично экранирующего хромофор от растворителя.

Суперпозиция структур комплекса DiB1 и комплекса флуоресцентного белка Сандерцианина с биливердином IX $\alpha$  [5] предполагает наличие в липокалинах двух сайтов связывания, способных к  $\pi$ -стэкингу с хромофором. Первый сайт,

установленный в комплексе DiB1, содержит ароматический остаток Trp139 в стэкинг-взаимодействии с хромофором. В Сандерцианине он отсутствует, в этой позиции располагается Ser. Второй сайт, установленный в Сандерцианине и ряде других биливердин-связывающих липокалинов, представляет собой “сэндвич” из двух ароматических боковых цепей Phe55 и His108 (Phe53 и Phe108 в DiB1). В некомплексной апоформе липокалина Wc расстояние между параллельными боковыми цепями Phe53 и Phe108, располагающимися у выхода из полости, меньше, чем в Сандерцианине. Посадка хромофора в основном связывающем центре комплекса DiB1 осуществляется за счет поворота боковой цепи Phe53 вокруг связи  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  на  $120^{\circ}$  и сдвигом Phe108 на 6 Å. Процесс конформационных изменений внутри

полости белка сопровождается поворотом внешней петли 107–113 на  $\sim 90^\circ$  [3]. И, наоборот, низкоаффинный комплекс DiB3 предполагает связывание хромофора в минорном центре за счет  $\pi$ -стэкинга между двумя ароматическими остатками Phe55 и Phe108. При этом кардинальное различие фотофизических характеристик DiB1 и DiB3 неявным образом подтверждает существование в полости белка обоих центров связывания хромофора.

Наши эксперименты по получению качественных монокристаллов DiB3, пригодных для рентгеноструктурных исследований, успехом не увенчались. В этой связи мы предприняли попытку установить положение предполагаемого минорного центра связывания в DiB3 расчетным методом молекулярной механики с помощью программы ZMM [6], алгоритм которой обеспечивает генерацию конформационных состояний исследуемых объектов методом Монте-Карло с последующей минимизацией общей энергии. Стартовая расчетная модель комплекса DiB3 была получена на основе рентгеновской пространственной структуры DiB1 (рис. 3a) путем введения соответствующих аминокислотных замен (рис. 1, табл. 1) на стереографической станции с помощью программы молекулярной графики COOT [7]. В расчетном ZMM-эксперименте в связывающей полости DiB3 методом Монте-Карло было сгенерировано  $\sim 50000$  стартовых расположений хромофора и конформационных состояний остатков из ближайшего окружения, включая подвижную петлю 107–113, участвующую в формировании полости. После процедуры энергетической оптимизации одно из низкоэнергетических состояний комплекса DiB3 (рис. 3б) соответствовало положению хромофора, наблюдаемому в структуре Сандерцианина [5]. По сравнению с экспериментальной структурой DiB1, в расчетной структуре DiB3 хромофор M739 демонстрирует сдвиг на  $\sim 5 \text{ \AA}$  в сторону выхода из связывающей полости. Сдвиг сопровождается дополнительным поворотом хромофора на  $\sim 60^\circ$  вокруг оси, перпендикулярной плоскости хромофора. При этом концевая группа  $N-(C_2H_5)_2$  экспонируется наружу с ее частичным экранированием остатками Phe109 и Arg52. Центральная часть планарной трициклической структуры хромофора располагается между ароматическими кольцами Phe53 и Phe108 на расстоянии  $3.4 \text{ \AA}$ , образуя эффективное стэкинг-взаимодействие.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

DiB3 представляет собой нековалентный комплекс мономерного бактериального мембранного белка липокалина B1c из *Escherichia coli* (GenBank A1W80316.1, рис. 1) [2] с синтетическим GFP-подобным хромофором M739 [4, 8, 9]. Поиск оптимальной пространственной организации DiB3 выполняли расчетным программным комплексом молекулярной механики ZMM [6] основе ме-

тода минимизации энергии Монте-Карло [10]. В качестве стартовой модели использовали рентгеновскую структуру родственного комплекса DiB1 [3], модифицированную программой молекулярной графики COOT [7] в соответствии с аминокислотной последовательностью DiB3 (рис. 1) [3]. В основе алгоритма программы ZMM лежит генерация случайных изменений координат модели с последующим градиентным спуском в ближайший энергетический минимум. Общая энергия генерируемых конформационных состояний DiB3 определялась суммой энергетических вкладов, отвечающих отклонениям длин связей, валентных и торсионных углов от равновесных значений, а также вкладов от ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий несвязанных пар атомов. Поиск структуры, отвечающей минимальной энергии, осуществлялся путем вариации положения лиганда, а также торсионных углов как лиганда, так и боковых цепей окружающих аминокислотных остатков.

Внутренними координатами модели выбраны длины валентных связей, валентные и торсионные углы, а также декартовы координаты и эйлеровы углы, определяющие положение лиганда. Вклад ван-дер-ваальсовых взаимодействий атомов в общую энергию учитывали на основе силового поля AMBER [11]. При вычислении энергетического вклада от электростатических взаимодействий атомов диэлектрическая проницаемость оценивали функцией расстояния между парами атомов и степени их экспонирования в водное окружение [6]. Атомные заряды вычисляли методом AM1 [12] (Dewar et al., 1985) при помощи программы MORAC [13].

Энергетические ZMM-расчеты комплекса DiB3 проводили в два этапа. На первом этапе использовали систему структурных ограничителей для реализации оптимального стартового расположения хромофора в предполагаемом месте связывания в липокалине, при этом минимизация общей энергии комплекса липокалин–хромофор позволила устранить стерические конфликты, возникающие при начальном докинге лиганда. После удаления ограничителей на втором этапе была реализована окончательная процедура минимизации Монте-Карло.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентная визуализация объектов в живых клетках остается технически сложной задачей, в основном из-за фоторазложения флуоресцентных меток. Эта проблема реализуется 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 флуорес-

центных нековалентных комплексов серии DiB – генно-инженерных вариантов бактериального мембранного белка липокалина Blc с синтетическим GFP-подобным хромофором M739. Это первые примеры дизайна флуоресцентных биомаркеров на основе липокалина. 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 DiB3 методом молекулярной механики. По сравнению с рентгеновской кристаллической структурой родственного комплекса DiB1, в расчетной структуре DiB3 установлено наличие альтернативного центра связывания хромофора M739, располагающегося в стэкинг-взаимодействии между двумя ароматическими остатками Phe53 и Phe108.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания экспериментов с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

#### 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. *Ghosh S., Yu C.L., Ferraro D.J., Sudha S., Pal S.K., Schaefer W.F., Gibson D.T., Ramaswamy S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 13. P. 11513–11518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525622113>
6. *Garden D.P., Zhorov B.S.* // *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2010. V. 24. P. 91–105. <https://doi.org/10.1007/s10822-009-9317-9>
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. *Schiefner A., Chatwell L., Breustedt D.A., Skerra A.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 1308–1315. <https://doi.org/10.1107/s0907444910039375>
9. *Bozhanova N.G., Calcutt M.W., Beavers W.N., Brown B.P., Skaar E.P., Meiler J.* // *FEBS Lett*. 2021. V. 595. P. 206–219. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14001>
10. *Li Z., Scheraga H.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. P. 6611–6615. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.19.6611>
11. *Weiner J., Kollman P.A., Case D.A., Singh U.C., Chio C., Alagona G., Profeta S., Weiner P.K.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1984. V. 106. P. 765–784. <https://doi.org/10.1021/ja00315a051>
12. *Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1985. V. 107. P. 3902–3909. <https://doi.org/10.1021/ja00299a024>
13. *Stewart J.J.P.* // *Chem. Prog. Exch.* 1990. V. 10. P. 86.

## Alternative Chromophore Binding Sites in Non-Covalent Fluorescent Complexes of Bacterial Lipocalin

E. A. Goryacheva<sup>\*, #</sup>, I. V. Artemyev<sup>\*</sup>, S. F. Arhipova<sup>\*</sup>, A. V. Rossohin<sup>\*\*</sup>, A. R. Gilvanov<sup>\*</sup>, V. Z. Pletnev<sup>\*</sup>, and N. V. Pletneva<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 330-75-10; e-mail: goryacheva@ibch.ru

<sup>\*</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>\*\*</sup>Research Center of Neurology, per. Obuha 5, Moscow, 105064 Russia

The three-dimensional structure of DiB3, a fluorescent non-covalent complex of a genetically engineered variant of the bacterial protein lipocalin Blc with a synthetic GFP-like chromophore M739, was determined by the calculation method of molecular mechanics. Compared to the crystal structure of the related DiB1 complex, an alternative binding site for the M739 chromophore was found in the structure of the DiB3 complex.

*Keywords:* chromophore, fluorogen-activating protein, molecular mechanics