



Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра биоинженерии
Группа интегративной биологии



Выпускная квалификационная работа магистра

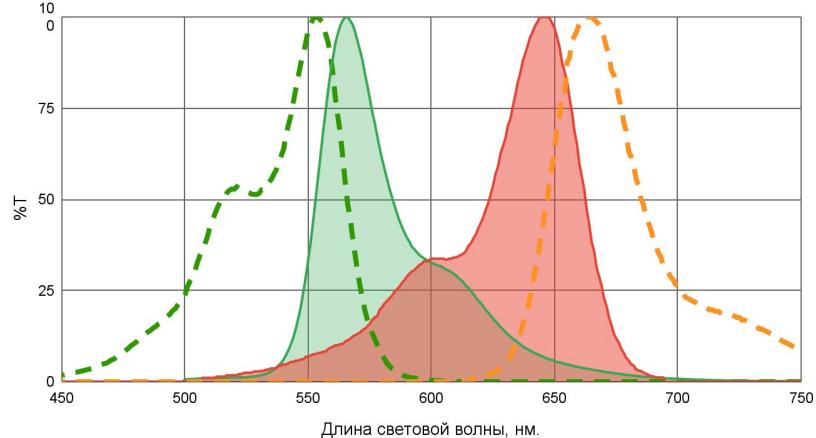
Оценка влияния молекулярного окружения на эффективность
Ферстеровского резонансного переноса энергии при помощи
молекулярной динамики флуоресцентных меток

Москва 2023

Автор:
Кристовский Николай Всеволодович,

Научный руководитель:
к.ф-м.н. Армеев Григорий Алексеевич

Ферстеровский резонансный перенос энергии



Спектры поглощения и испускания фотонов:
зеленый — Донор (Cy3)
красный — Акцептор (Cy5)

Время жизни возбужденного состояния
 $S_1 - 10^{-10} - 10^{-7}$ сек.
(порядка наносекунд)

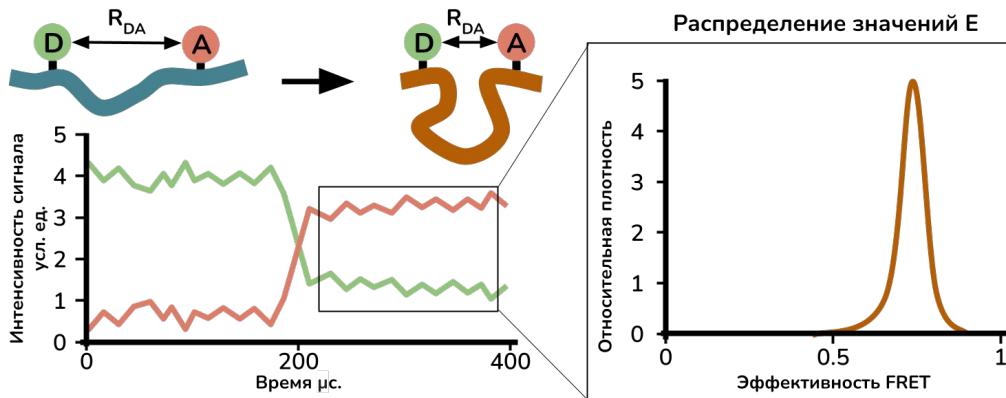


Схема эксперимента по измерению эффективности FRET

Адаптировано из: <https://www.wur.nl/en/show/Single-molecule-Forster-Resonance-Energy-Transfer-smFRET.htm>

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

Формула расчета теоретической эффективности FRET

E — эффективность FRET,

R_0 — расстояние при котором эффективность FRET равняется 50%,

R_{DA} — расстояние между донором и акцептором.

Влияние ориентационного фактора на эффективность FRET

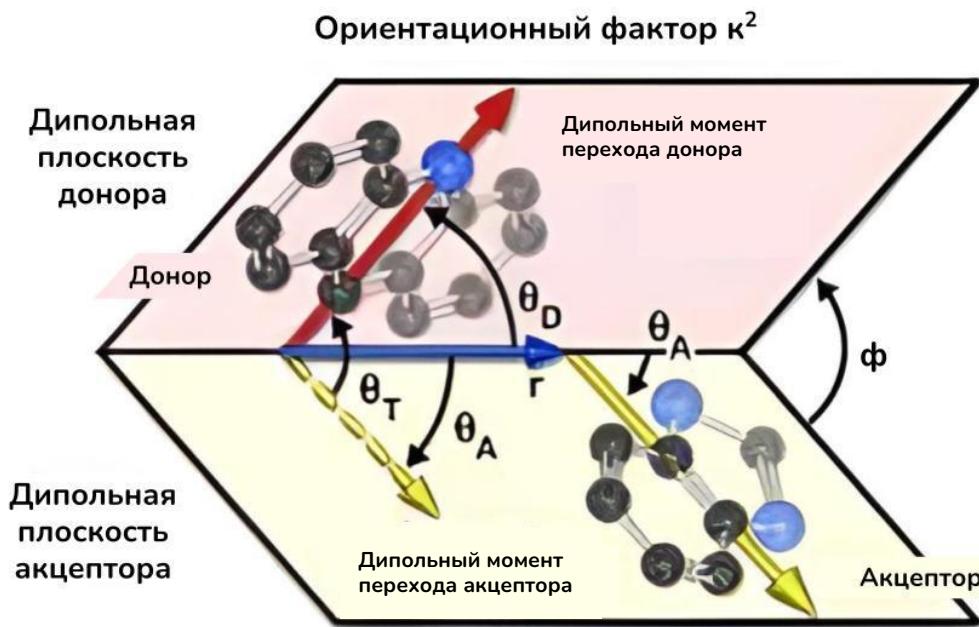


Схема расположения углов между переходными моментами диполей донора и акцептора

$$R_0^6 = \frac{0.529 \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda)}{N \cdot n^4} \quad (2)$$

Формула расчета Ферстера радиуса

Φ_D — квантовый выход донора,
 $J(\lambda)$ — интеграл спектрального перекрывания,
 N — число Авогадро,
 n — показатель преломления среды
 κ^2 — ориентационный фактор,

$$\kappa^2 = (cos\theta_T - 3cos\theta_D cos\theta_A)^2 \quad (3)$$

Формула расчета ориентационного фактора

Влияние ориентационного фактора на эффективность FRET

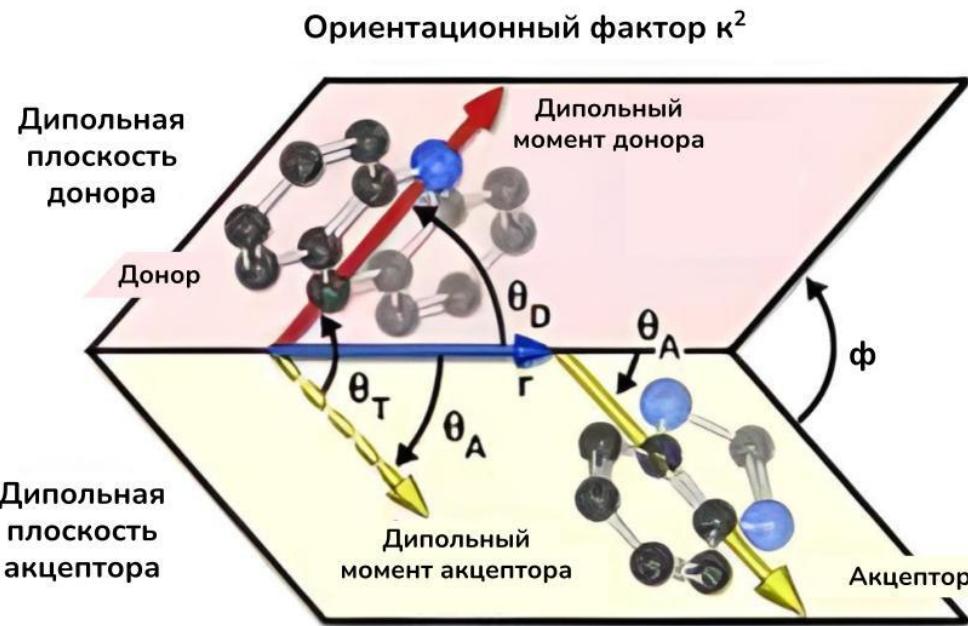


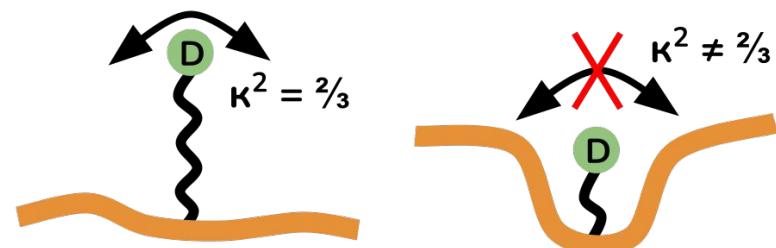
Схема расположения углов между переходными моментами диполей донора и акцептора

$$R_0^6 = \frac{0.529 \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda)}{N \cdot n^4} \quad (2)$$

Формула расчета Ферстера радиуса

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (3)$$

Формула расчета ориентационного фактора



Влияние молекулярного окружения на κ^2

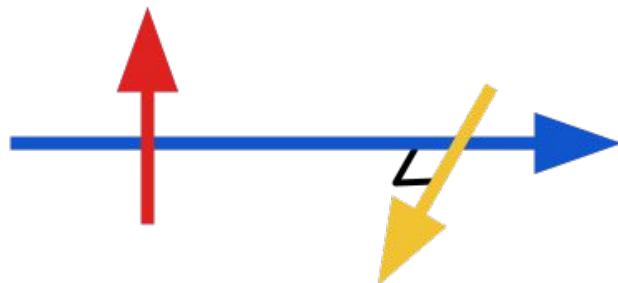
Влияние ориентационного фактора на эффективность FRET



$$\kappa^2 = 4$$



$$\kappa^2 = 1$$



$$\kappa^2 = 0$$

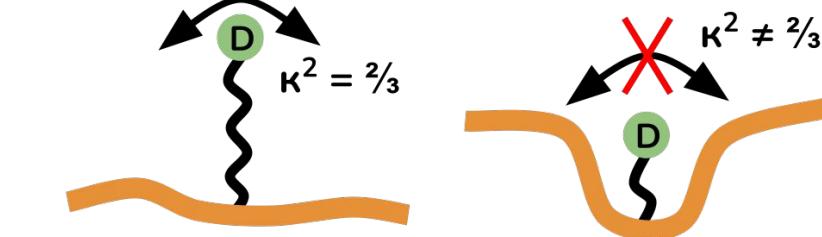
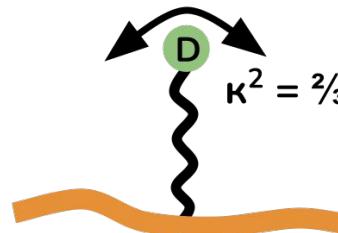
Зависимость значения ориентационного фактора от положений дипольных моментов флуорофоров

$$R_0^6 = \frac{0.529 \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda)}{N \cdot n^4} \quad (2)$$

Формула расчета Ферстеровского радиуса

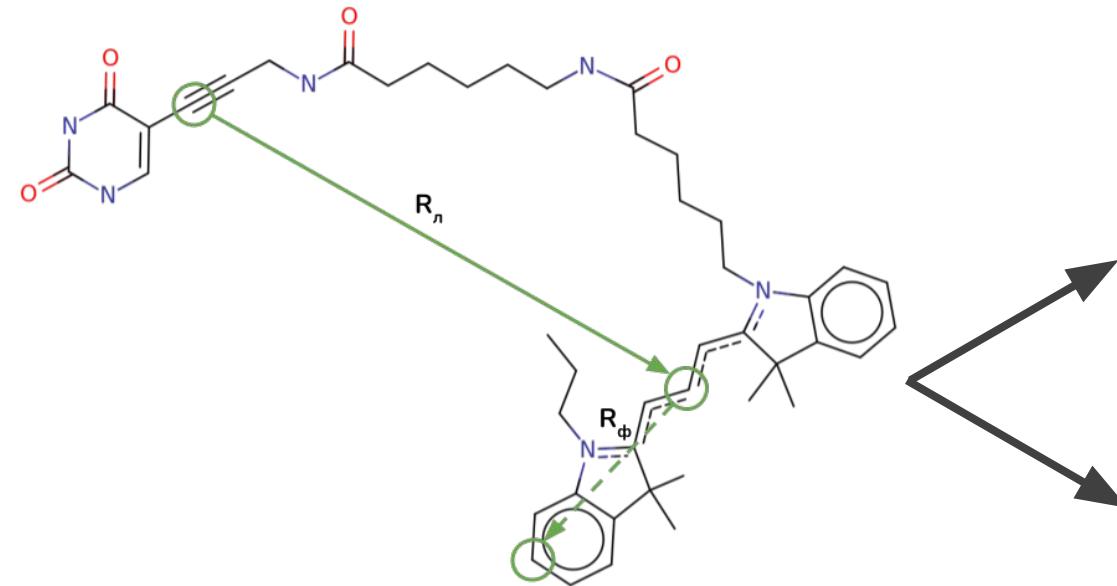
$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cos\theta_A)^2 \quad (3)$$

Формула расчета ориентационного фактора

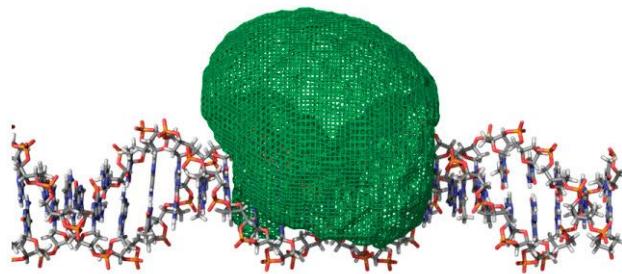


Влияние молекулярного окружения на κ^2

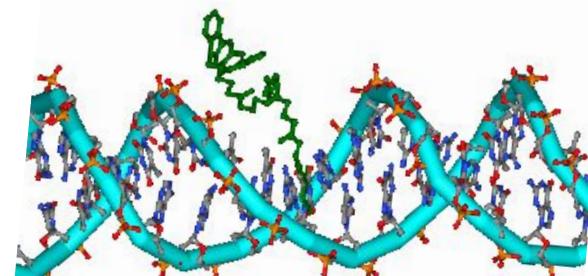
Методы оценки ожидаемой эффективности FRET



Метод оценки доступного объема



Метод перебора конформеров



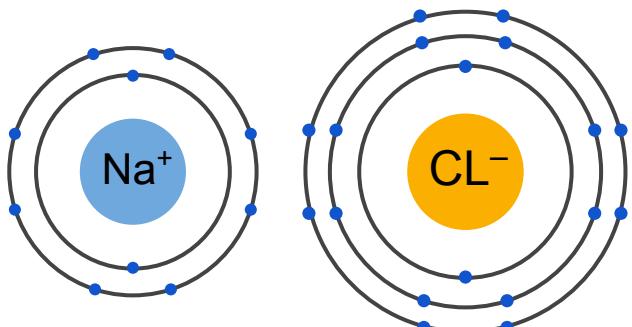
Визуализация параметров необходимых для моделирования доступного объема

R_l — радиус линкера

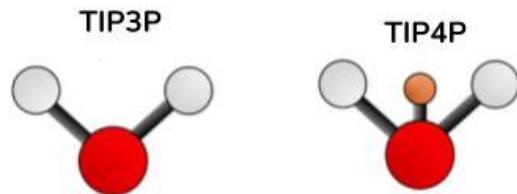
R_ϕ — радиус флуорофора

Факторы влияющие на моделирование диффузии метки

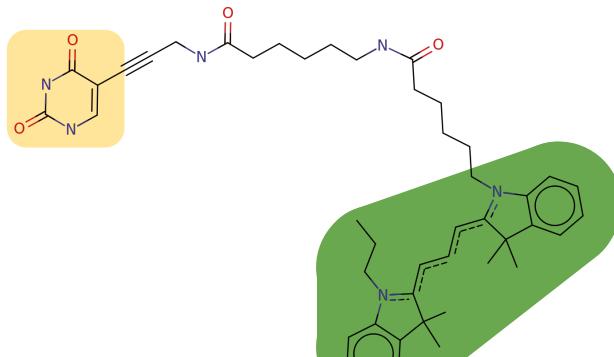
Концентрация ионов



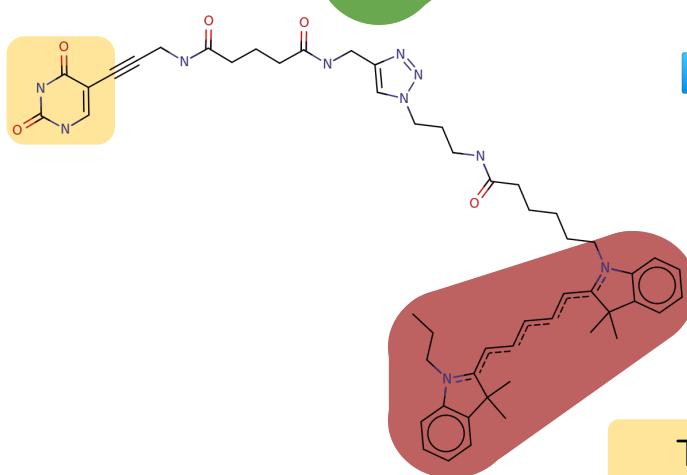
Модель воды



Параметры линкеров



Вариант метки Cy3 с
линкером от компании
Syntol крепящегося к
тимидину
18 связей



Вариант метки Cy5 с
линкером от компании
Lumiprobe крепящегося
к тимидину.
25 связей

Тимин

Cy3

Cy5

Цели и задачи

Оценить влияние молекулярного окружения на эффективности FRET с использованием метода молекулярной динамики.

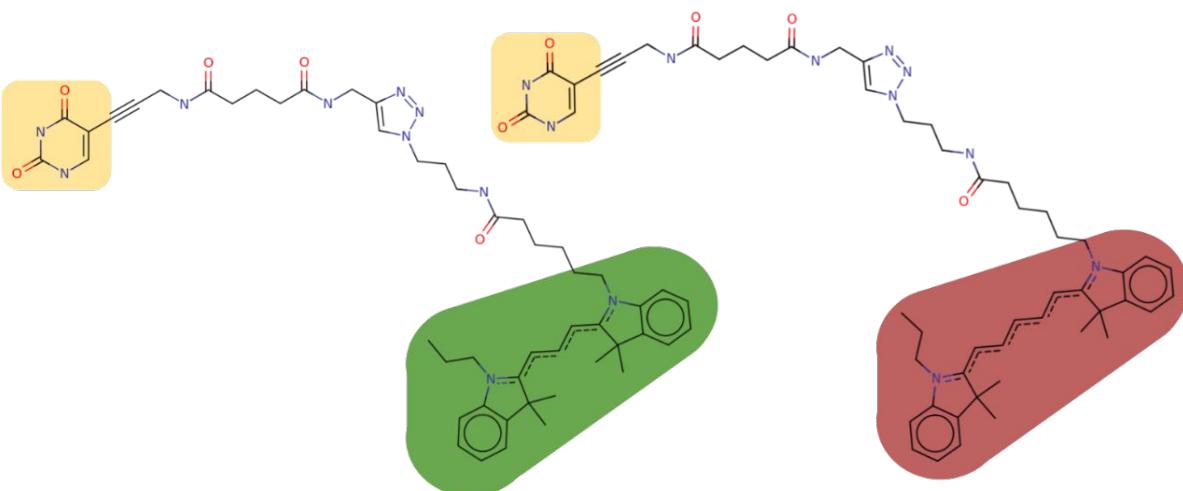
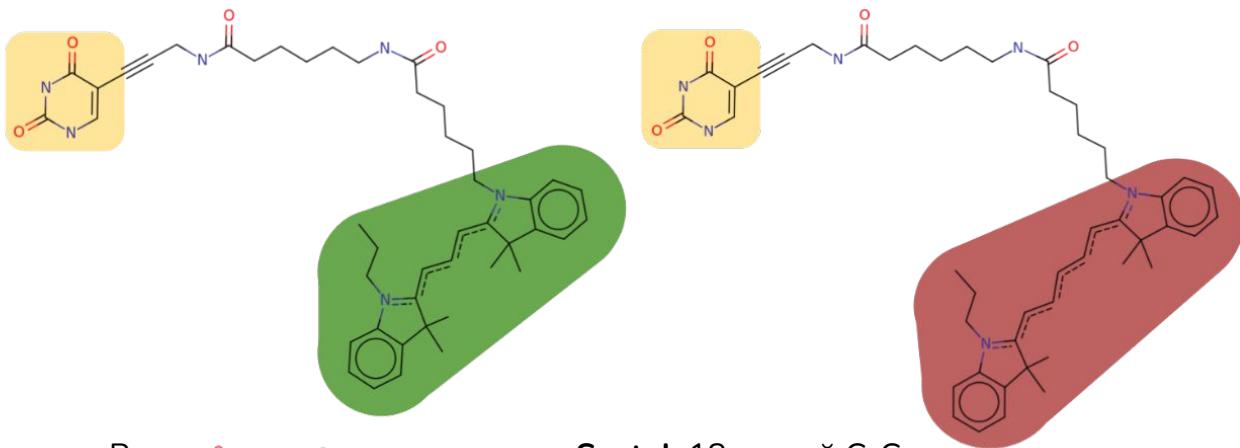
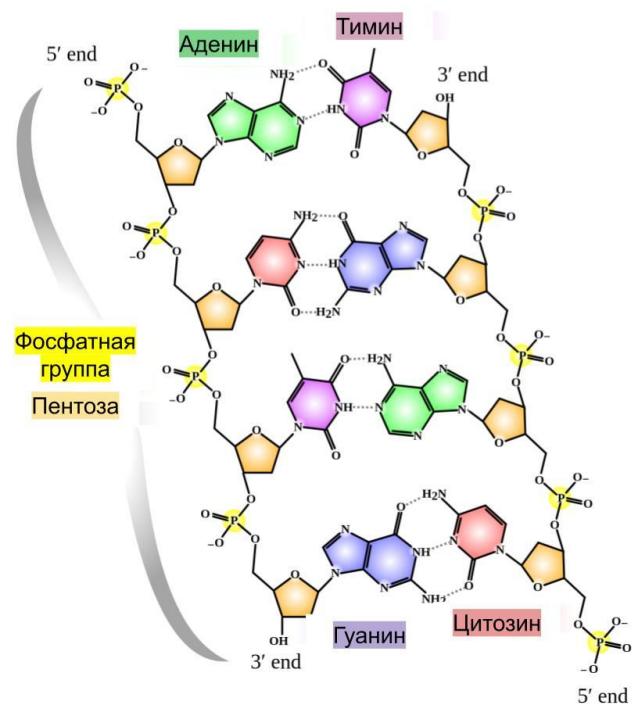
- Составить протокол для генерации файлов, которые описывают механику движения атомов внутри молекулы и распределение парциальных зарядов. (необходим для метода МД)
- Рассчитать молекулярную динамику флуорофоров в комплексе с ДНК и использовать полученные траектории для расчета молекулярного моделирования
- Оценить влияние факторов окружения (концентрация ионов, тип воды) на динамику флуоресцентных меток
- Оценить время вращательной диффузии меток
- Рассчитать теоретические значения эффективности переноса энергии

Объект исследования

Тимин

Cy3

Cy5



Методы



GROMACS

Marvin Sketch

Ascure

PsiRESP

Модели воды:

- TIP3P
- OPC

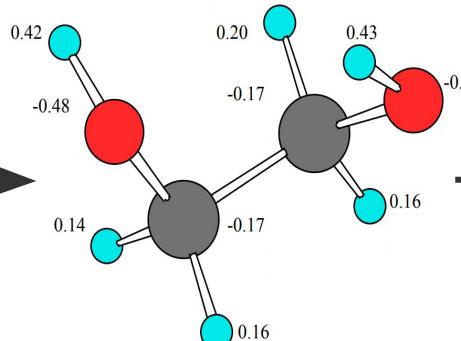
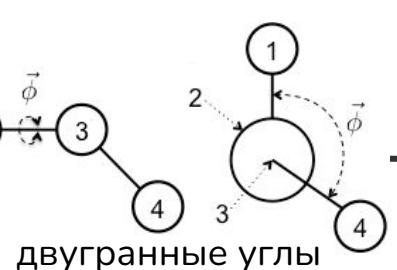
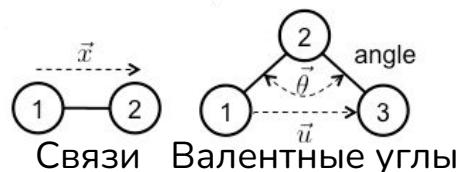
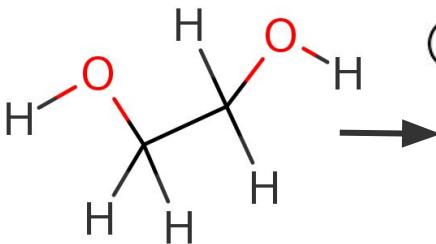
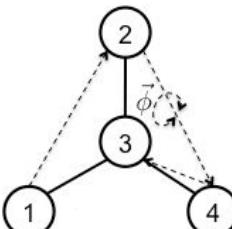
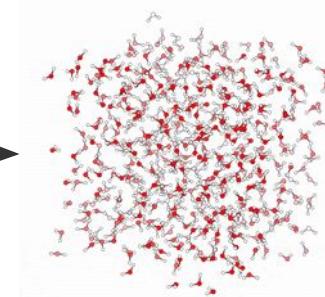


Схема протокола
параметризации меток



углы выхода из плоской группы



Концентрации

- ионов:
- 0,15 М
 - 0,30 М
 - 1,00 М

Влияние ионной силы на локализацию флуорофора

Распределение центра флуорофора Cy3 Syntol
относительно ДНК

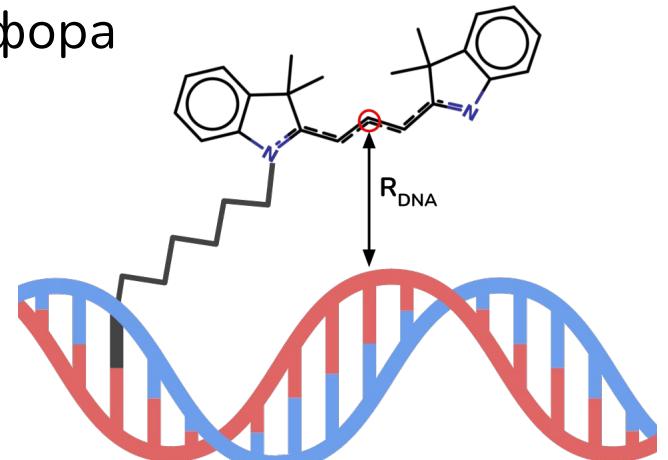
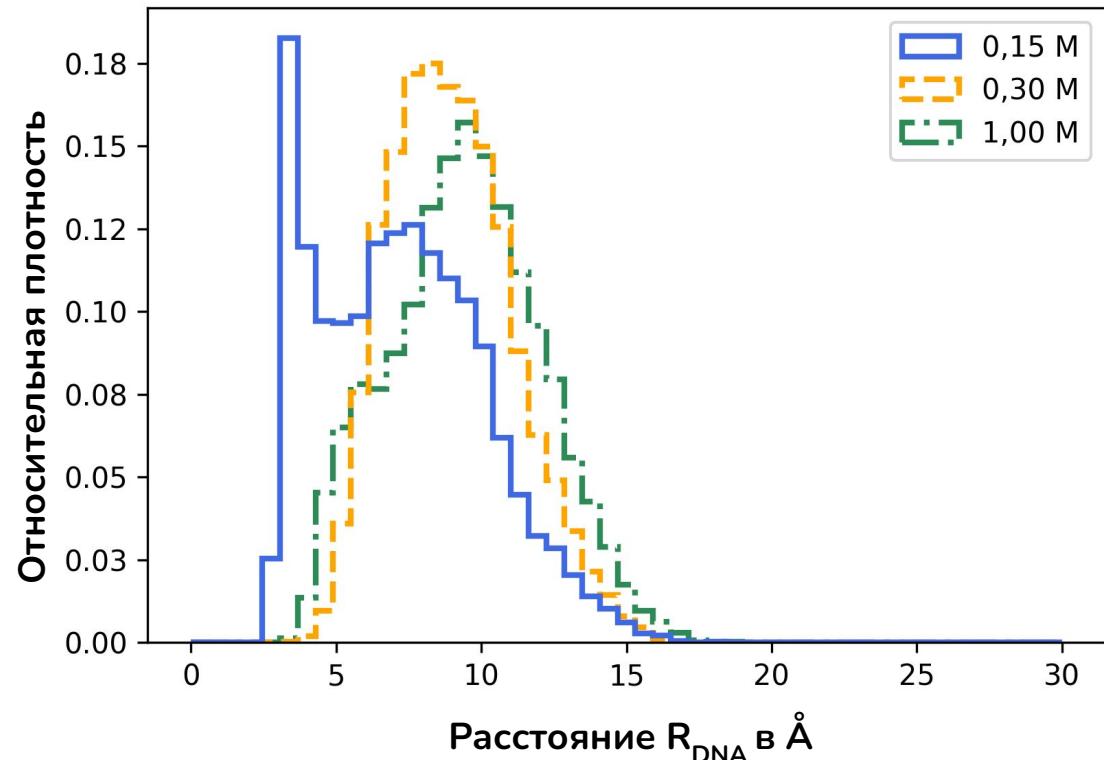
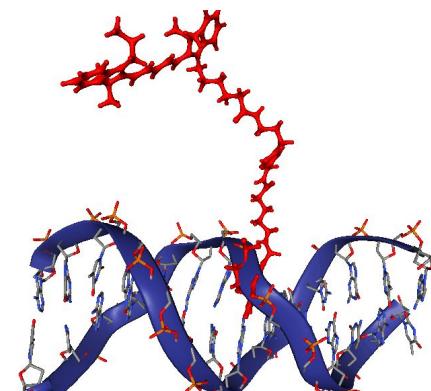


Схема расчета расстояния от метки до ДНК



Cy5 Lumiprobe взаимодействие с малой бороздкой В ДНК, конц. ионов 0,15 М

Оценка вращательной диффузии на примере флуорофора Syntol Cy3

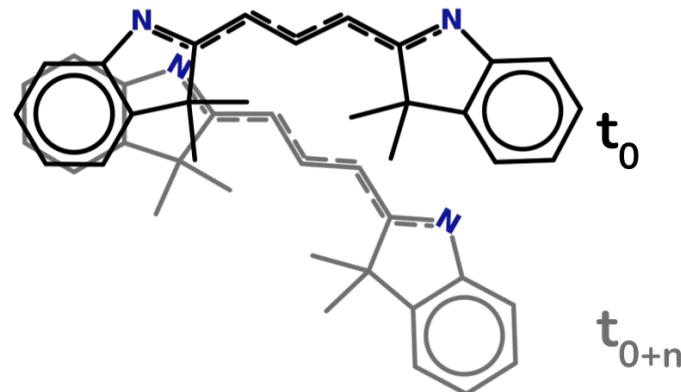
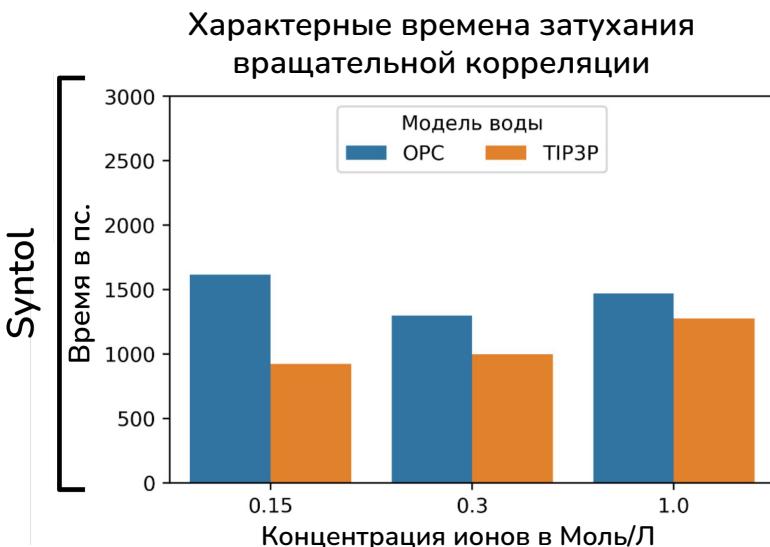
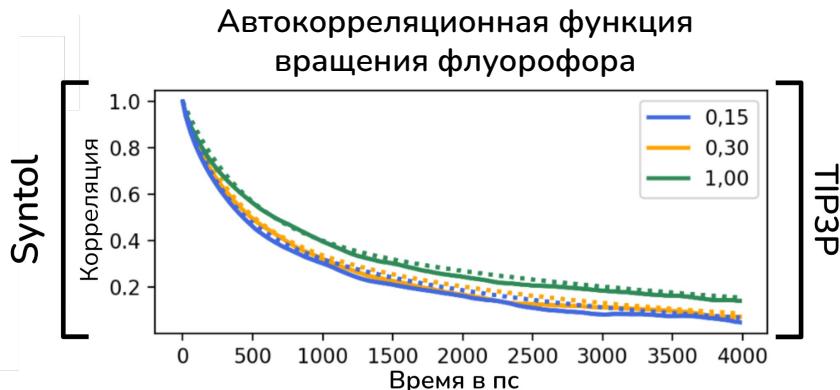


Схема позиционирования флуорофора в момент времени t_0 и t_{0+n}

Времена затухания функций автокорреляции на **е** сопоставимы с временами жизни флуоресценции (порядка нс.)

При расчете эффективности FRET уместно использовать $\langle \kappa^2 \rangle$, а не моментальные значения κ^2

Значений эффективность FRET полученные методом молекулярного моделирования

0 2 4 Су3

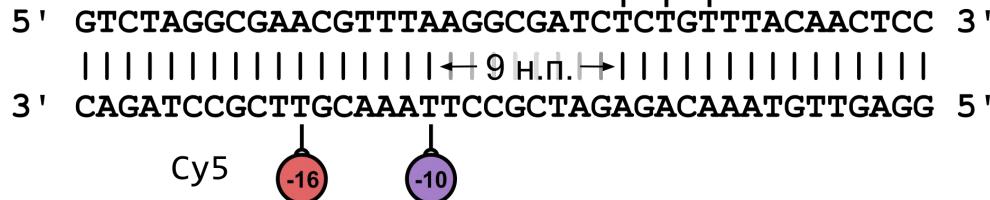
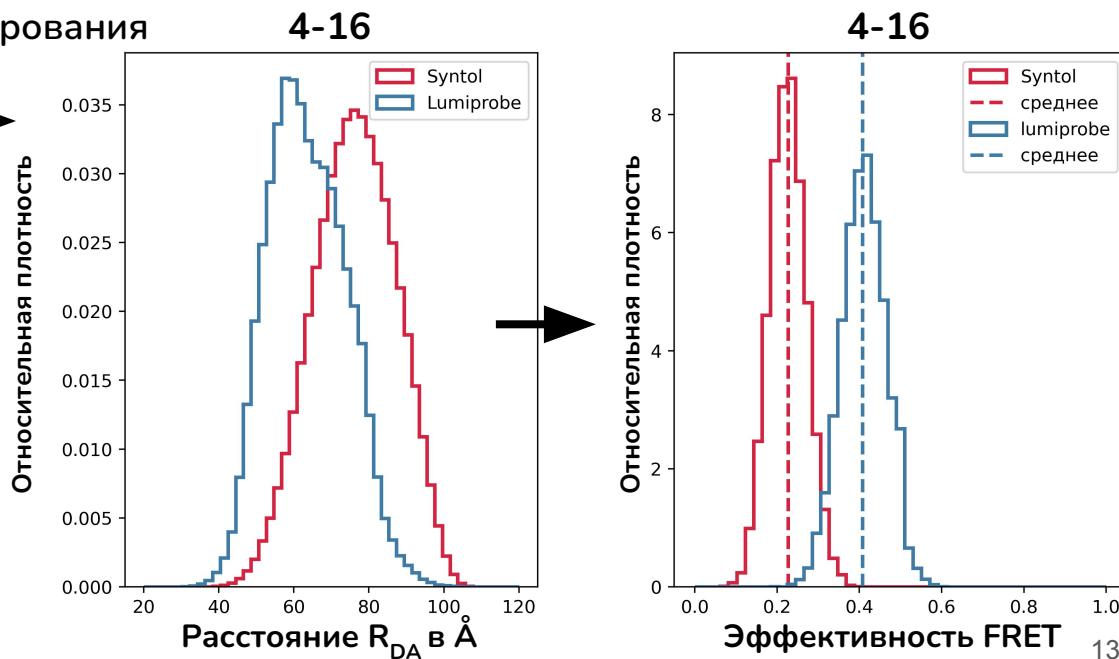
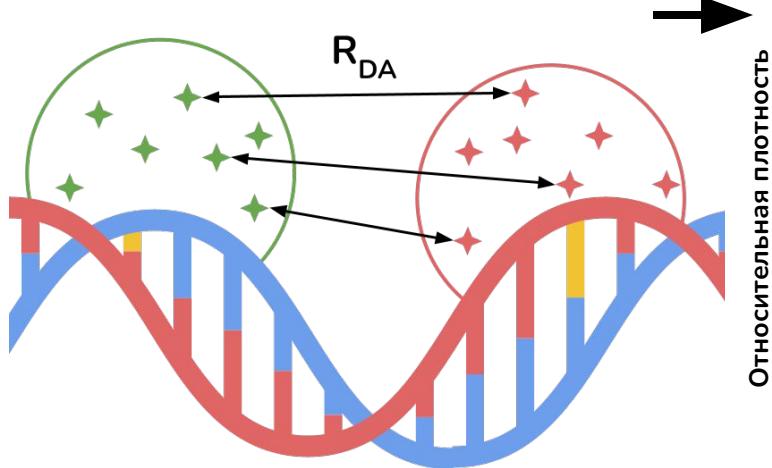
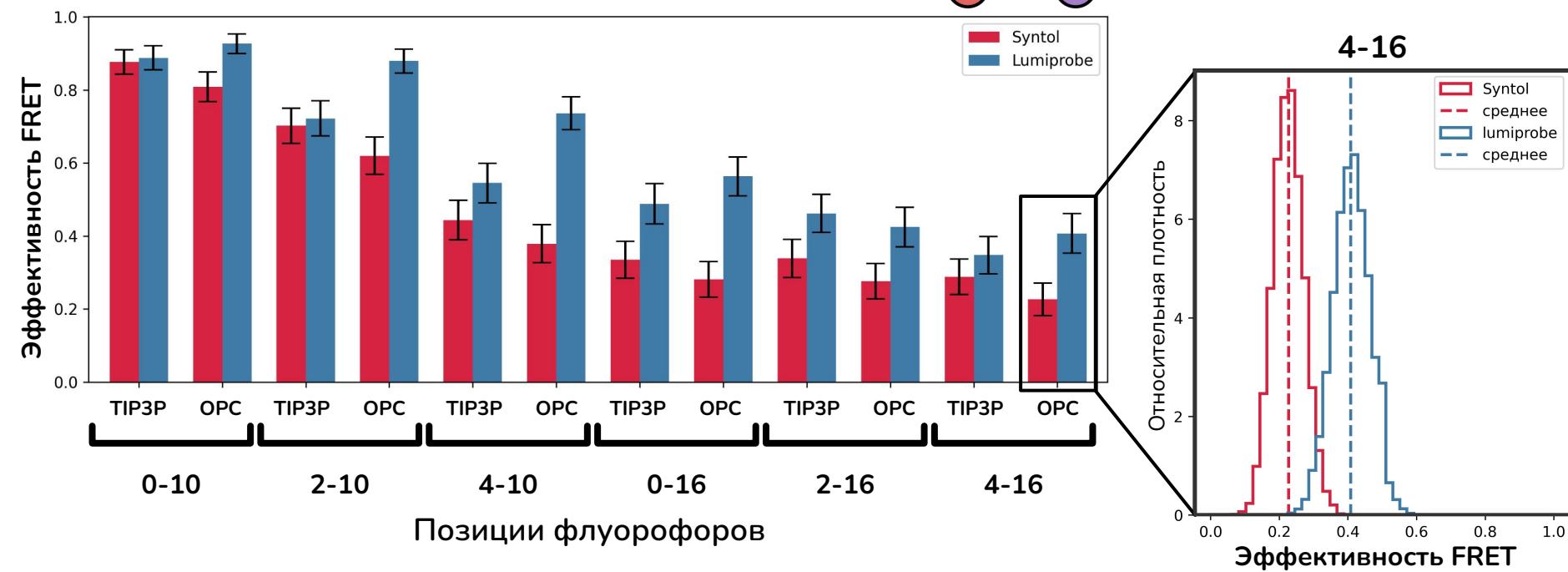
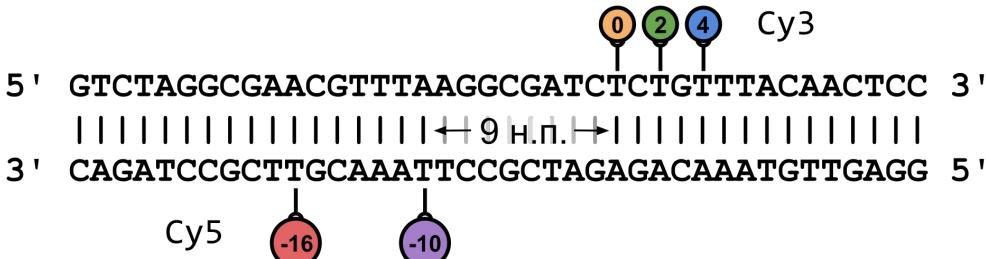


Схема протокола молекулярного моделирования



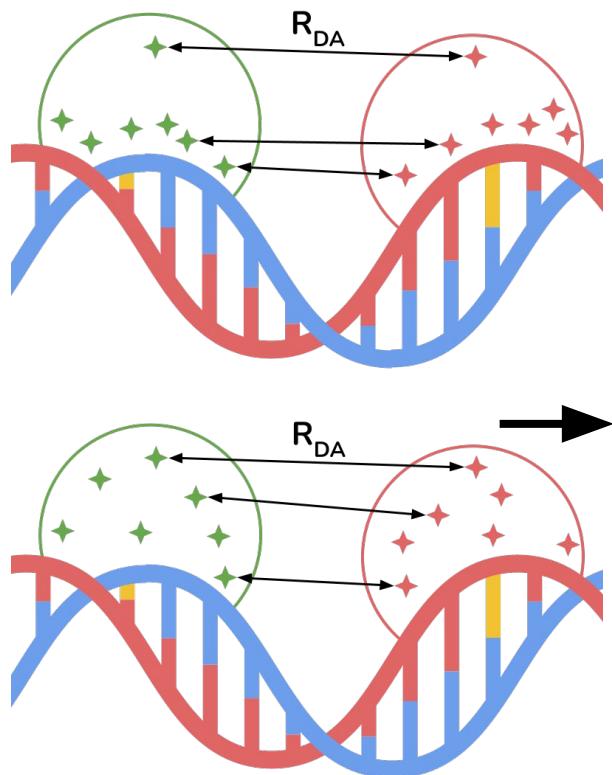
Зависимость эффективности FRET от позиций введения меток



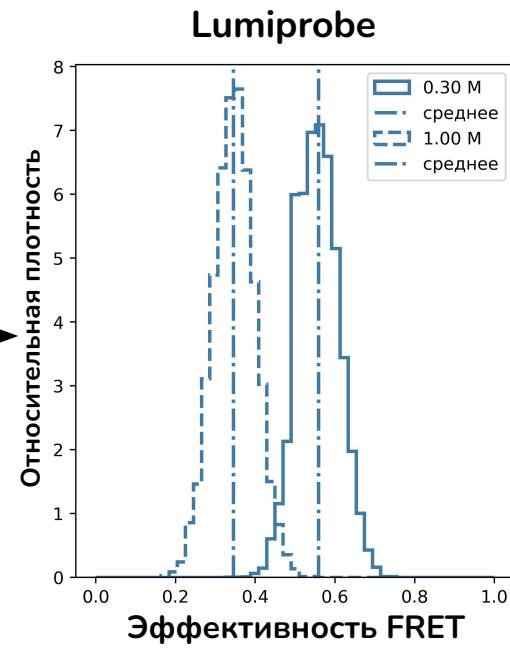
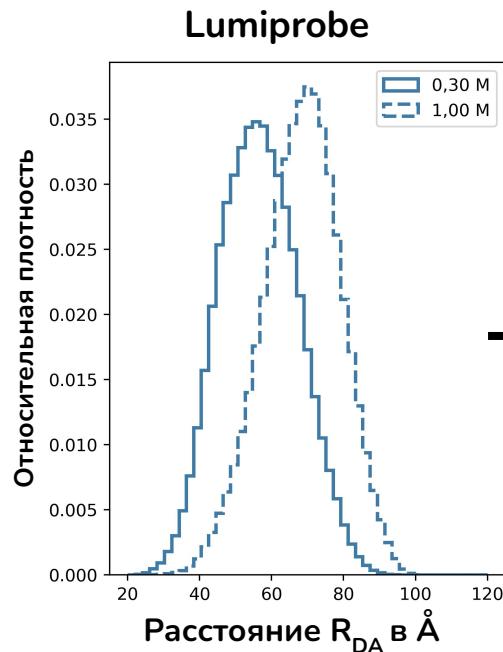
Зависимость эффективности FRET от ионной силы раствора

Концентрации

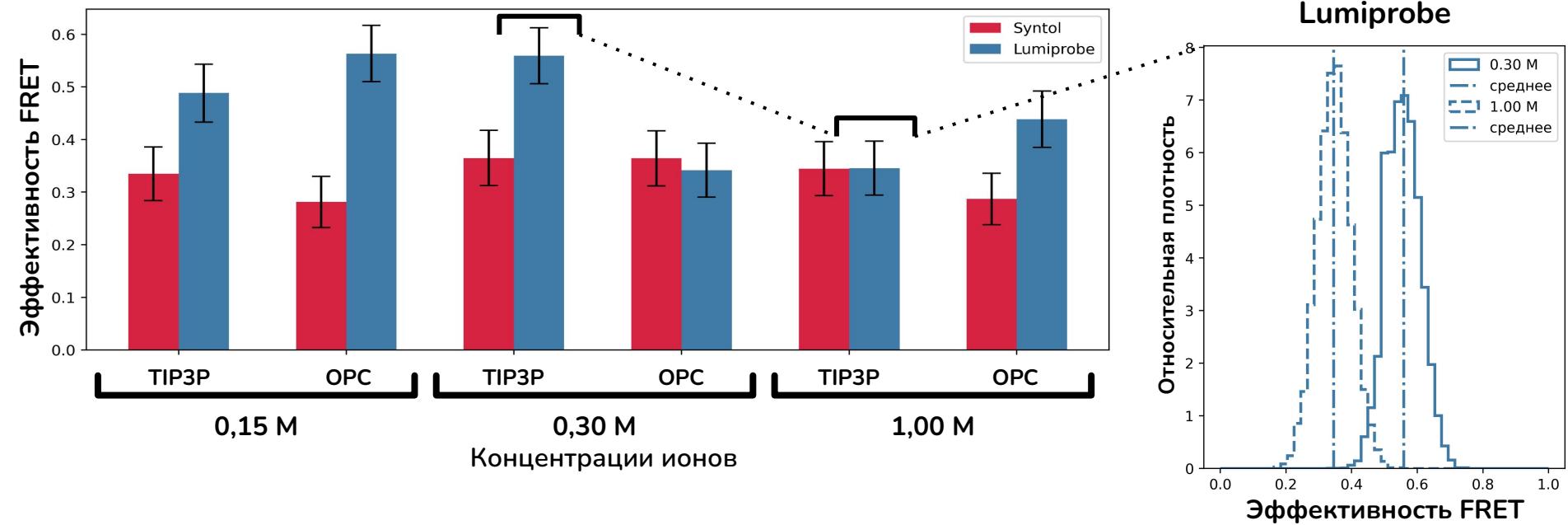
Ионов



Увеличение ионной силы уменьшает время
контактирования метки с ДНК



Зависимость эффективности FRET от ионной силы раствора



Результаты

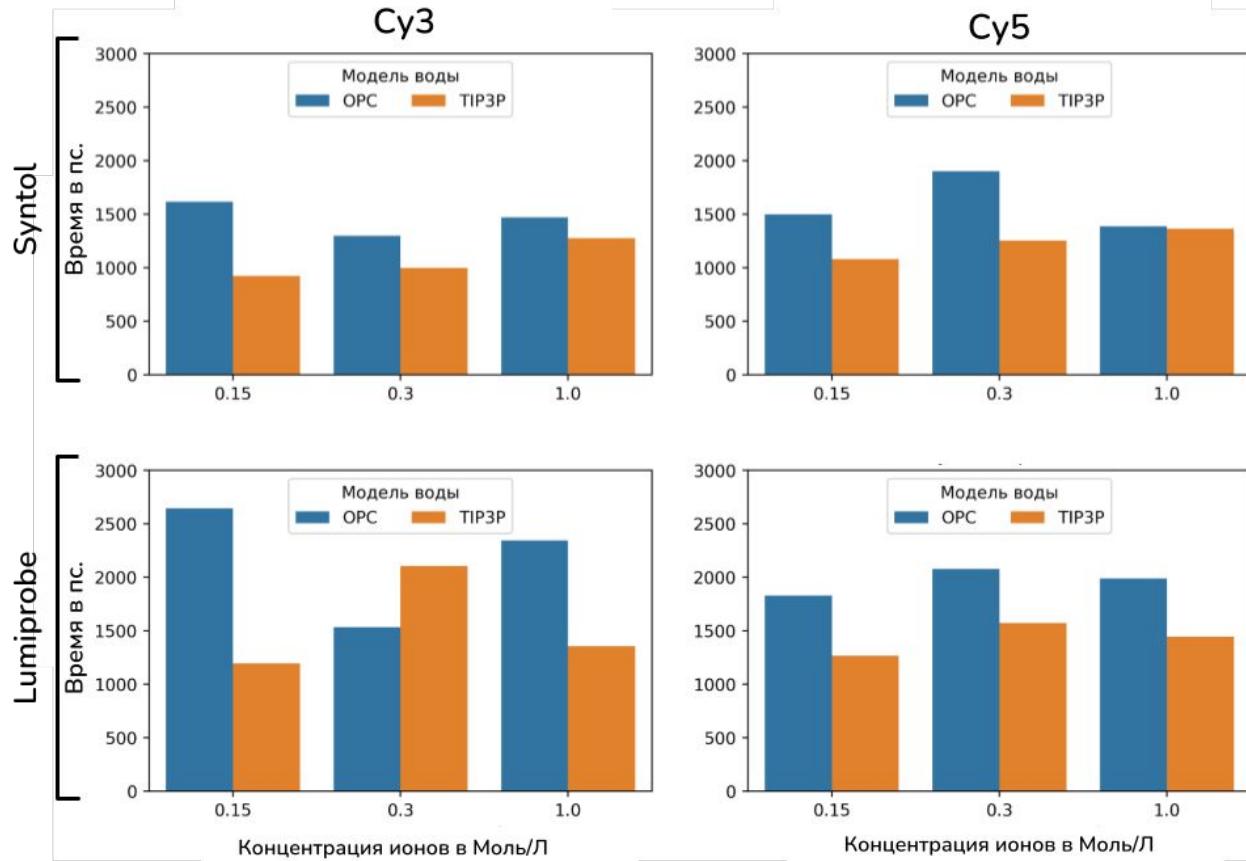
1. Составлен протокол генерации файлов (топологии) описывающих движения атомов внутри молекулы и распределение парциальных зарядов. Разработанные наборы параметров не противоречат литературным данным.
2. Метод молекулярной динамики позволяет выявить влияние молекулярного окружения и типа прикрепления меток на эффективность ФРПЭ.
3. Моментальные значения эффективности ФРПЭ значительно зависят от способа введения флуоресцентной метки в ДНК. Такие значения нельзя использовать для прямой интерпретации распределения расстояний между точками прикрепления донорно-акцепторной пары.
4. Концентрации ионов в моделируемых системах могут уменьшить времена контактирования флуорофоров со структурой В ДНК, но не влияют на значения вращательной диффузии флуорофоров.
5. Константа скорости вращательной диффузии флуоресцентных меток Су3 и Су5 сопоставима с константой скорости переноса энергии и зависит от модели воды при моделировании молекулярной динамики.

Алгоритм подсчета E FRET

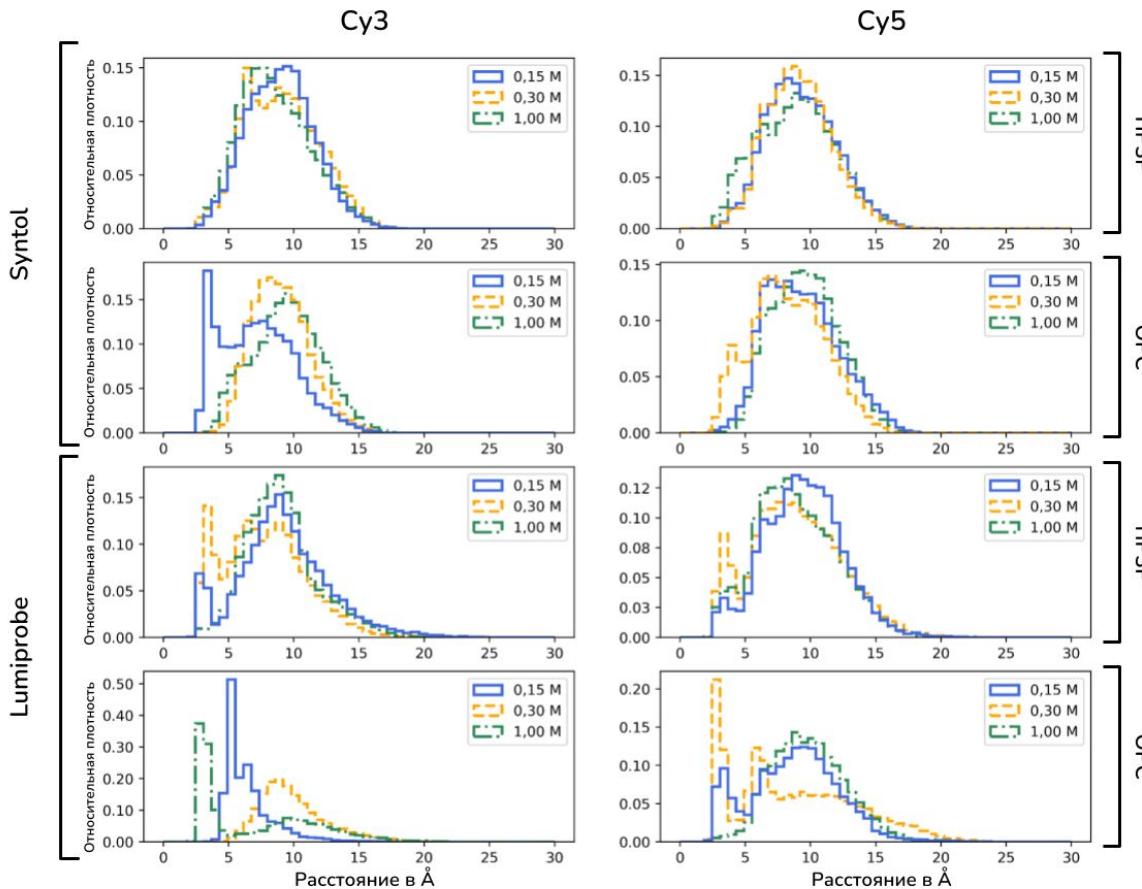
n	2	5	67	23	43
R(DA)	44	32	40	37	46
E	0,57	0,65	0,60	0,62	0,56
Кол-во фотонов	0	1	1	1	0
E итоговое	0,6				

Оценка вращательной диффузии

Времена затухания корреляции вращательной диффузии

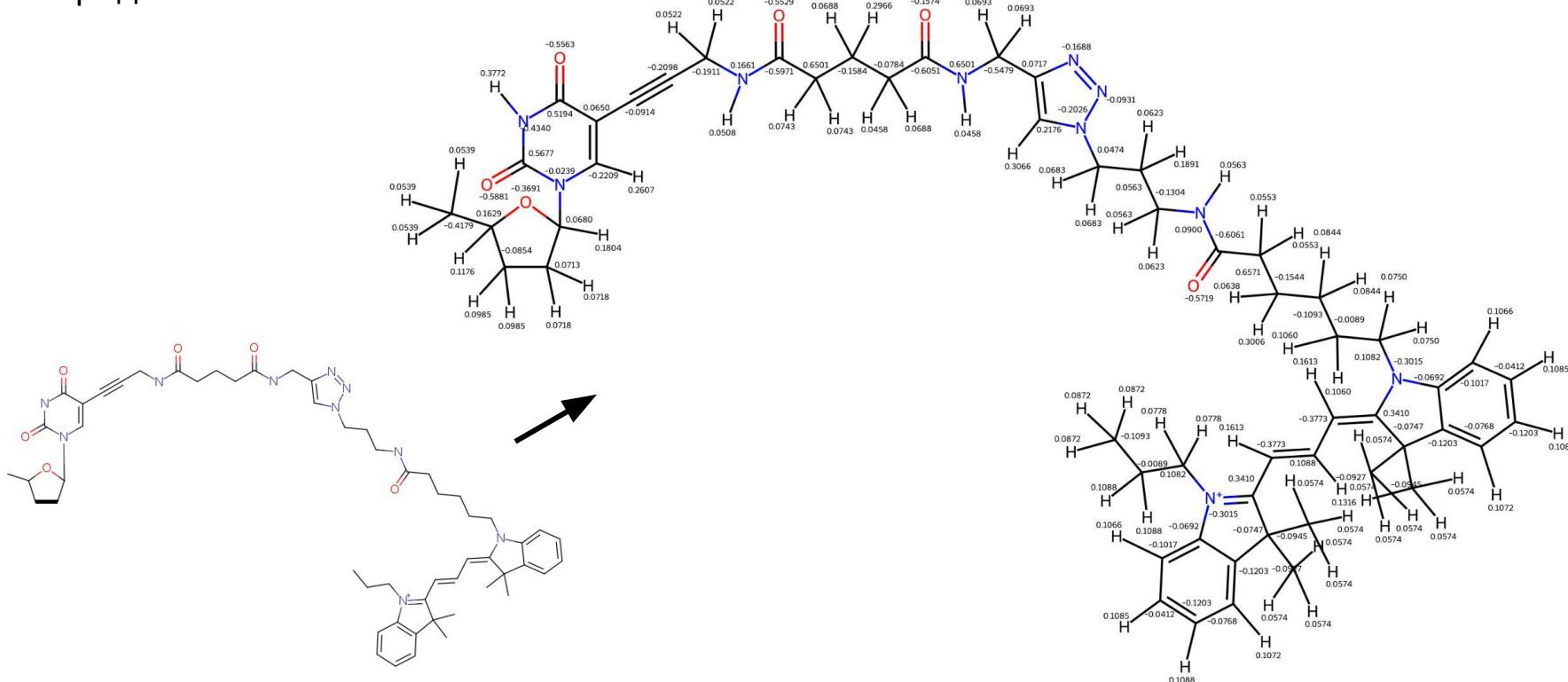


Распределение центра метки относительно ДНК



Параметризация меток

На основе линкеров предлагаемых фирмами Syntol и Lumiprobe были созданы файлы топологии. При помощи RESP (Restrained Electrostatic Potential) рассчитаны парциальные заряды меток.



$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0}\right)^6}$$

E — эффективность FRET, R_0 — расстояние при котором эффективность FRET равняется 50%,
 R_{DA} — расстояние между донором и акцептором.

$$R_0^6 = \frac{0.529 \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda)}{N \cdot n^4}$$

κ^2 — ориентационный фактор, Φ_D — квантовый выход донора, n — показатель преломления среды, $J(\lambda)$ — интеграл спектрального перекрывания, N — число Авогадро.

$$E = \frac{F_a}{F_a + \gamma_d F_d}$$

E — эффективность FRET, F_a — флуоресценция акцептора, F_d — флуоресценция донора, коэффициент γ_d — коэффициент детекции

$$\gamma_d = \frac{\Phi_a k_a}{\Phi_d k_d}$$

γ_d — коэффициент детекции, который учитывает квантовый выход донора (Φ_d) и акцептора (Φ_a) и различия в эффективностях каналов детекции фотонов (k)

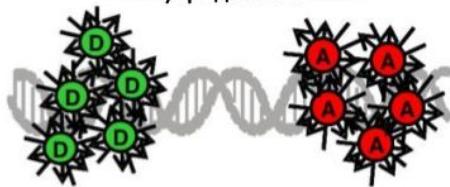
Режимы усреднения при теоретическом расчете эффективности FRET

Статическое усреднение



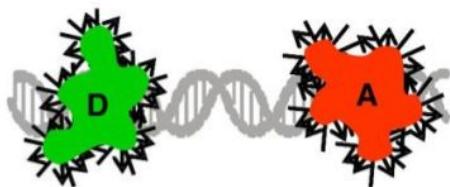
Время жизни возбужденного состояния много меньше времени вращения флуорофоров

Изотропное
(полудинамическое)
усреднение



Время жизни возбужденного состояния сопоставимо
или больше времени вращения флуорофоров

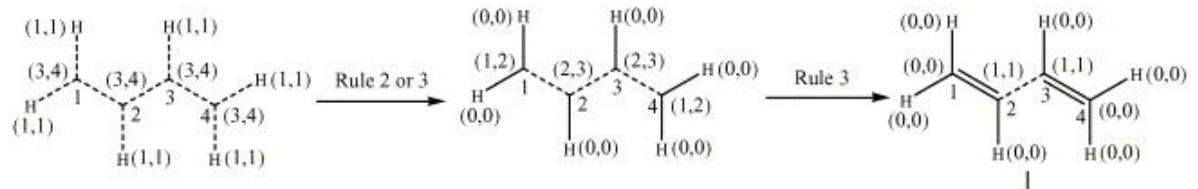
Динамическое усреднение



Время жизни возбужденного состояния много больше
времени диффузии метки

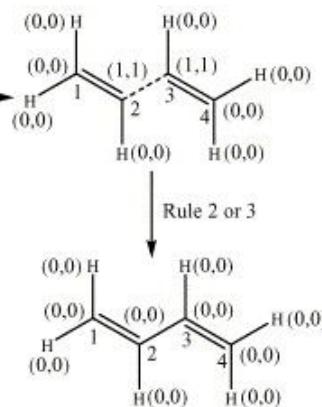
Antechamber

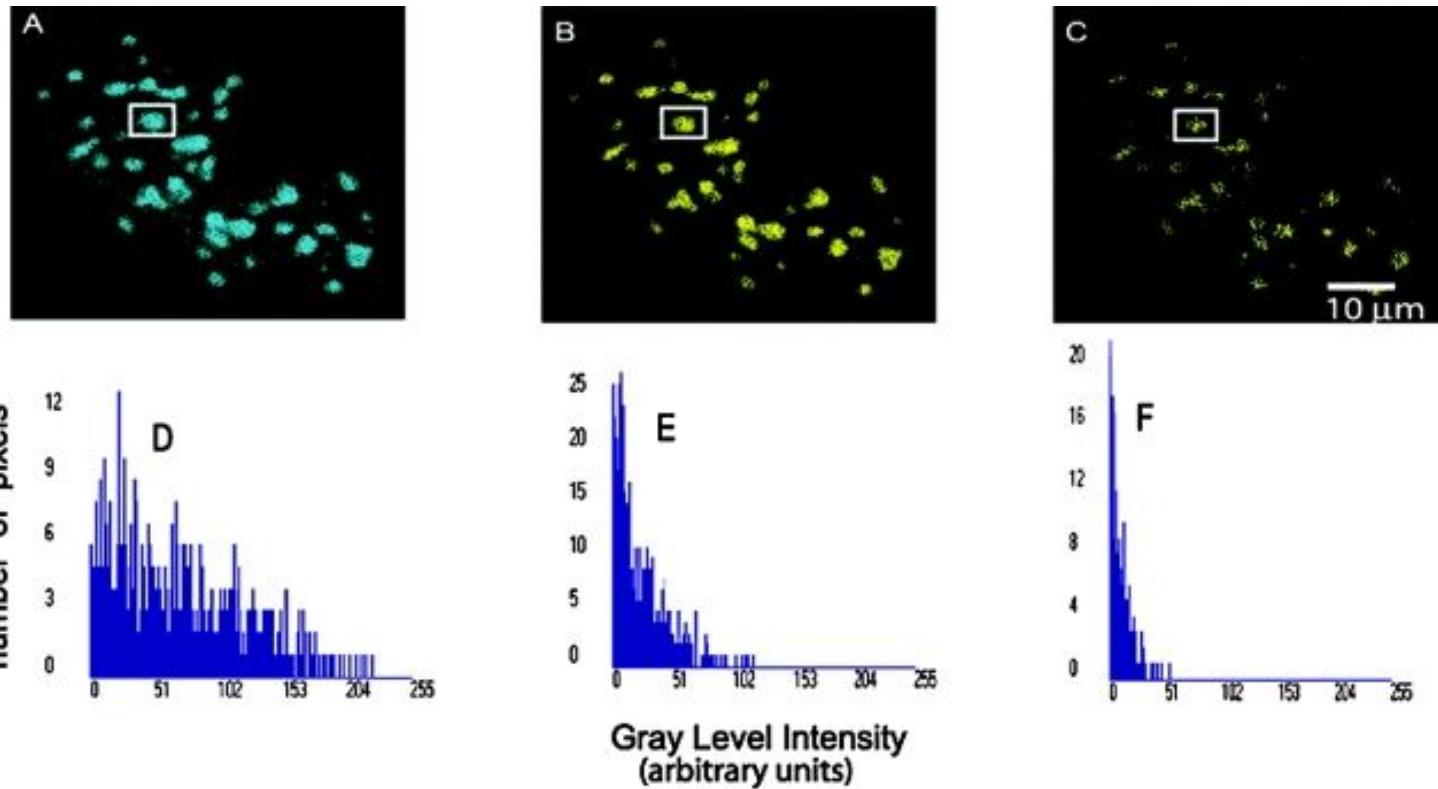
Concept/term	Symbol	Description
Bond type perception		
Atomic connectivity	con	Number of bonded atoms
Atomic valence	av	Sum of bond orders of an atom's bonds
Atomic penalty score	aps	Penalty score for an atomic valence, 0 if av is the most desirable value
Total penalty score	tps	Total atomic penalty score for a molecule



List of the Charge Methods

charge method	abbre.	index		charge method	abbre.	index
RESP	resp	1		AM1-BCC	bcc	2
CM2	cm2	3		ESP (Kollman)	esp	4
Mulliken	mul	5		Gasteiger	gas	6
Read in Charge	rc	7		Write out charge	wc	8





Локализация белков CFP- и YFP-C/EBP α, экспрессированных в клетках GHFT1-5 гипофиза живых мышей, изучена с помощью микроскопии Bio-Rad Laboratories MP-FRET.