

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

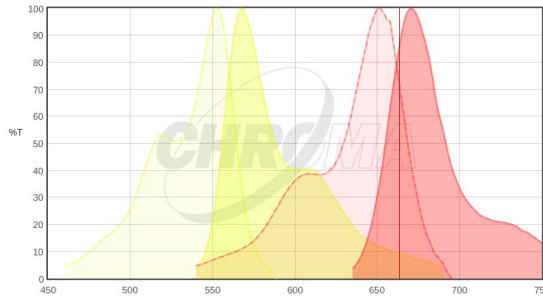
Выпускная квалификационная работа бакалавра

# Оценка эффективности ферстеровского резонансного переноса энергии методами молекулярного моделирования

Кристовский Николай Всеволодович,  
студент 426 группы  
Научный руководитель:  
к.ф.-м.н. Армеев Григорий Алексеевич

Москва 2021

# Ферстеровский резонансный перенос энергии



Время жизни  
возбужденного  
состояния  
S1 –  $10^{-10}$ –  $10^{-7}$  сек.  
( порядка наносекунд )

Спектры поглощения и испускания фотонов: желтый - Cu3; красный - Cu5,  
источник: <https://www.chroma.com/>

$$E = \frac{F_a}{F_a + \gamma_d F_d} \quad (1)$$

E — эффективность FRET,  $F_a$  — флуоресценция акцептора,  
 $F_d$  — флуоресценция донора, коэффициент  $\gamma_d$

Формула расчета экспериментальных значений  
эффективности FRET

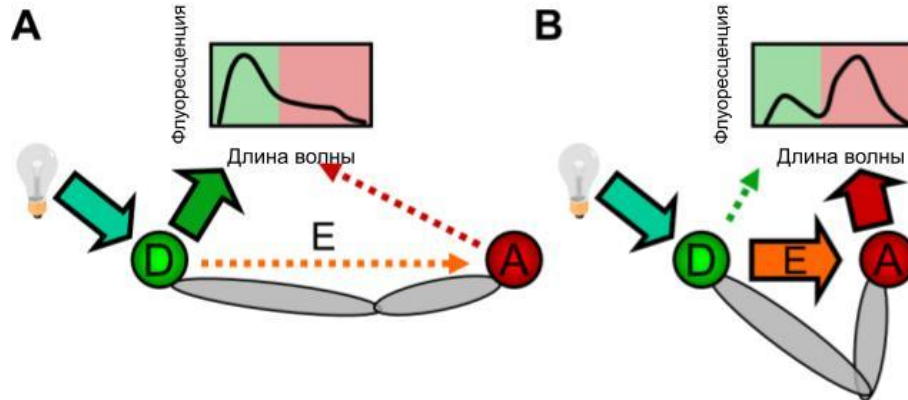


Схема Ферстовского резонансного переноса энергии между донорно-акцепторной парой

$$E = \frac{1}{1 + \left( \frac{R_{DA}}{R_0} \right)^6} \quad (2)$$

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

Формула расчета ожидаемой эффективности  
FRET

# Примеры линкеров для прикрепления флуорофоров к ДНК

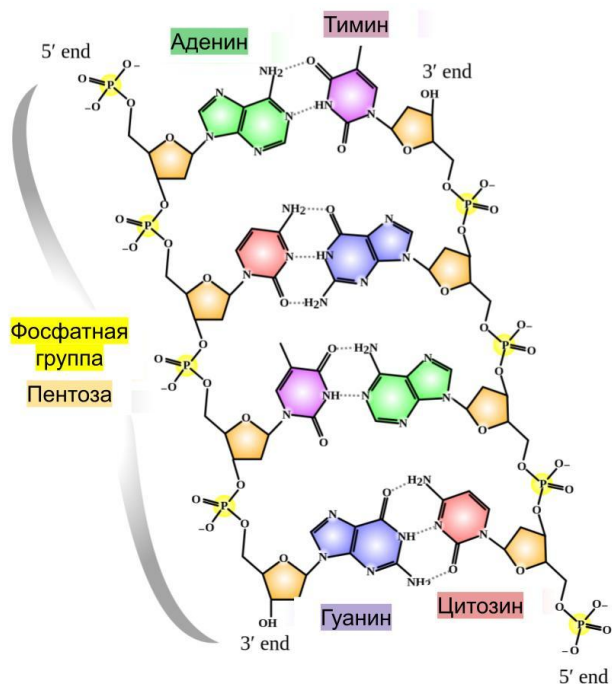
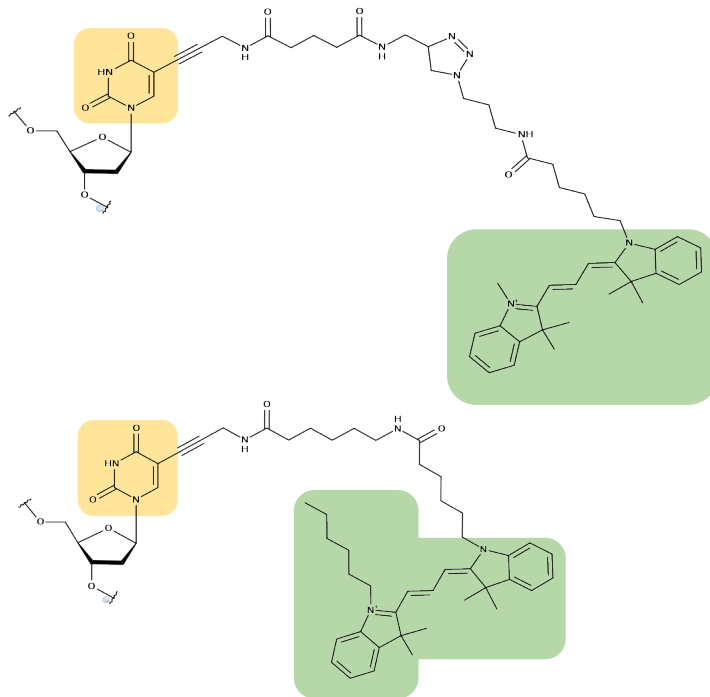


Схема строения ДНК

Тимидин

Су3



Вариант метки Су3 с линкером от компании **Lumiprobe** крепящегося к тимидину.  
25 связей



Вариант метки Су3 с линкером от компании **Syntol** крепящегося к тимидину  
18 связей

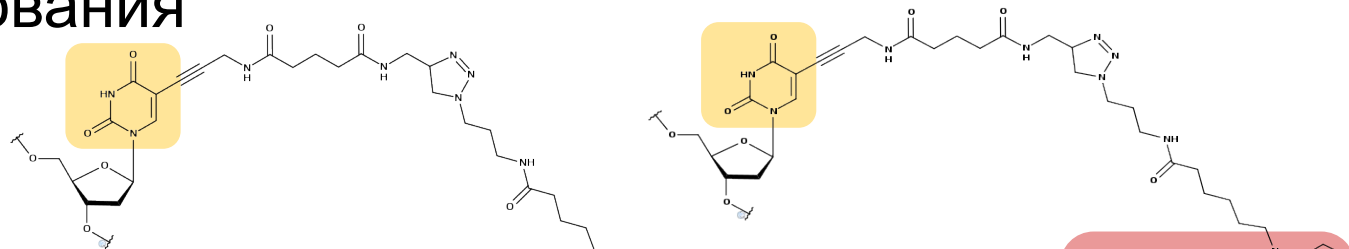
Без точного понимания поведения флуоресцентной метки в пространстве, невозможно использовать FRET для точного измерения расстояния между точками прикрепления меток

# Цели и задачи

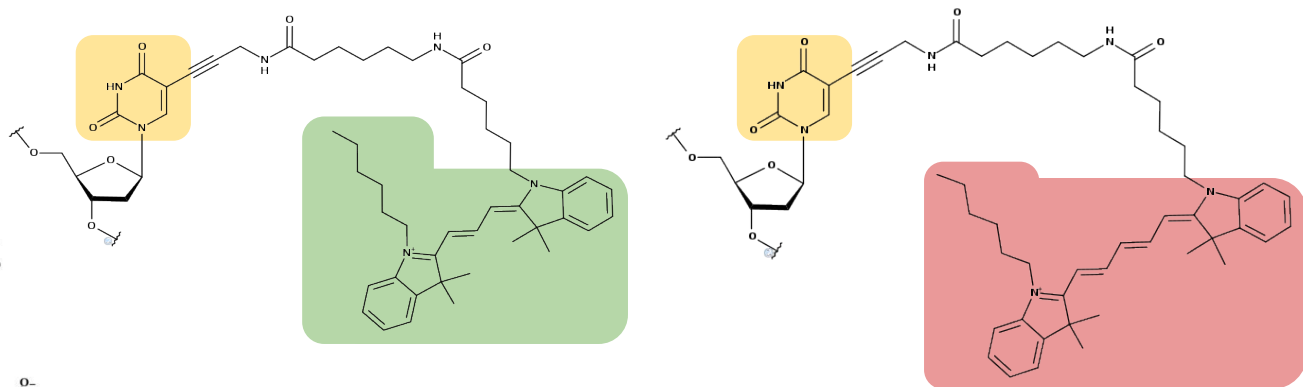
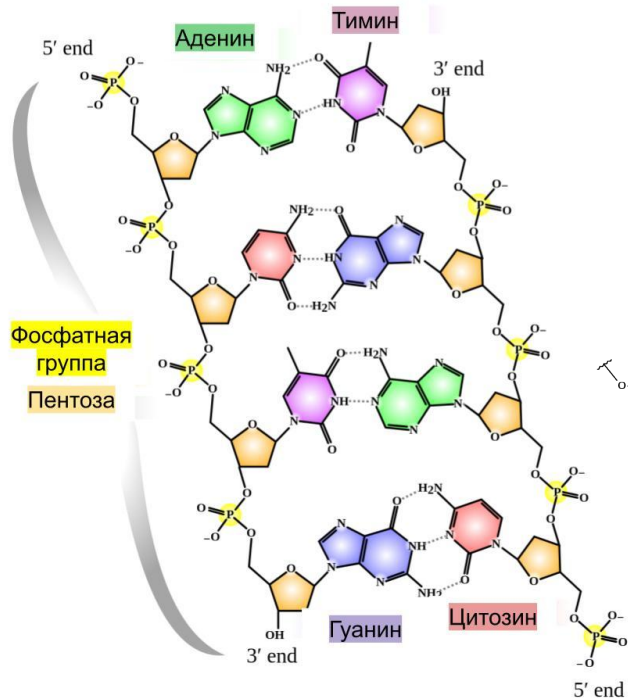
- Разработать метод для оценки ожидаемой эффективности FRET с использованием приближения доступного объема для молекулярной модели флуоресцентно-меченой ДНК.
  - Создать модели меток с двумя разными типами линкеров (молекулярных адаптеров для прикрепления флуорофоров)
  - Сгенерировать библиотеки конформеров для полученных моделей (методы сканирования пространства)
  - Используя библиотеку конформеров:
    - Исследовать распределение расстояний от точки прикрепления линкера до центра метки
    - Разработать метод взвешивания огрубленной модели для воспроизведения пространственного распределения полноатомной модели
  - Сравнить модели с экспериментальными результатами

# Объект исследования

- Су3
- Су5
- Тимидин



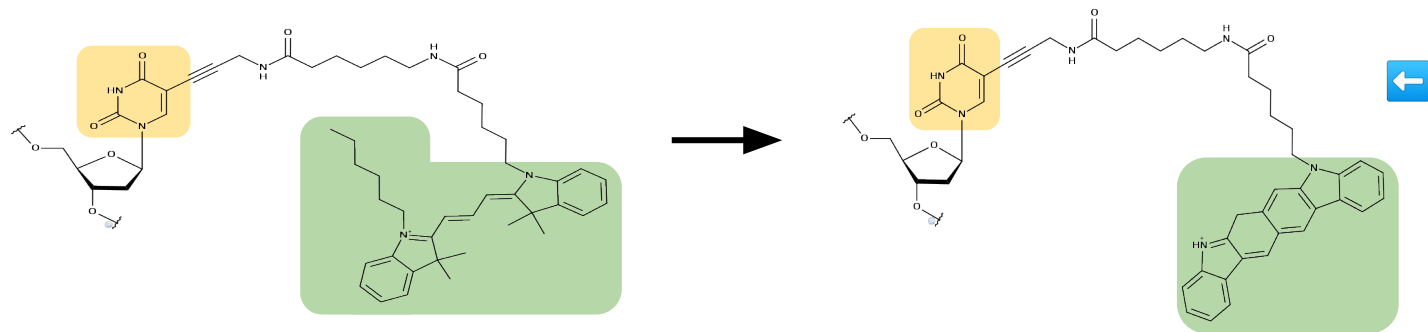
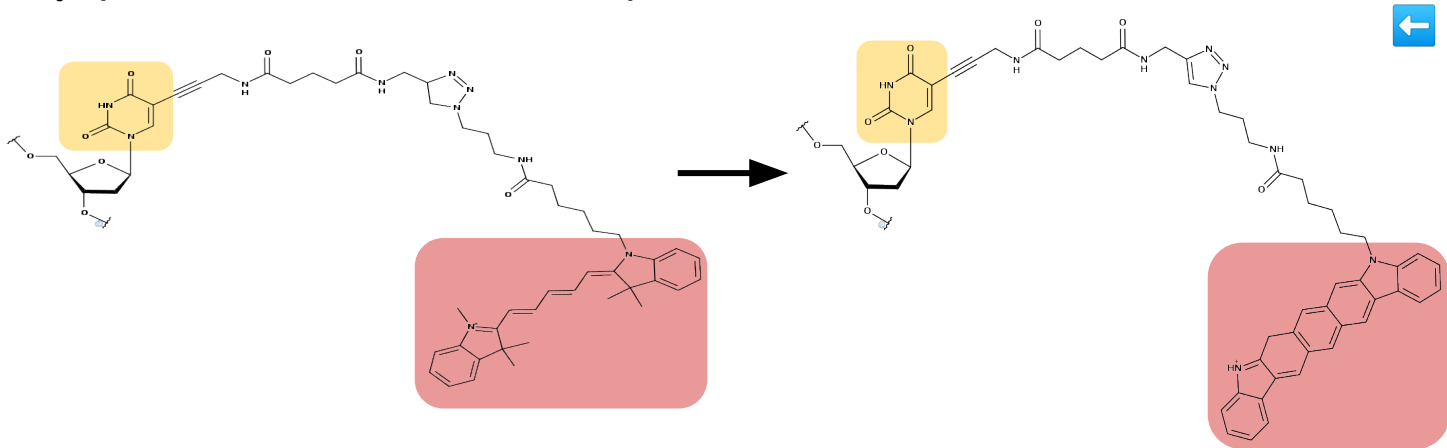
Вариант линкера от компании **Lumiprobe**, 25 связей C-C.



Вариант линкера от компании **Syntol**, 18 связей C-C.

# Создание моделей меток

На основе линкеров предлагаемых фирмами Syntol и Lumiprobe были созданы упрощенные модели меток при помощи ПО MarvinSketch.



# Создание библиотеки конформеров

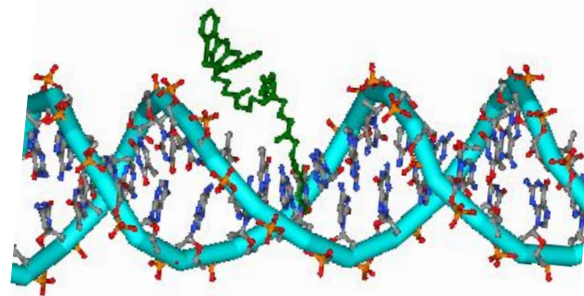
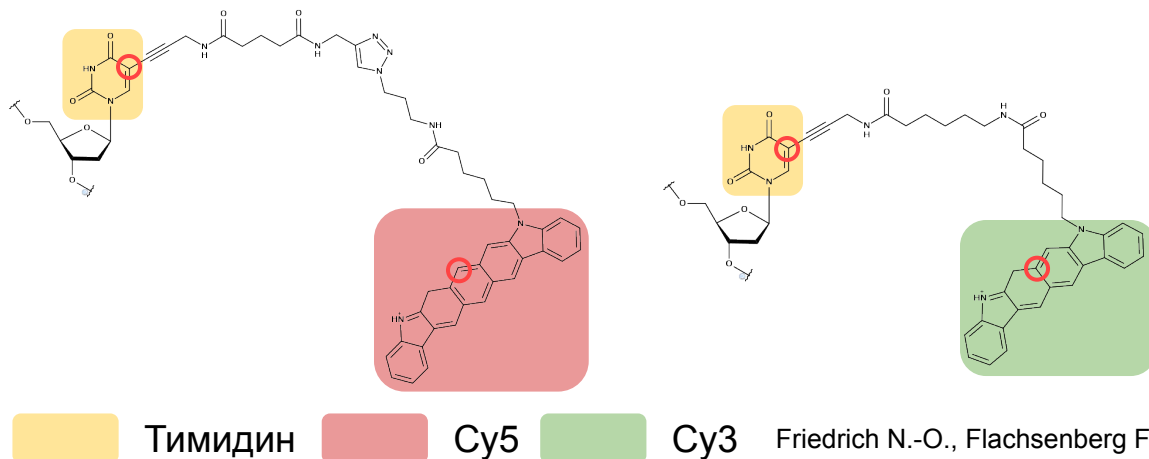
Для упрощенных моделей меток были сгенерированы выборки конформеров при помощи ПО Conformer.

Создан алгоритм, для моделирования пространства конформеров в комплексе с ДНК и отбора не контактирующих с ДНК конформеров.

Для выборок отобранных конформеров средние расстояния от места прикрепления к нуклеотиду до центра молекулы флуорофора:

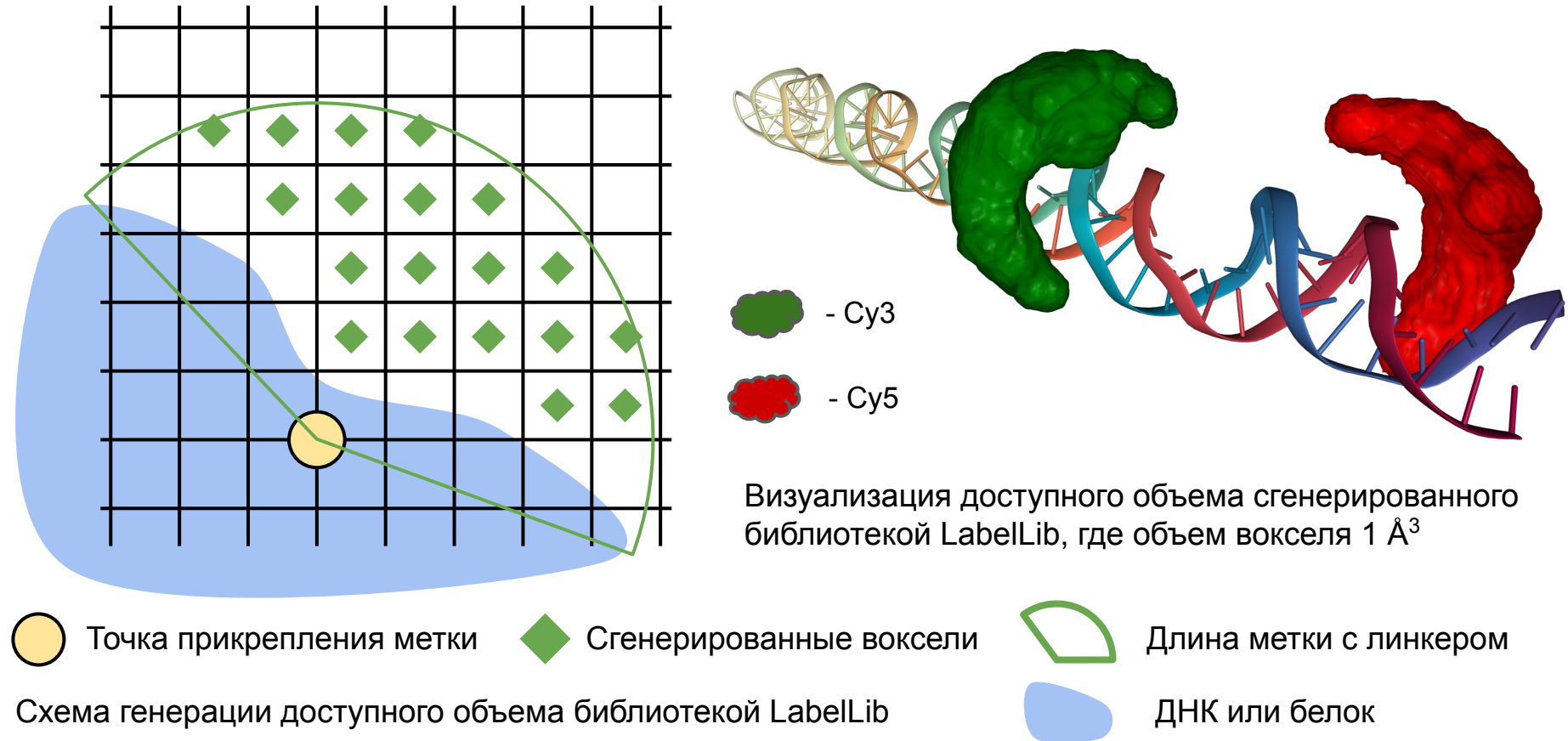
Syntol = 16.2, 16.7 Å;

Lumiprobe = 22.0, 22.5 Å



Визуализация библиотеки конформеров для модифицированной метки Cy5

# Labellib — библиотека для моделирования доступного объема





# Взвешивание карты распределения Labellib

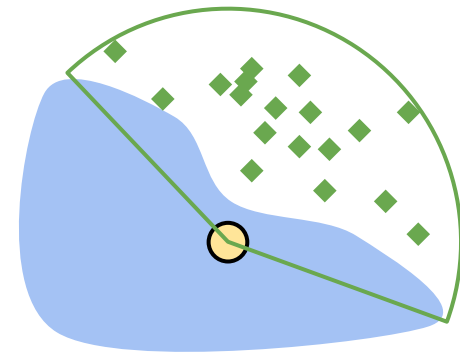
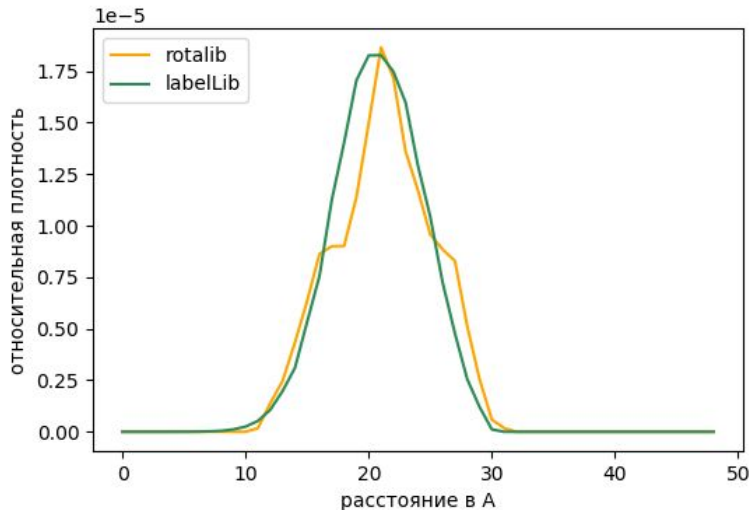


Схема распределения метки относительно точки прикрепления для пространства конформеров

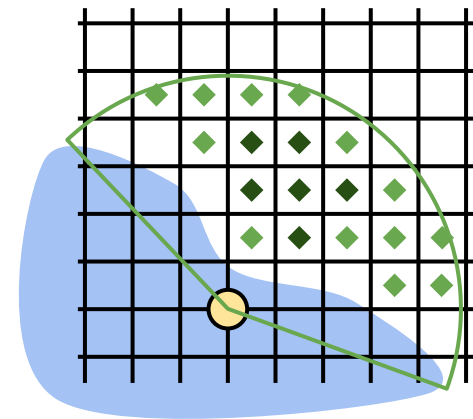


Схема карты распределения метки относительно точки прикрепления для библиотеки LabelLib с учетом функции взвешивания

Для пространства конформеров было рассчитано радиальное распределение центра метки от точки прикрепления. После чего, создавалась функция на основе Гауссовского распределения, которая повторяла распределение конформеров. Данная функция использовалась для присвоения весов вокселям.

- Точка прикрепления метки
- Позиции метки
- Длина метки с линкером
- ДНК

# Моделирование FRET на олигомерах ДНК

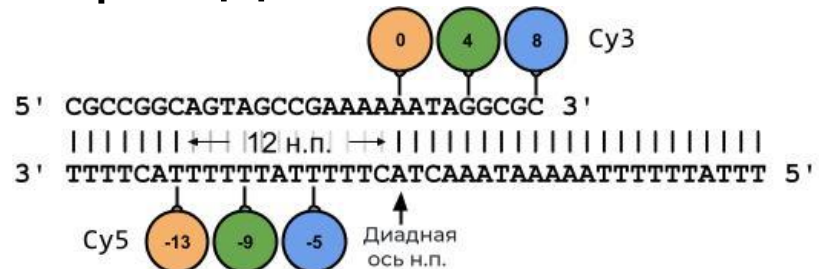
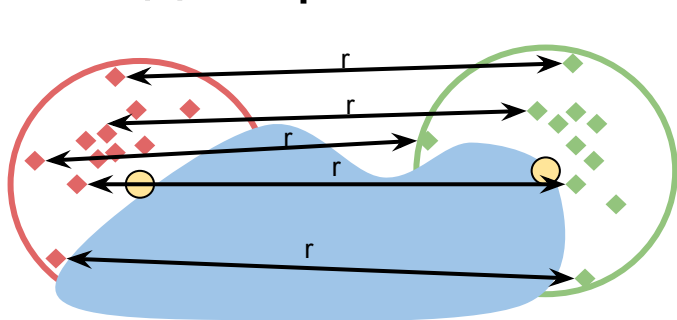
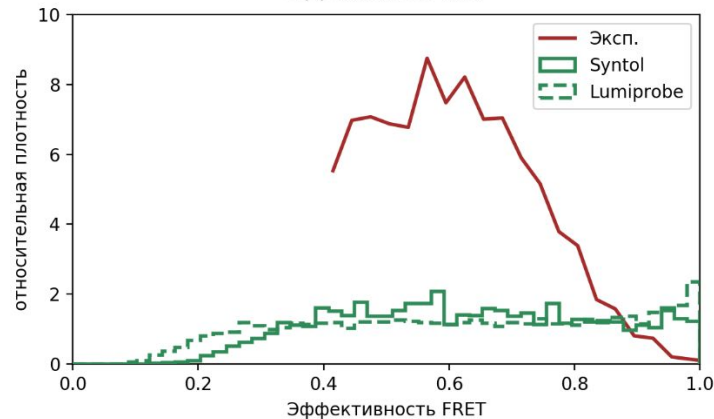
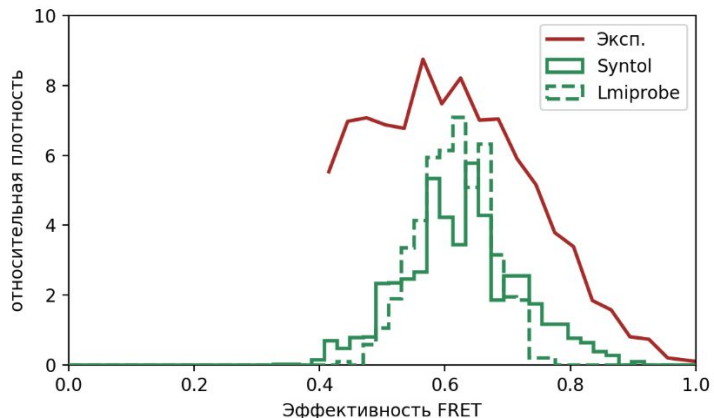


Схема расчета теоретических значений эффективности FRET

# Расчет эффективности FRET с учетом блуждания метки



Значения  
моментальный  
эффективности  
FRET

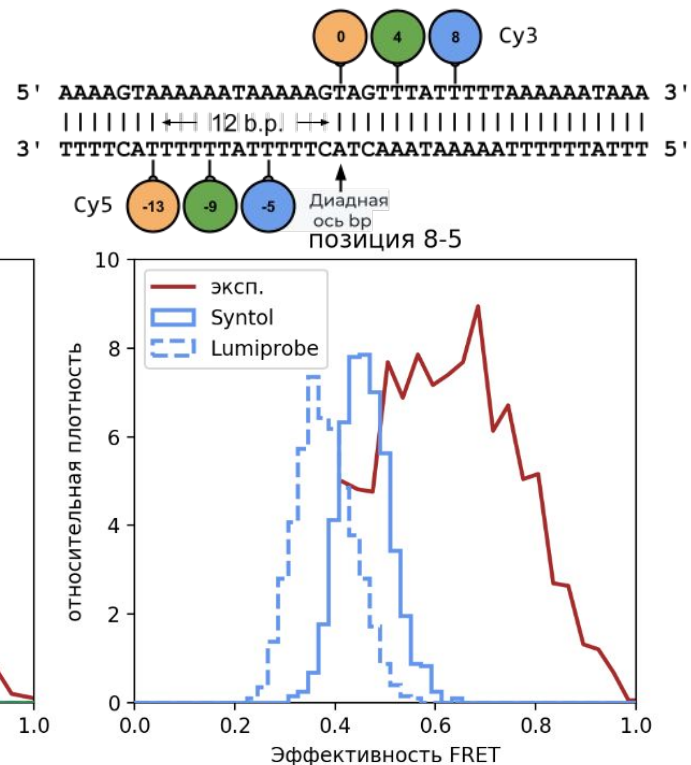
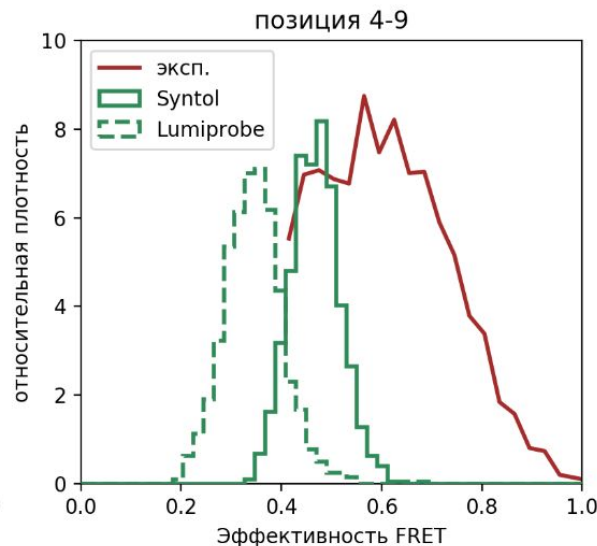
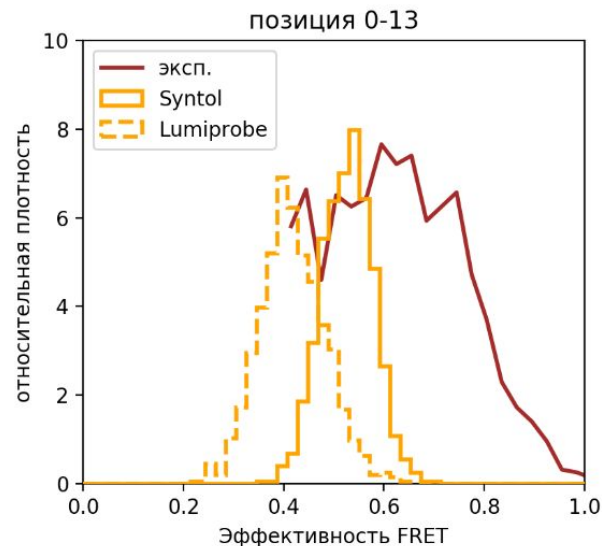


Значения  
эффективности  
FRET с учетом  
механизма расчета  
экспериментальных  
данных

- При измерении эффективности FRET, происходит усреднение сигнала на временах порядка миллисекунд.
- При моделировании FRET мы рассчитываем среднее значения эффективности FRET по расстояниям между донорно-акцепторными парами.

# Сравнение меток с линкерами от компаний Syntol и Lumiprobe

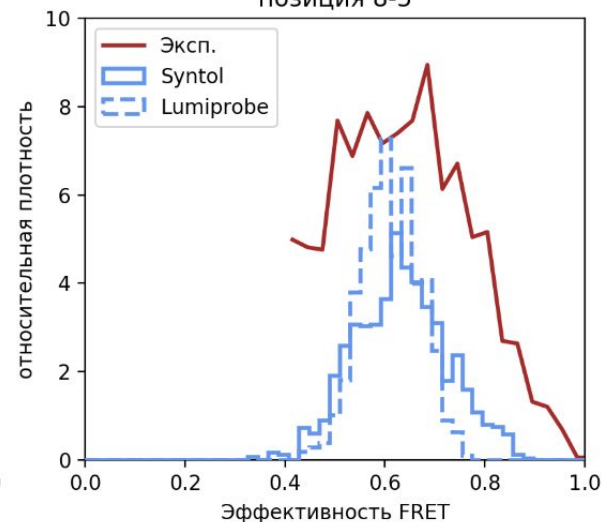
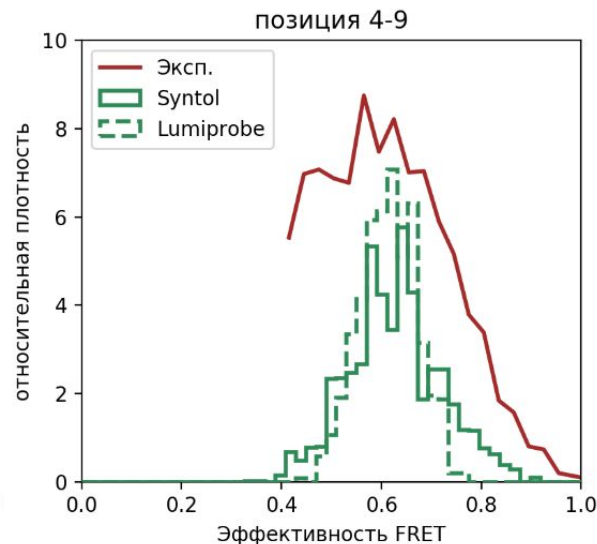
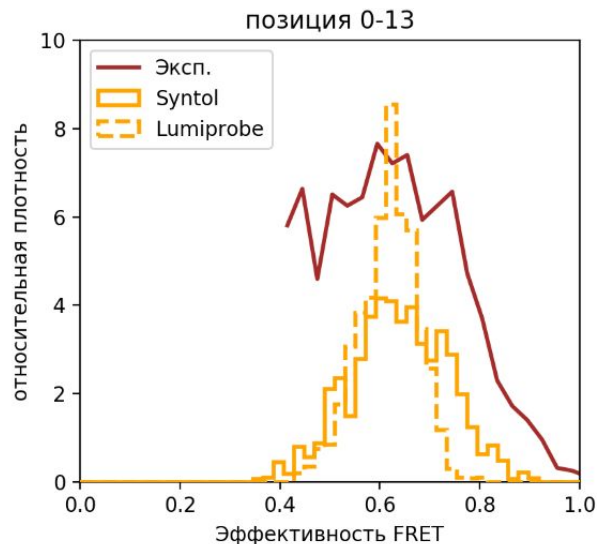
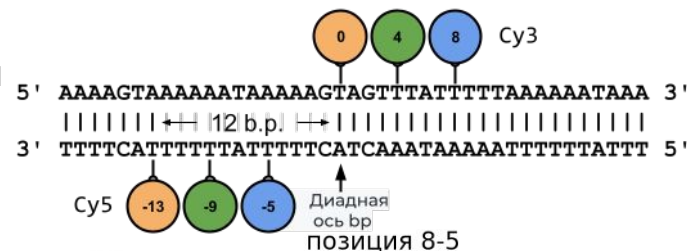
Моделирование эффективности FRET при помощи  
библиотеки конформеров



Значения эффективности FRET рассчитанные для библиотеки конформеров отличаются от экспериментальных, мы считаем что это связано с ограничениями модели.

# Сравнение меток с линкерами от компаний Syntol и Lumiprobe

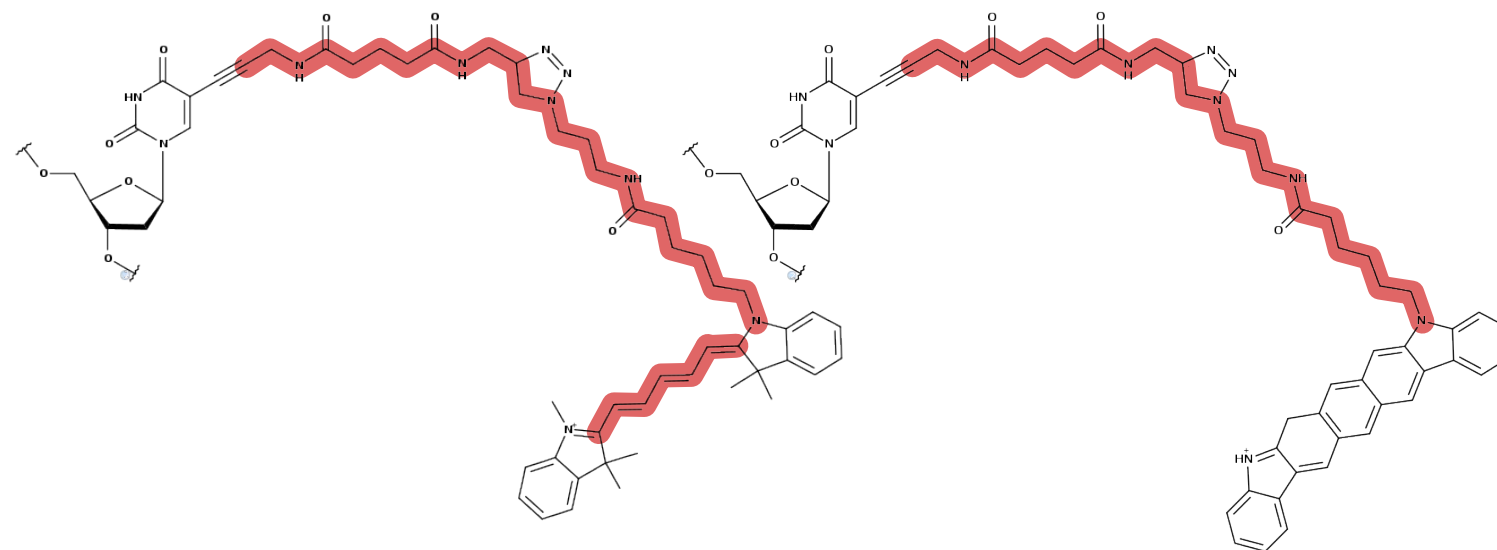
Моделирование эффективности FRET при помощи программной библиотеки **LabelLib**



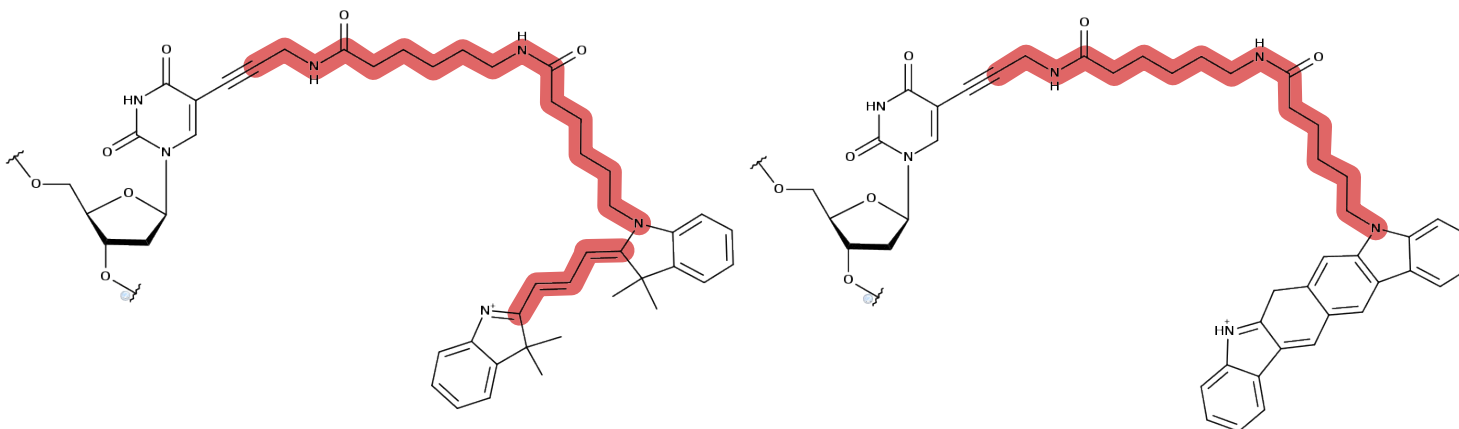
Распределения эффективности FRET рассчитанное с помощью LabelLib хорошо согласуются с экспериментальными данными. Эффективности FRET рассчитанные для меток с различными типами линкеров отличаются незначительно.

# Выводы

- Разработаны и сравнены методы расчета эффективности FRET на основании библиотеки конформеров и расчета доступного флуорофору пространства.
  - Результаты моделирования FRET на основании библиотеки конформеров хуже описывают экспериментальные данные, однако чувствительны к длине линкера.
  - Результаты моделирования FRET с использованием расчета доступного пространства для меток лучше описывают экспериментальные данные, но требуют доработки для учета геометрии линкера.
- При моделирование FRET необходимо усреднять значения эффективности FRET по части области доступной флуорофору.
- Для корректного сравнения профилей эффективности FRET стоит учитывать только те данные, в которых используются идентичные линкеры для прикрепления донорно-акцепторной пары.



При упрощении метки с Су5 на 6 подвижных связей меньше.



При упрощении метки с Су3 на 4 подвижных связей меньше.

При расчете эффективности FRET использовалось значение  $R_0 = 59,3 \text{ \AA}$ , измеренное Г.А. Армеевым, в предыдущей работе.

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

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

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

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

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

$E$  — эффективность FRET,  $F_a$  — флуоресценция акцептора,  $F_d$  — флуоресценция донора, коэффициент  $\gamma_d$  — коэффициент детекции

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

$\gamma_d$  — коэффициент детекции, который учитывает квантовый выход донора ( $\Phi_d$ ) и акцептора ( $\Phi_a$ ) и различия в эффективностях каналов детекции фотонов ( $k$ )



# Благодарности

Выражаю большую благодарность своему научному руководителю Армееву Григорию Алексеевичу, а также всем сотрудникам и студентам кафедры биоинженерии за создание рабочей обстановки во время работы над дипломным проектом.