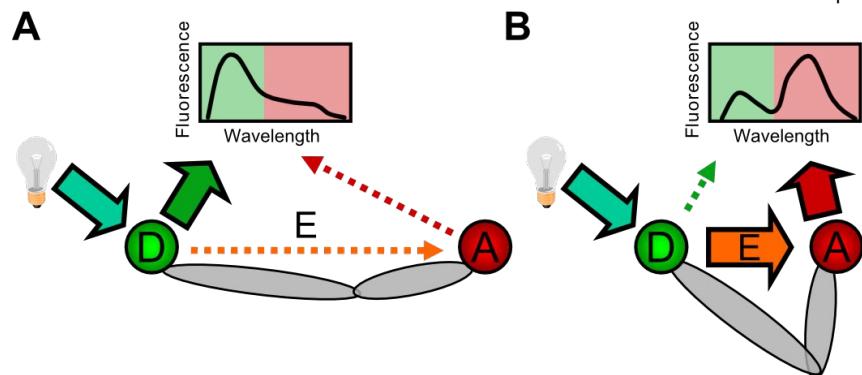
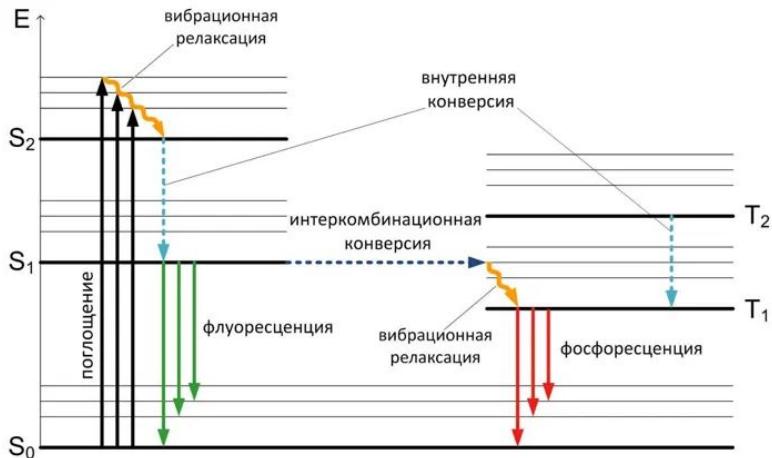


Оценка эффективности ферстеровского резонансного переноса энергии методами молекулярного моделирования

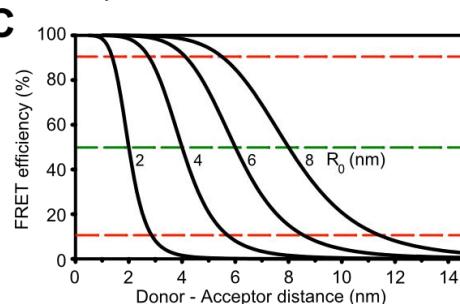
Научный руководитель -- к.ф.-м.н. Армеев Григорий Алексеевич
Студент -- Кристовский Николай Всеволодович

Москва 2021

Что такое Ферстеровский резонансный перенос энергии?

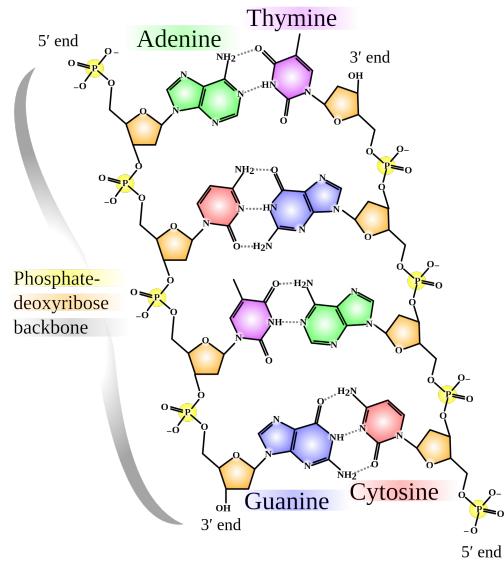


Время жизни возбужденного состояния $S_1 -- 10^{-10} \cdot 10^{-7}$ (порядка наносекунд)



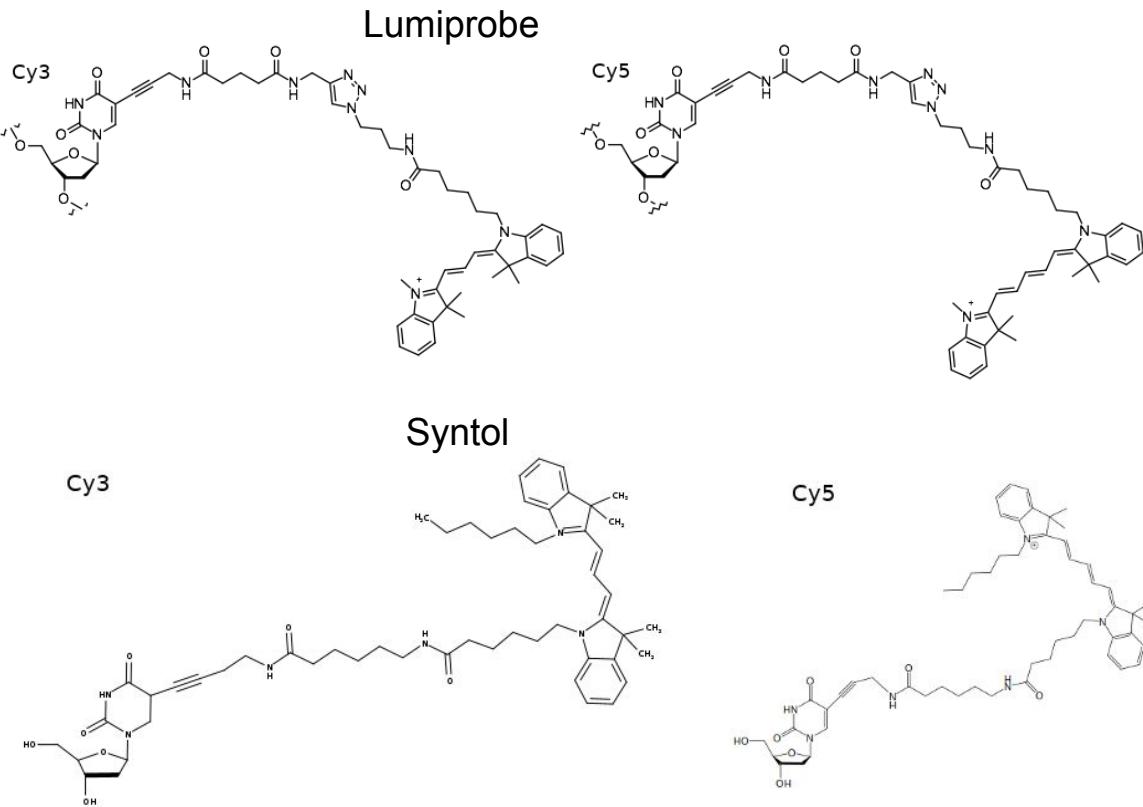
$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0}\right)^6}$$

Способы прикрепления меток к биологическим молекулам.



$$R = \sqrt{\frac{1 + \cos\theta}{1 - \cos\theta}} \sqrt{Nl}$$

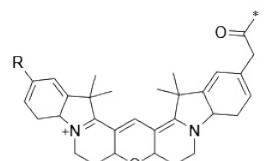
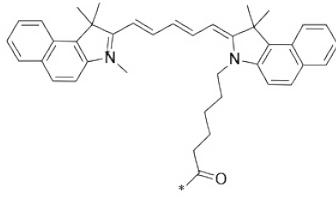
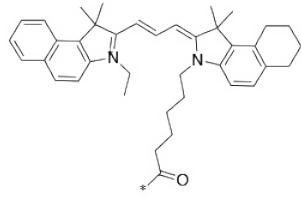
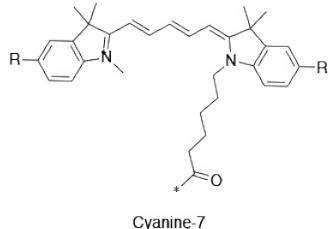
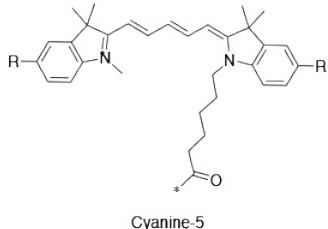
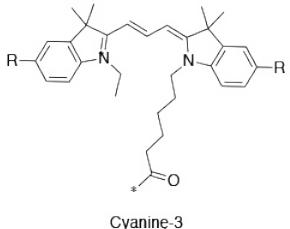
Где N - число связей;
l - длина связи = 0,15 нм(1.5 Å);
θ - внешний угол связи = 70.33°



Цели и задачи

- Разработать метод для оценки ожидаемой эффективности FRET по траектории молекулярной динамики.
 - Создать модели меток с разными типами линкеров
 - Сгенерировать библиотеки конформеров для полученных моделей
 - Использая полученных данные от библиотеки конформеров:
 - Сравнить эффективность FRET при различных длинах линкеров
 - Сравнить эффективность FRET в различных местах прикреплений к двухцепочечной В ДНК
 - Проанализировать полученные данные

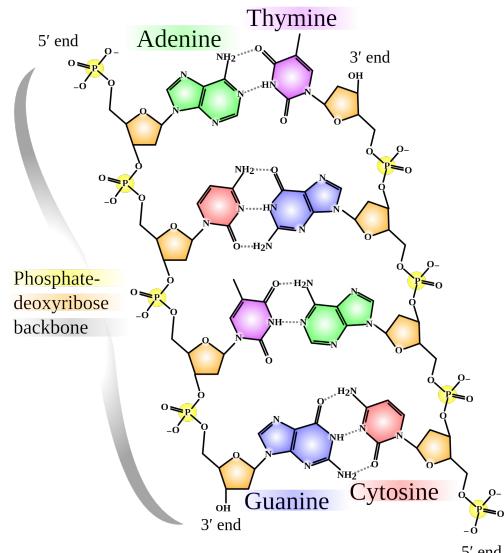
Объект исследования



Флюорофоры	Ex(nm)	Em(nm)	Q _y	Радиус красителя (Å)
Cy3	553 ¹	568 ¹	0,15 ²	7 ³
Cy5	653 ¹	672 ¹	0,27 ²	8 ³

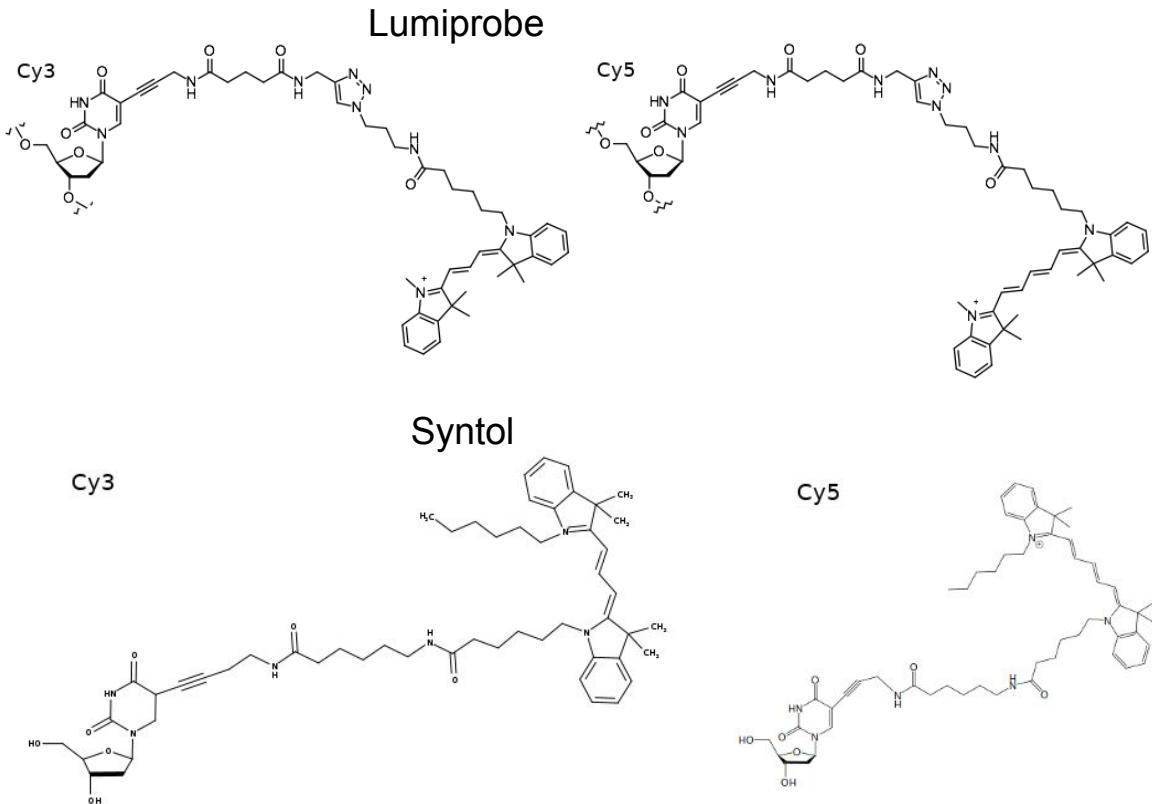
Компания	Флюорофоры	Радиус красителя (Å)	Длина линкера(Å)	Число связей	Медианная длина красителя с линкером (Å)
Lumiprobe	Cy3	7 ³	10 ⁴	25 ⁵	25 ⁶
Lumiprobe	Cy5	8 ³	10 ⁴	25 ⁵	28 ⁶
Syntol	Cy3	7 ³	9 ⁴	19 ⁵	18 ⁶
Syntol	Cy5	8 ³	9 ⁴	19 ⁵	20 ⁶

Способы прикрепления меток к биологическим молекулам.



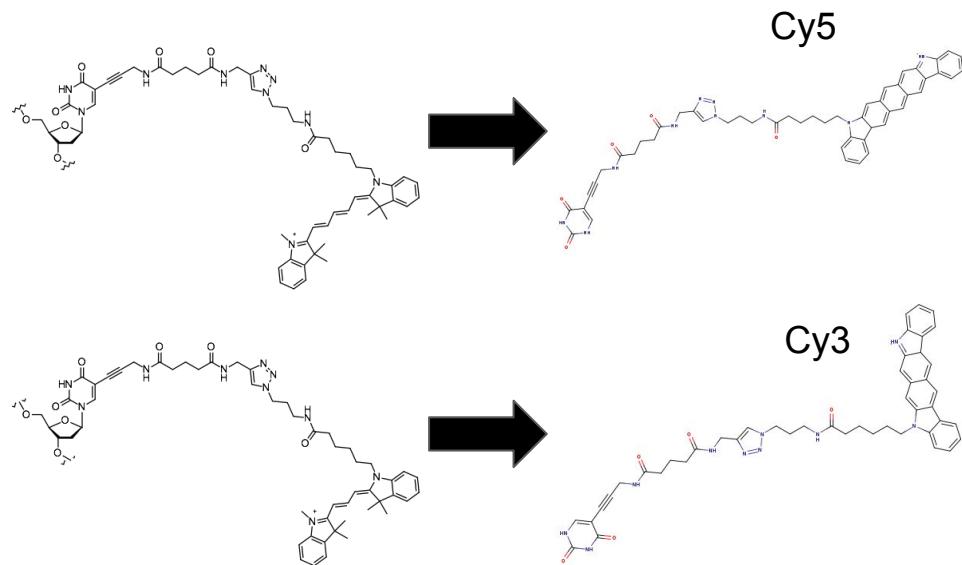
$$R = \sqrt{\frac{1 + \cos\theta}{1 - \cos\theta}} \sqrt{Nl}$$

Где N - число связей;
l - длина связи = 0,15 нм(1.5 Å);
θ - внешний угол связи = 70.33°

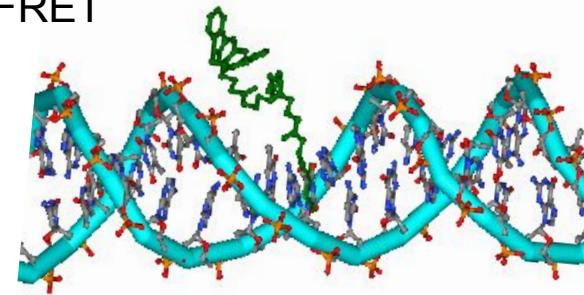


Создание моделей меток и библиотеки конформеров

На основе линкеров предлагаемыми фирмами syntol и lumiprobe были созданы модели циановых меток Су3 и Су5.



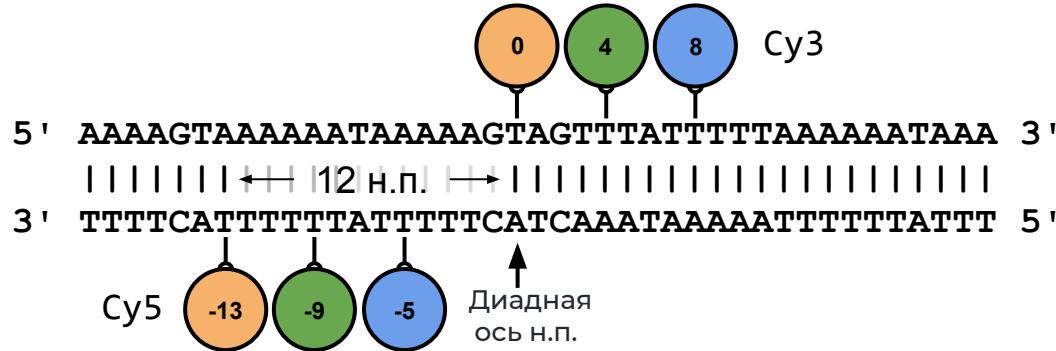
Из библиотек конформеров были рассчитаны средние длины от места прикрепления к нуклеотиду до центра молекулы флуорофора (syntol = 16.2, 16.7; lumiprobe = 22.0, 22.5 Å) для дальнейшего моделирования FRET



Моделирование FRET на олигомерах ДНК

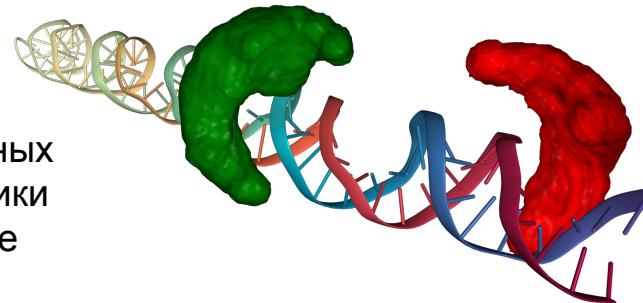
Использовались:

- LabelLib
- numpy
- MDAnalysis
- matplotlib

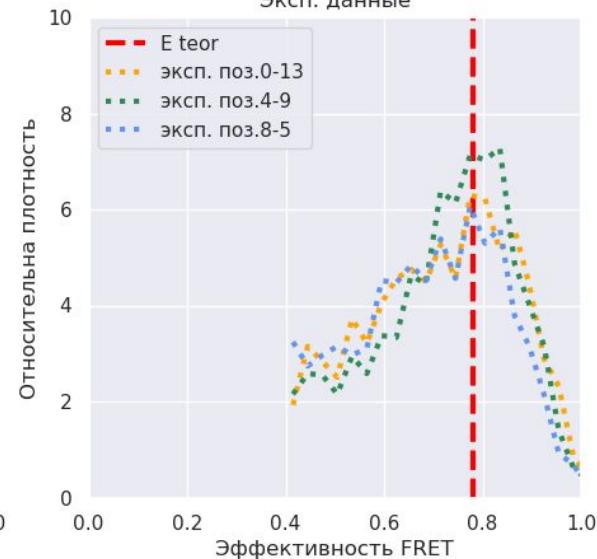
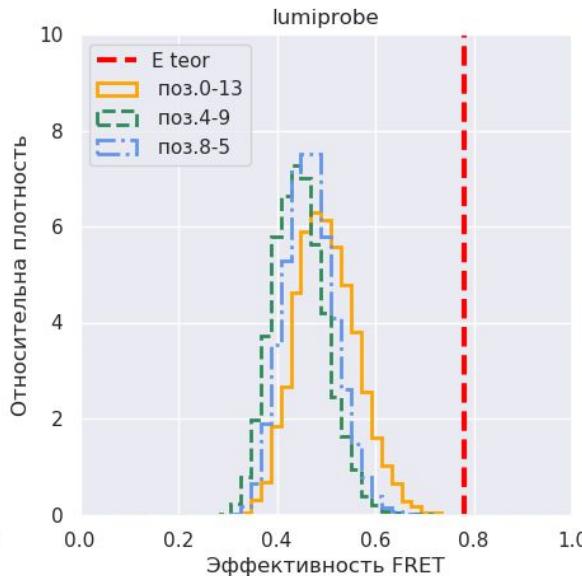
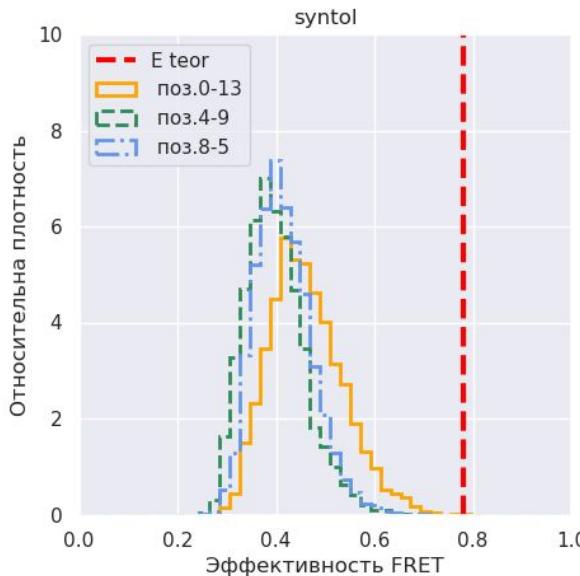
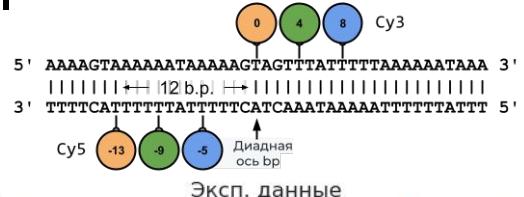


Sequence	CGCCGGCAGTAGCCGAAAAATAGGCCGCG TCAAAAAATGCCCATGCCGCG
Rev. Sequence	GCGCGGCATGGGCATTTTGAGCGCGCG CTATTTTCGGCTACTGCCGCG
Type	DNA
SubType	B
Chains	duplex
Pdb	-
Ligands	No
Keywords	DNA-B Duplex Naked ParmBSC1 TIP3P AddedSalt

Из распределения флуоресцентных меток по траектории мол. динамики можно рассчитать распределение эффективности FRET

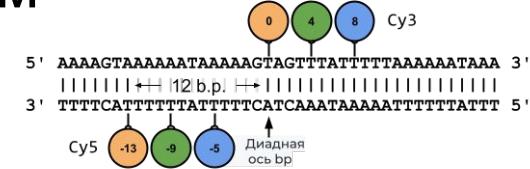
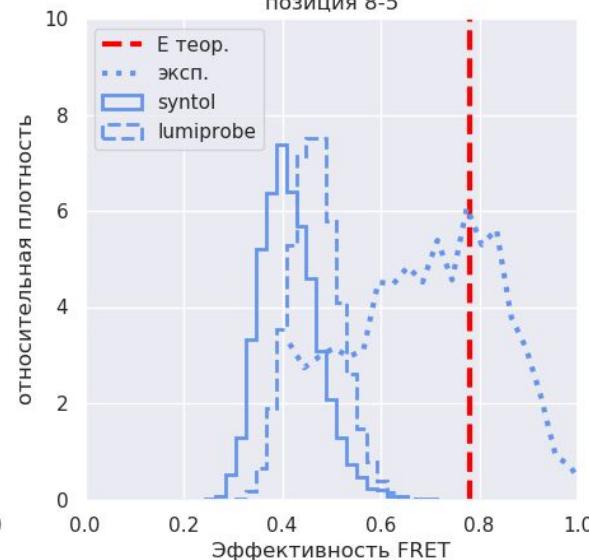
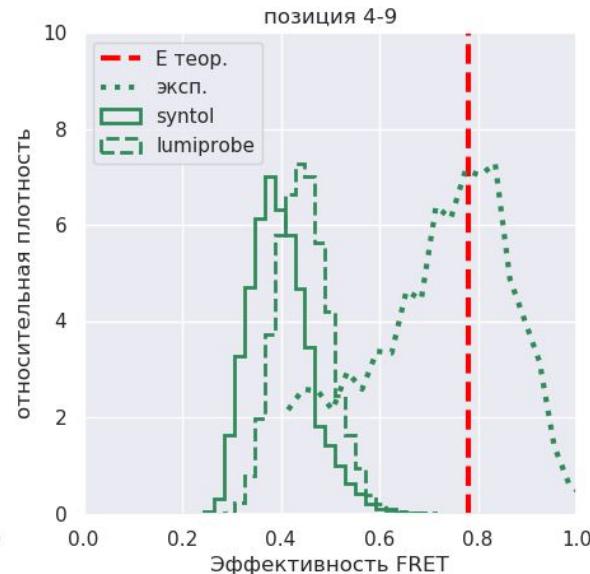
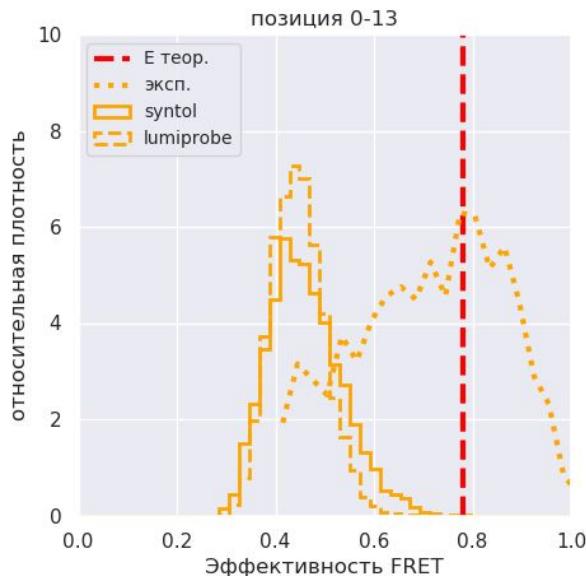


Сравнение линкеров от lumiprobe и syntol



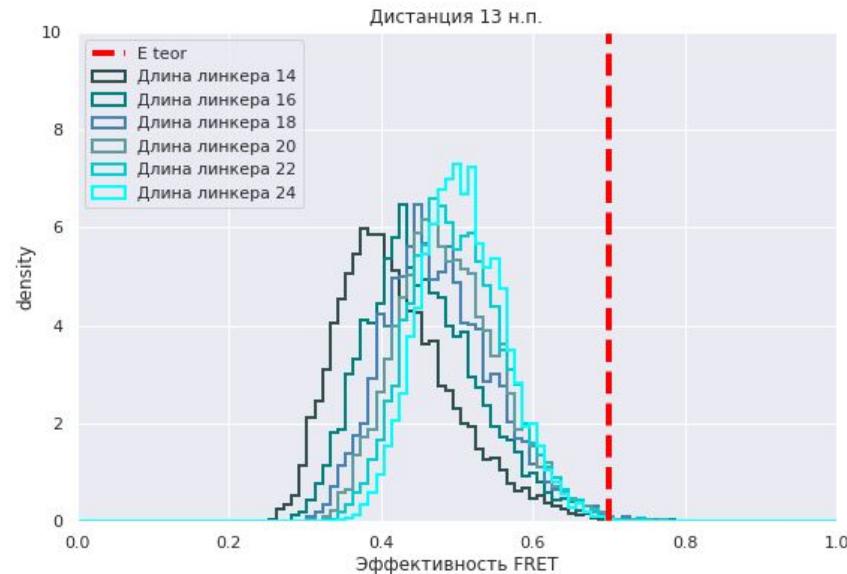
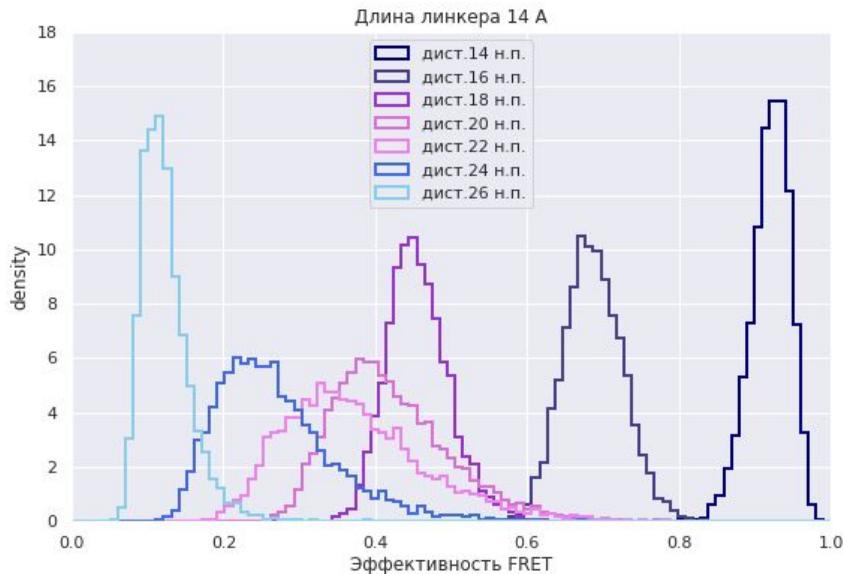
В позиции 0-13 эффективность FRET ближе всего к теоретической.

Сравнение syntol и lumiprobe по позициям



Из полученных графиков видно, что эффективность FRET и плотность распределения у меток с линкерами от lumiprobe выше. Что отличается от наших ожиданий.

Влияние дистанции и длин линкеров на эффективность FRET



При увеличении расстояния между местами прикрепления линкеров эффективность FRET уменьшается, а среднеквадратичное отклонение увеличивается, что ожидаемо и предсказывается теорией FRET.

При увеличении длины линкера среднеквадратичное отклонение не увеличивается, а эффективность FRET увеличивается.

Литература

1. Bajer, B. T. *et al.* (2016) ‘A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs’, *Sensors (Basel, Switzerland)*, 16(9). doi: 10.3390/s16091488.
2. Buning, R. and van Noort, J. (2010) ‘Single-pair FRET experiments on nucleosome conformational dynamics’, *Biochimie*, 92(12), pp. 1729–1740. doi: 10.1016/j.biochi.2010.08.010.
3. Ciftci, D. *et al.* (2020) ‘Single-molecule transport kinetics of a glutamate transporter homolog shows static disorder’, *Science Advances*, 6(22), p. eaaz1949. doi: 10.1126/sciadv.aaz1949.
4. Clegg, R. (2009) ‘Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it’s done’, *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.*, 33. doi: 10.1016/S0075-7535(08)00001-6.
5. Dale, R. E., Eisinger, J. and Blumberg, W. E. (1979) ‘The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer’, *Biophysical Journal*, 26(2), pp. 161–193. doi: 10.1016/S0006-3495(79)85243-1.
6. Demchenko, A. P. (ed.) (2009) ‘Fluorescence Detection Techniques’, in *Introduction to Fluorescence Sensing*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 65–118. doi: 10.1007/978-1-4020-9003-5_3.
7. Förster, T. (1948) ‘Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz’, *Annalen der Physik*, 437(1–2), pp. 55–75. doi: <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>.
8. Friedrich, N.-O. *et al.* (2019) ‘ConformatoR: A Novel Method for the Generation of Conformer Ensembles’, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(2), pp. 731–742. doi: 10.1021/acs.jcim.8b00704.
9. Hellenkamp, B. *et al.* (2018) ‘Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements—a multi-laboratory benchmark study’, *Nature Methods*, 15(9), pp. 669–676. doi: 10.1038/s41592-018-0085-0.
10. Iqbal, A. *et al.* (2008) ‘Orientation dependence in fluorescent energy transfer between Cy3 and Cy5 terminally attached to double-stranded nucleic acids’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), pp. 11176–11181. doi: 10.1073/pnas.0801707105.
11. Kalinin, S. *et al.* (2012) ‘A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling’, *Nature Methods*, 9(12), pp. 1218–1225. doi: 10.1038/nmeth.2222.
12. Miranda, P., Oliveira, L. M. and Weber, G. (2017) ‘Mesoscopic modelling of Cy3 and Cy5 dyes attached to DNA duplexes’, *Biophysical Chemistry*, 230, pp. 62–67. doi: 10.1016/j.bpc.2017.08.007.
13. Mittler, R. S. *et al.* (1989) ‘T-cell receptor-CD4 physical association in a murine T-cell hybridoma: induction by antigen receptor ligation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(21), pp. 8531–8535. doi: 10.1073/pnas.86.21.8531.
14. dos Remedios, C. G., Miki, M. and Barden, J. A. (1987) ‘Fluorescence resonance energy transfer measurements of distances in actin and myosin. A critical evaluation’, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 8(2), pp. 97–117. doi: 10.1007/BF01753986.
15. Sanborn, M. E. *et al.* (2007) ‘Fluorescence Properties and Photophysics of the Sulfoindocyanine Cy3 Linked Covalently to DNA’, *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(37), pp. 11064–11074. doi: 10.1021/jp072912u.
16. Sisamakis, E. *et al.* (2010) ‘Accurate Single-Molecule FRET Studies Using Multiparameter Fluorescence Detection’, in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 455–514. doi: 10.1016/S0076-6879(10)75018-7.
17. Spiegel, J. D. *et al.* (2016) ‘Failure of the IDA in FRET Systems at Close Inter-Dye Distances Is Moderated by Frequent Low $\kappa(2)$ Values’, *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(34), pp. 8845–8862. doi: 10.1021/acs.jpcb.6b05754.
18. Wallace, B. and Atzberger, P. J. (2017) ‘Förster resonance energy transfer: Role of diffusion of fluorophore orientation and separation in observed shifts of FRET efficiency’, *PLOS ONE*, 12(5), p. e0177122. doi: 10.1371/journal.pone.0177122.

Выводы

- Создана методика для оценки ожидаемой эффективности FRET.
- Полученные данные зависимости эффективности FRET от расстояния между метками соответствуют ожидаемым.
- Было доказано, что длина линкера влияет на эффективность FRET.
- Требуется дальнейшее изучения вопроса моделирования влияния линкеров меток на эффективность FRET.

Благодарности

Выражаю большую благодарность своему научному руководителю Армеееву Григорию Алексеевичу, а также всем сотрудникам и студентам кафедры биоинженерии за моральную и физическую поддержку во время работы над дипломным проектом.

