**Влияние структуры и конформационной подвижности активного центра на сечение двухфотонного поглощения флуоресцентного белка EGFP**

***Аслоповский В.Р.***

*Студент, 5 курс специалитета*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail: aslopovskiyvladislav@gmail.com*

Флуоресцентные белки (в частности, модифицированный зеленый флуоресцентный белок EGFP) используются в биологических исследованиях в качестве маркеров для изучения живых клеток и тканей. В настоящее время активно развивается и применяется двухфотонная флуоресцентная микроскопия, которая имеет ряд преимуществ перед традиционной конфокальной. Яркость флуоресценции в этом случае зависит от сечения двухфотонного поглощения, поэтому поиск флуоресцентных белков с большим сечением является важной задачей. Целью работы является анализ влияния структуры и конформационной подвижности активного центра на сечение двухфотонного поглощения белка EGFP.

В данной работе построены полноатомные модели белка EGFP и его модификации EGFP T203I. Для исследования конформационной подвижности белка EGFP T203I проведено молекулярно-динамическое (MD) моделирование в NPT-ансамбле при 298 К с последующим постепенным охлаждением моделируемой системы. После релаксации сольватной оболочки вдоль MD-траектории длиной 7 нс для оптимизации была выбрана 21 геометрия белка с шагом 0.25 нс. Оптимизация геометрических параметров проводилась с помощью метода QM/MM в варианте PBE0/(aug)-cc-pVDZ//CHARMM. Квантовая часть включала в себя хромофор и его ближайшее окружение. Энергии вертикальных электронных переходов рассчитаны методом XMCQDPT2 в базисе (aug)-cc-pVDZ с векторами нулевого приближения, полученными методом SA(7)-CASSCF(14,13). Расчет моментов перехода и разности средних дипольных моментов проведен в нулевом порядке этой теории. Электростатическое поле остального белкового окружения учитывалось с помощью метода потенциалов эффективных фрагментов (EFP). Сечения двухфотонного поглощения для перехода S0-S1 в белках EGFP и EGFP T203I рассчитаны путем прямого суммирования по состояниям в рамках N-уровневой модели.

Показано, что мутация T203I приводит к частичному разрушению сетки водородных связей хромофора и его ближайшего окружения и возникновению существенной конформационной подвижности активного центра; при этом сечение двухфотонного поглощения белка сильно зависит от структуры активного центра и варьируется в широких пределах. Анализ сходимости N-уровневых моделей показывает, что основной вклад в сечение двухфотонного поглощения при S0-S1 переходе в белках EGFP и EGFP T203I дают начальное и конечное состояния, что подтверждает применимость двухуровневой модели, в рамках которой сечение двухфотонного поглощения напрямую связано с разностью средних дипольных моментов при фотовозбуждении. Рассчитанные значения сечений двухфотонного поглощения белков EGFP и EGFP T203I хорошо согласуются с экспериментальными данными [1].

*Автор благодарен научному руководителю Боченковой А.В. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №21-73-00145 с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова, а также вычислительного кластера лаборатории квантовой фотодинамики, закупленного по программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.*

**Литература**

1. Stoltzfus C.R., Barnett L.M., Drobizhev M., Wicks G., Mikhaylov A., Hughes T.E., Rebane A. Two-photon directed evolution of green fluorescent proteins // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 5, № 1. P. 11968.