

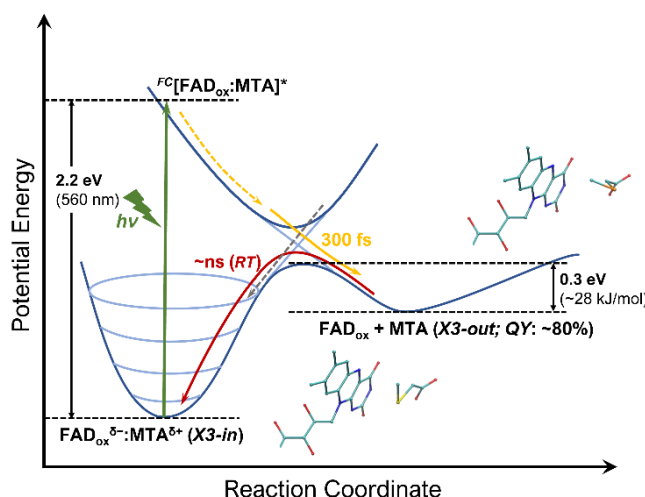
Proposal M2 internship 2023-2024

Profile: background in biophysics or physical chemistry with an interest in molecular biophysics

Tutor: Marten Vos, LOB, Ecole Polytechnique, marten.vos@polytechnique.edu

Development of a novel fluorescent photoswitchable protein for nanoscopy

In our group dynamics of light-induced changes in proteins are investigated, including in recent years photocatalytic and potentially photo-transducing processes in flavin (vitamin B2-derivative) containing enzymes [1,2]. In 2022 we discovered a novel red photoswitchable system, involving a charge transfer complex formed by flavin and the methylthioacetate (MTA) substrate-analogue inhibitor in the flavoenzyme monomeric sarcosine oxidase (MSOX) [3]. Based on femtosecond time-resolved spectroscopic data as well as ground state structural data from the literature, a tentative mechanism was proposed for the reaction (see scheme). This involves motion (proposed to involve MTA isomerization) on a dissociative excited state surface leading, with high switching quantum yield, in 300 fs to the photoproduct, and a nanosecond, thermally activated, back reaction.



This unique novel system provides a promising template for the development of useful red-sensitive photoswitches for nanoscopy and/or optogenetic applications. A collaborative project (ANR PhotoCT, 2024-2028, LOB IPParis, IBS CEA Grenoble, Itodys Univ. Paris Cité) has just been funded to a) reveal the fundamental mechanism of the reaction in order to b) modify and optimize the system in view of specific applications. This project combines advanced spectroscopic, structural (femtosecond crystallography),

quantum chemical and bioengineering approaches.

The M2 internship will focus on the development of a photo-switchable fluorescent MSOX variant for nanoscopy applications. This will be done by removing amino-acid fluorescence quenchers from the flavin environment. The internship will include being tutored on and gaining hands-on experience in ultrafast spectroscopy, in data-analysis, and manipulating protein samples. ANR funding for a PhD thesis starting 2024 on this subject is available.

1. Sorigué, D., Hadjidemetriou, K., Blangy, S., Gotthard, G., Bonvalet, A., Coquelle, N., et al. (2021). Mechanism and dynamics of fatty acid photodecarboxylase. *Science*, 372, eabd5687.
2. Zhuang, B., Ramodiharilafy, R., Liebl, U., Aleksandrov, A., & Vos, M. H. (2022). Ultrafast Photooxidation of Protein-Bound Anionic Flavin Radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 119, e2118924119.
3. Zhuang, B., & Vos, M. H. (2022). Photoswitching Behavior of Flavin–Inhibitor Complex in a Nonphotocatalytic Flavoenzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 144, 11569-11573

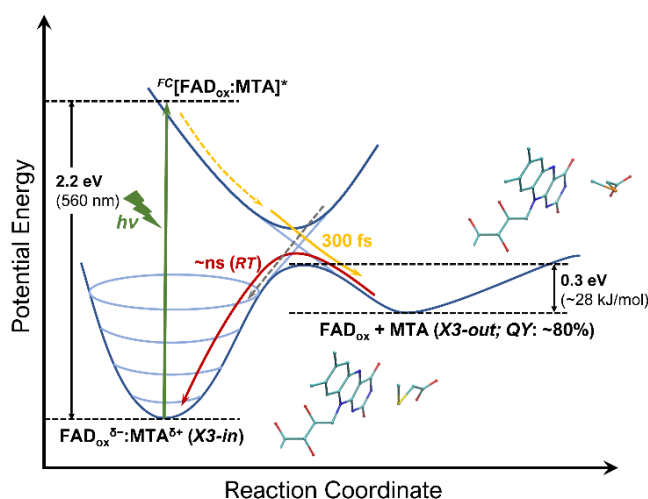
Proposition de stage M2 2023-2024

Profil : formation biophysique ou physico-chimique avec un intérêt pour la biophysique moléculaire.

Encadrant : Marten Vos, LOB, Ecole Polytechnique, marten.vos@polytechnique.edu

Développement pour la nanoscopie d'une nouvelle protéine fluorescente photocommutable

Notre groupe étudie la dynamique des changements photo-induits dans les protéines, y compris ces dernières années les processus photocatalytiques et potentiellement phototransducteurs dans les enzymes contenant une flavine (dérivé de la vitamine B2) [1,2]. En 2022, nous avons découvert un nouveau système photo-commutable par lumière rouge, impliquant un complexe de transfert de charge formé par la flavine et l'analogue inhibiteur de substrat méthylthioacétate (MTA) dans la flavoenzyme sarcosine oxydase monomérique (MSOX) [3]. Basé sur des données de spectroscopie femtoseconde ainsi que des données structurales déjà publiées, un premier mécanisme a été proposé pour la réaction (voir schéma). Celui-ci fait intervenir un mouvement en 300 fs (qui impliquerait l'isomérisation du MTA) sur la surface d'énergie potentielle de l'état excité, conduisant, avec un rendement quantique de commutation élevé, au photoproduit et une réaction retour activée thermiquement nanoseconde.



Ce système unique pourrait permettre le développement de nouveaux photo-commutateurs sensibles à la lumière rouge, utiles pour la nanoscopie et/ou des applications optogénétiques en profondeur. Un projet collaboratif (ANR PhotoCT, 2024-2028, LOB IPParis, IBS CEA Grenoble, Itodys Univ. Paris Cité) vient d'être financé pour a) identifier le mécanisme fondamental de la réaction afin de b) modifier et optimiser le système en vue d'applications en bio-imagerie. Ce projet associe l'utilisation de méthodes au niveau de l'état de l'art en spectroscopie ultrarapide, cristallographie résolue dans le temps (XFEL), chimie quantique et bio-ingénierie.

Le stage M2 se focalisera sur le développement d'une variante fluorescente et photo-commutable de MSOX pour des applications en nanoscopie. Pour ce faire, des acides aminés proche de la flavine, intervenant dans le mécanisme de quenching de fluorescence, seront modifiés. Le stage comprendra l'acquisition d'expérience de spectroscopie ultrarapide, l'analyse de données et la manipulation d'échantillons protéiques. Un financement ANR est disponible pour une thèse de doctorat débutant en 2024.

1. Sorigué, D., Hadjidemetriou, K., Blangy, S., Gotthard, G., Bonvalet, A., Coquelle, N., et al. (2021). Mechanism and dynamics of fatty acid photodecarboxylase. *Science*, 372, eabd5687.
2. Zhuang, B., Ramodiharilafy, R., Liebl, U., Aleksandrov, A., & Vos, M. H. (2022). Ultrafast Photooxidation of Protein-Bound Anionic Flavin Radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 119, e2118924119.
3. Zhuang, B., & Vos, M. H. (2022). Photoswitching Behavior of Flavin-Inhibitor Complex in a Nonphotocatalytic Flavoenzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 144, 11569-11573