

**Моделирование влияния способа введения флуоресцентных меток Cy3 и Cy5
в двуцепочечную ДНК на эффективность Фёрстовского резонансного
переноса энергии**

Научный руководитель – Армеев Григорий Алексеевич

Кристовский Николай Всеволодович

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический
факультет, Кафедра биоинженерии, Москва, Россия

E-mail: krist179@mail.ru

Фёрстовский резонансный перенос энергии (FRET) — механизм передачи энергии между светочувствительными молекулами dos Remedios, Miki and Barden, 1987; Mittler et al., 1989). В этом процессе участвуют две светочувствительных молекулы: донор и акцептор. При помощи лазера, испускающего свет с длиной волны входящей в спектр поглощения донора, молекула фотовозбуждается. В возбужденном состоянии донор может передать полученную энергию акцептору через диполь-дипольные взаимодействия. После чего акцептор может испустить полученную энергию в виде кванта света с большей длиной волны. Эффективность передачи энергии между донором и акцептором пропорциональна расстоянию между ними. Из-за чего FRET может быть использован для измерения расстояния на молекулярном уровне. Однако, перед исследователями часто встает вопрос как именно использовать выбранную пару донор-акцептор и какие линкеры использовать для прикрепления меток к ДНК (Bajar et al., 2016). В свою очередь, линкеры могут сильно влиять на эффективность FRET и ориентационный фактор В нашей работе мы показываем результаты моделирования FRET с использованием донорно-акцепторной пары Cy3-Cy5. Метод FRET часто используется для изучения динамики белков и кинетики реакций (Buning and van Noort, 2010; Ciftci et al., 2020). Однако, для работы с одной донорно-акцепторной парой можно использовать множество вариантов линкеров. Из-за чего полученные данные могут сильно различаться. Для эффективного сравнения данных из таких экспериментов необходимы методы учета различий между конкретными видами флуоресцентных меток. В данной работе мы сравнили эффективность FRET при использовании различных линкеров и изменении расстояния между местами прикрепления меток к олигонуклеотидам.

Работа производилась на сервере Newton с использованием программных библиотек nglview, LabelLib, numpy, MDAnalysis, matplotlib для языка Python 3.7. В ходе работы мы создали молекулярные модели выбранных циановых (Cy3, Cy5) меток с различными линкерами при помощи MarvinSketch (Рис. 1-2.). Из полученных моделей мы сделали выборку ротаметров и на их основе рассчитали рассчитали медиальное расстояние от точки прикрепления до центра молекулы флуорофора (Friedrich et al., 2019). Основываясь на полученных данных и данных из литературы, мы рассчитали эффективность FRET при различных параметрах меток (Sanborn et al., 2007; Iqbal et al., 2008).

Мы показали, что при расстоянии между сайтами прикрепления линкеров равном 4,62 нм (14 н.п.), рассчитанная с учетом линкеров эффективность FRET составляет 0,28, что отличается от эффективности, рассчитанной по формуле 1 (0,37). Таким образом, линкеры значительно влияют на измеряемую эффективность FRET. Мы разработали методику для оценки ожидаемой величины FRET по молекулярной модели исследуемого объекта и подготовили набор параметров флуорофоров с линкерами, необходимый для проведения расчетов.

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

Формула 1. E — эффективность FRET, R_0 — расстояние при котором эффективность FRET равняется 50%, R_{da} — расстояние между донором и акцептором.

Источники и литература

- 1) Bajar, 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) Friedrich, N.-O. et al. (2019) ‘Conformer: 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

Иллюстрации

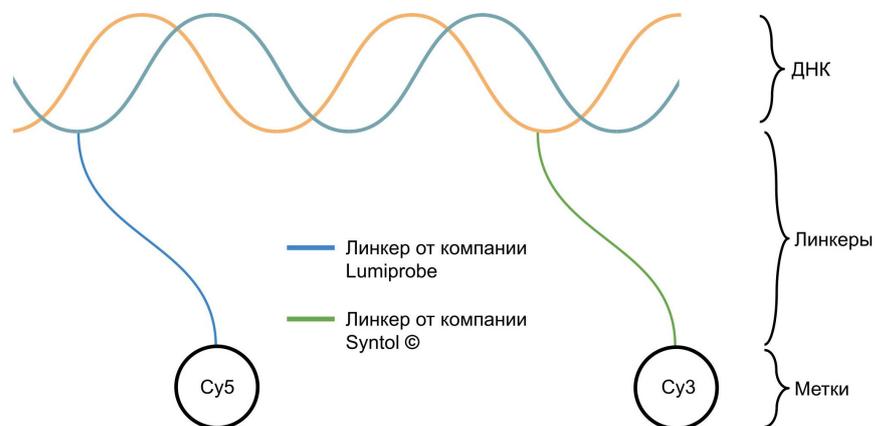


Рис. 1. Схема прикрепления циановых меток

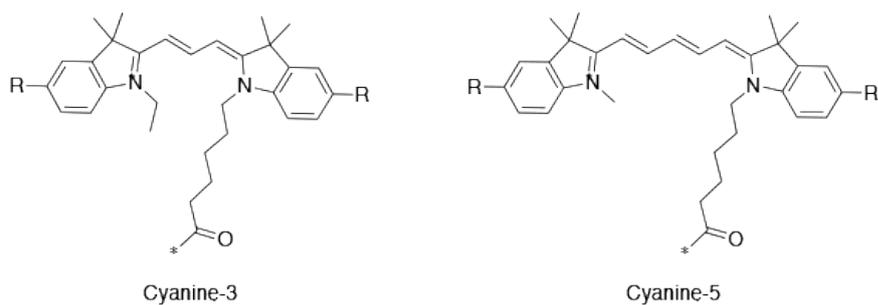


Рис. 2. Циановые красители: Cy3 — слева; Cy5 — справа.