



УДК 577.113.6

РЕЗОНАНСНЫЙ ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ИССЛЕДОВАНИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

© 1999 г. И. А. Прохоренко, В. А. Коршун, Ю. А. Берлин[#]*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 17.05.99 г. Принята к печати 02.07.99 г.

Рассмотрены результаты работ последних лет по применению резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) для исследования гибридизации и высших структур нуклеиновых кислот, а также их энзим- и рибозимкатализируемых реакций.

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды; флуоресцентные метки; перенос энергии; пространственная организация нуклеиновых кислот; рибозимы.

Флуоресценция лежит в основе высокоэффективных физических методов структурных исследований. Возможности флуоресцентных меток могут быть расширены путем использования двух различных флуоресцентно активных групп (донора и акцептора энергии) в качестве составного флуорофора. Для такой пары спектр возбуждения акцептора должен перекрываться со спектром излучения донора. При этом возбуждение системы при длине волны, характерной для донора, сопровождается не соответствующей эмиссией, а безызлучательным резонансным переносом энергии флуоресценции (FRET) на другой флуорофор и эмиссией, отвечающей именно этому, акцепторному флуорофору. Эффективность переноса энергии с донора на акцептор обратно пропорциональна шестой степени расстояния между остатками красителей. Это означает, что при возбуждении в области поглощения донора и регистрации эмиссии акцептора эффективность переноса энергии должна быть крайне чувствительной к изменениям расстояния между обоими флуорофорами. Каждая донорно-акцепторная пара характеризуется ферстеровским радиусом R_0 , соответствующим расстоянию между красителями, при котором эффективность (квантовый выход) переноса энергии составляет 50% [1].

Метод FRET нашел применение для измерения близких к R_0 внутри- и межмолекулярных расстояний в биологических системах в диапазоне 1–10 нм, в который попадают значения R_0 большинства донорно-акцепторных пар. В настоящее время ком-

бинации красителей, используемых для FRET, включают в себя обычно ксантены (флуоресцеин, родамин и их производные) и карбоцианины (Cy3, Cy5 и др.).

Теория метода изложена в ряде обзоров [2–10], содержащих также информацию о применении FRET в биохимических исследованиях. В данном обзоре речь идет об использовании FRET для структурно-функционального исследования нуклеиновых кислот; за рамками обсуждения остается ряд приложений этого метода, таких как детекция специфических нуклеотидных последовательностей (включая точечные мутации) и секвенирование с использованием праймеров, меченных парой красителей.

1. НЕРАЗВЕТВЛЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Одним из наиболее эффективных применений FRET является изучение образования элементов вторичной структуры нуклеиновых кислот. Поскольку в результате таких существенных структурных изменений происходят значительные взаимные перемещения участков молекулы, методом FRET можно изучать эти процессы с довольно высокой чувствительностью по сравнению с другими методами.

Впервые эффективность FRET для детекции гибридизации ДНК в растворе в различных вариантах (рис. 1) была продемонстрирована в 1988 г. [11].

Усовершенствование методов олигонуклеотидного синтеза и направленного введения различных флуорофоров в нуклеиновые кислоты способствовало широкому использованию FRET в исследовании этих биополимеров. Так, сайт-специфичес-

Сокращения: FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции (fluorescence resonance energy transfer); Cy3, Cy5 – сульфоиндокарбоцианиновые красители; FAM – карбокси-флуоресцеин; TAMRA – карбокситетраметилродамин; ПНК – пептидные аналоги нуклеиновых кислот.

[#] Автор для переписки (e-mail: yuber@ibch.siocb.ras.ru).

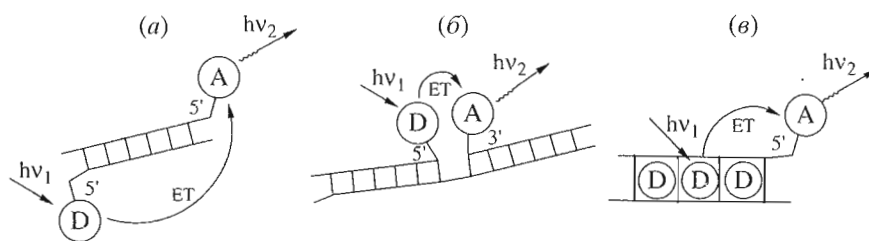


Рис. 1. Возможные схемы детекции гибридизации нуклеиновых кислот в растворе с помощью переноса энергии (ET) [11]: (а) гибридизация двух взаимно комплементарных 5'-меченых олигонуклеотидов (А – акцептор, D – донор); (б) гибридизация двух 3'- и 5'-меченых олигонуклеотидов на комплементарной матрице; (в) гибридизация меченого акцептора олигонуклеотида с одноцепочечной мишенью в присутствии донора-интеркалятора.

кое мечение олигонуклеотидов 5-иодацетамидными производными флуоресцеина и эозина по единственному тиофосфату в различных положениях каждой из цепей с последующей гибридизацией привело к серии дуплексов, эффективность FRET в которых согласуется с рассчитанным расстоянием между флуорофорами для идеализированной В-формы ДНК; в то же время на расстояниях менее 2 нм наблюдались аномальные результаты, что может быть связано с ограничением подвижности флуорофоров [12] (см. также [13]). На 16-звенном олигонуклеотиде, меченном флуоресцеином по 3'-концу и X-родамином по 5'-концу, была исследована кинетика гибридизации [14] и изменение расстояния между флуорофорами в результате образования дуплекса с комплементарной матрицей [15].

Применение в качестве донорно-акцепторной пары флуоресцеина и сульфородамина 101 (техасский красный), присоединенных к 5'- и 3'-концу комплементарных олигонуклеотидов, позволило детектировать гибридизацию в растворе при концентрациях ДНК на два-три порядка меньших, чем необходимо для наблюдения гипохромизма [16]. Этот метод детекции гибридизации был использован для определения термодинамических и кинетических параметров образования дуплексов.

Регистрация эффективности переноса энергии при гибридизации 5'-меченых тетраметилродамином 11-, 13- и 15-звенных гомопиримидиновых олигонуклеотидов с 5'-меченым флуоресцеином 25-звенным дуплексом, содержащим 15-звенный гомопуриин/гомопиримидиновый участок, позволила количественно охарактеризовать процесс образования триплекса [17].

Несколько разных пар флуорофоров были использованы для анализа различных вторичных структур ДНК и РНК (детекция образования шпильки, выяснение полярности при гибридизации с участием α -олигонуклеотида), а также для идентификации продукта межхромосомной транслокации онкогена [18].

Одна из публикаций [19], посвященная определению хиральности (направления закручивания) ДНК-спирали, заслуживает более подробного обсуждения, поскольку в ней эффективно продемонстрированы экспериментальные и теоретические возможности метода. Цель работы состояла в определении основных параметров такой нестандартной спиральной структуры, как параллельный ДНК-дуплекс; значительное внимание при этом было уделено построению интегральной геометрической модели расчета исследуемых структур для интерпретации спектральных данных.

В рамках этой работы была синтезирована серия из пяти спиральных шпильчатых структур длиной 16 п.о. с четырьмя нуклеотидами в составе петли (рис. 2). При этом часть стебля, прилегающая к петле, представляет собой параллельный d(A-T)-дуплекс, а другая его часть – последовательность $(m^5C \cdot G)_m$, которая при повышении концентрации $MgCl_2$ способна переходить в Z-форму. Структуры, составляющие эту серию, различались относительной протяженностью каждой из этих двух частей дуплекса при неизменном общем числе звеньев. Метки вводились по 5'-концу шпильчатой структуры и в 5-положение dU, находящегося в головке шпильки. При построении математической модели структуры учитывалась подвижность используемых флуорофоров. Исходя из структурных соображений и опираясь на данные по поляризации флуоресценции, рассматривали ситуацию с подвижным донором и неподвижным акцептором. С использованием цилиндрической системы координат, описывающей модель дуплекса, была выведена зависимость эффективности переноса энергии от параметров спиральной конформации каждой из частей дуплекса и их относительной протяженности. Измерения температуры плавления и спектров КД при повышении концентрации соли подтвердили свойства исследуемых структур, в том числе способность соответствующего фрагмента спирали к переходу в Z-форму. Анализ спектров флуоресценции показал, что при низкой концентрации соли (при этом $(m^5C \cdot G)_m$ находится в В-форме) эффективность переноса энергии является монотонной функцией относительной

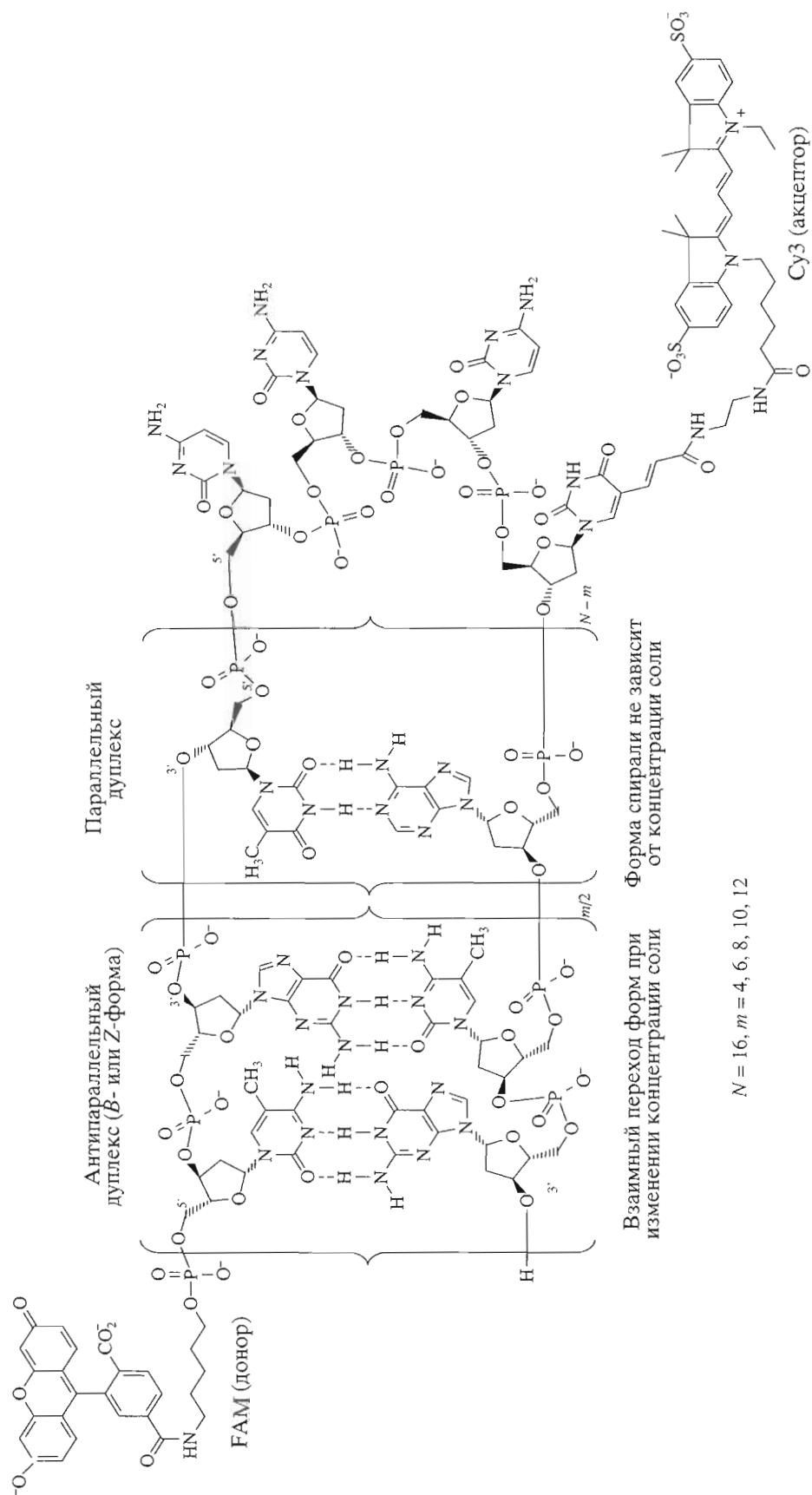


Рис. 2. Структура модельных дуплексов, использовавшихся при изучении спиральных характеристик нестандартных форм ДНК [19].

длины двух спиральных участков. Напротив, при высокой концентрации соли ($(m^5C \cdot G)_m$ находится в *Z*-форме) наблюдалось периодическое уменьшение интенсивности переноса энергии при увеличении длины фрагмента, который, как ожидалось, переходит при этом в *Z*-форму. Это безусловно свидетельствует об изменении направления закручивания спирали. Периодичность в эффективности переноса энергии, которая прослеживается в этом ряду, позволила вычислить алгебраическую разницу между углами поворота этих двух типов спирали – *Z*-формы и параллельной *B*-формы. Эти данные подтверждают, что знак угла поворота действительно изменяется, т.е. изменяется направление закручивания спирали. Анализ свойств составного дуплекса ДНК, включающего в себя сегмент, способный к $B \rightleftharpoons Z$ -переходу, и участок с параллельными цепями, позволил подтвердить правозакрученность параллельного $d(A \cdot T)$ -дуплекса и показать, что параметры его спирали близки к таковым *B*-ДНК. Рассчитанные из экспериментальных данных параметры структуры хорошо согласуются с данными рентгеноструктурного анализа [19].

С помощью FRET была зарегистрирована гибридизация в живой клетке [20] (возможность такой детекции предсказывалась в работе [11]). Для этого тиофосфатный 28-звенный олигомер, меченный флуоресцеином по 5'-концу, и комплементарный ему фосфодиэфирный олигомер, меченный родамином по 3'-концу, последовательно вводили в клетку и контролировали флуоресценцию красителей, наблюдая процесс образования и последующую деградацию дуплекса *in vivo*.

В работе [21] исследовалась возможность использования FRET для детекции гибридизации олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами, имеющими сложную вторичную структуру. При этом авторами был синтезирован ряд зондов, которые сами обладают сложной вторичной структурой. В результате было показано, что этот метод действительно позволяет детектировать комплементарные взаимодействия между такими структурами и, следовательно, в принципе пригоден для исследования потенциальной биологической (например, антисмысловой) активности синтетических нуклеиновых кислот *in vitro* и *in vivo*.

Были исследованы также гибридизационные и конформационные свойства 10-звенных олигомеров ДНК и РНК в различных комбинациях [22]. Полученные результаты, свидетельствующие, в частности, о вытянутой конформации олигомеров в растворе, хорошо согласуются с данными рентгеноструктурного анализа (что указывает на близость конформаций в растворе и кристаллическом состоянии), ЯМР-спектроскопии и ряда других методов. Отмечено образование правозакрученных спиралей с участием цепей РНК.

В одной из недавних работ [23] анализировали изогнутость ДНК-дуплекса в зависимости от нуклеотидной последовательности, проверяя гипотезу о том, что присутствие гомоаденинового блока или нескольких таких смежных блоков приводит к устойчивому искривлению дуплекса. Угол кривизны дуплекса определяли из эффективности переноса энергии, которая составляла от 3 до 10%. Чтобы повысить точность измерений при такой небольшой интенсивности переноса энергии, расчеты делались с помощью интегрирования оптических спектров, а не по измерениям интенсивности на определенной длине волны. Измерения проводились на растворах 31-звенных дуплексов, один из которых содержал три последовательных блока A_6T_6 , разделенных несколькими *G-C*-парами, а другой (контрольный) вместо этих блоков содержал самокомплементарные вставки $(AT)_3$. С помощью этих 5'-меченых модельных соединений исследовалась зависимость кривизны дуплекса от концентрации $NaCl$ (сравнение с неизогнутым аналогом позволило повысить точность измерения расстояний). Было показано, что угол кривизны дуплекса может меняться от 23 до 41° в расчете на один A_6 -блок при изменении концентрации $NaCl$ от 10 до 500 мМ. Использование FRET в данной работе предоставило бесспорные преимущества, поскольку другие известные методы определения кривизны дуплекса требовали жестких ограничений условий эксперимента [23].

Геометрия кинксодержащих 18-звенных ДНК-и РНК-дуплексов, несущих в середине одной из цепей боковую петлю из нескольких адениновых нуклеотидов, также была исследована с помощью 5'-концевого мечения соответствующих олигонуклеотидов. Эффективность FRET возрастала с увеличением числа нуклеотидов в петле; были рассчитаны значения углов излома дуплекса [24].

В работе [25] с использованием различных флуоресцентных методов, в том числе FRET, изучались переходы спираль-клубок при плавлении олигодезоксинуклеотидных дуплексов и шпилек. Была продемонстрирована важность учета температурной зависимости флуоресцентных характеристик конъюгатов, особенно в случае родамина.

Примером изучения образования элементов высших структур нуклеиновых кислот является анализ сворачивания модельного одноцепочечного олигонуклеотида, меченного по обоим концам и несущего последовательность из четырех теломерных повторов C_3 или C_5 [26] (рис. 3). Эти олигонуклеотиды формируют специфическую четырехцепочечную структуру (*i*-мотив), стабилизируемую протонированными *C-C*-парами (на рис. 3 показан *i*-мотив из четырех повторов C_3). В таких структурах 5'- и 3'-концы олигонуклеотида оказываются сближенными, что может проявляться в

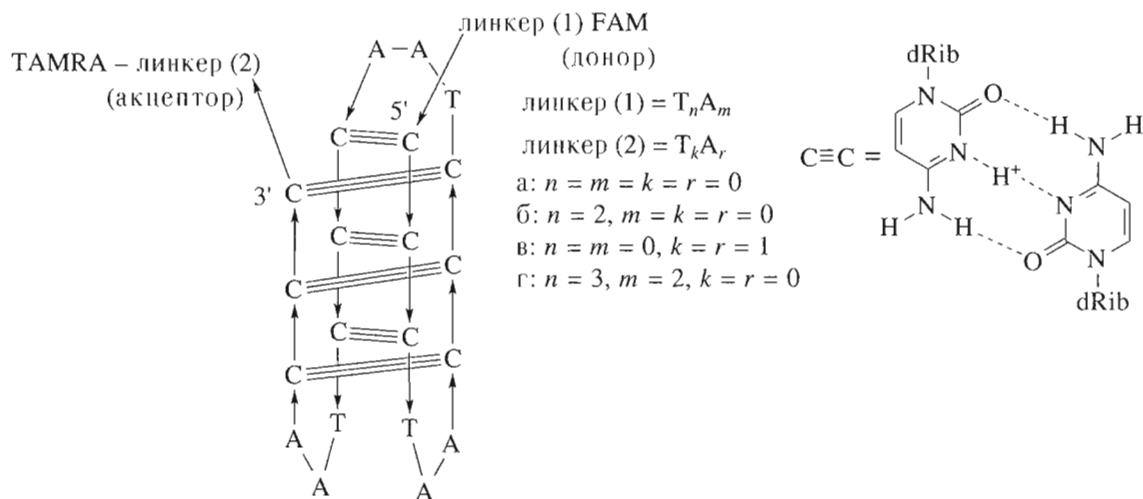


Рис. 3. Модельные олигонуклеотиды для изучения с помощью FRET термодинамики образования внутримолекулярного i -мотива из C_3 -теломерных повторов [26].

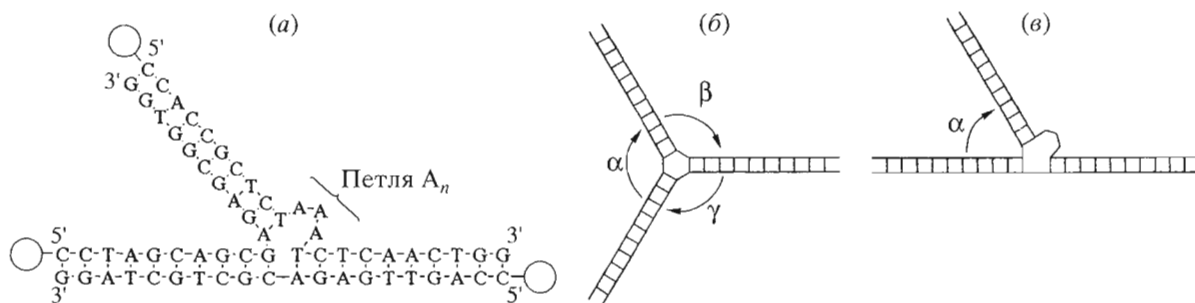


Рис. 4. Влияние размера петли (A_n) (а) на пространственную структуру трехходового сочленения ДНК [27] (в каждой из различных структур (а) мечены две из трех спиралей, положение метки обозначено кружком): (б) $n = 0$ (треугольная пирамида, $\alpha = \beta = \gamma = 86^\circ$); (в) $n = 3$ (плоская структура, $\alpha = 66^\circ$).

оптических последствиях взаимодействия соответствующих красителей. В ходе исследования оптических и термодинамических свойств нескольких модельных структур, (а)–(г), с различной длиной линкеров было установлено, что структура, в которой акцептор присоединен непосредственно к 3'-концу такого тетраплекса, а донор – к его 5'-концу через пентануклеотидный спейсер (г), позволяет достоверно и с высокой чувствительностью изучать физико-химические характеристики этих структур. В частности, на основе флуоресцентных данных было показано, что если олигонуклеотид содержит четыре повтора из блоков C_5 вместо C_3 , то температура плавления тетраплекса увеличивается с 30 до 45°C и в результате резко возрастает скорость его образования [26].

2. РАЗВЕТВЛЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Метод FRET используется также для конформационного анализа сложных узловых структур нуклеиновых кислот, которые состоят из трех, четырех и более двухцепочечных участков, схо-

дящихся в одной точке. Образование этих структур и их взаимопревращения играют важную роль в таких процессах, связанных с биологической функцией нуклеиновых кислот, как транскрипция, трансляция, сплайсинг, сайт-специфическая и гомологичная рекомбинация.

Опубликован ряд работ с детальным конформационным анализом такого рода структур с использованием FRET, например исследование конформации трехходовых сочленений в зависимости от числа дополнительных нуклеотидов в одной из цепей в месте ветвления [27, 28] (рис. 4). В частности, исследовалась взаимная ориентация ветвей Y-образной ДНК-структуры, т. е. расположение спиральных участков относительно узла стыковки трех двойных спиралей в зависимости от нуклеотидной последовательности в месте стыковки. Для этого были сконструированы структуры, имеющие в месте сочленения петлю, звенья которой не образуют уотсон-криковских пар. При этом размер петли варьировал, а концы двух из трех спиралей содержали по отдельности донор и акцептор [27] (рис. 4а).

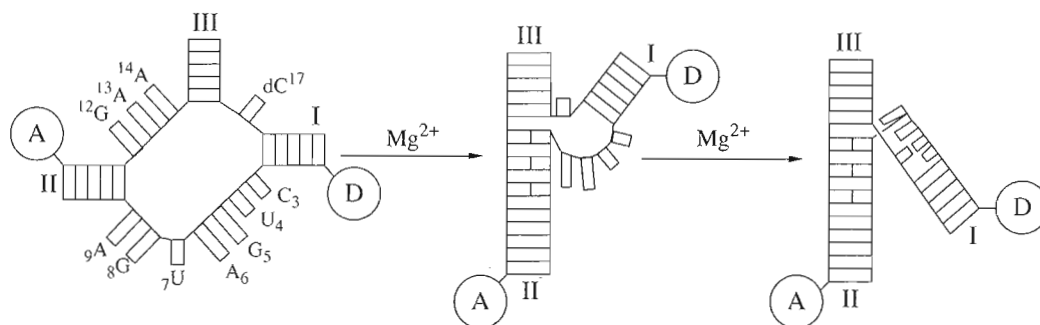


Рис. 5. Изучение механизма сворачивания субстратного комплекса молоткового рибозима при увеличении концентрации ионов магния: двум изображенным конформационным переходам отвечают концентрации Mg^{2+} в интервале 0–600 мМ и 1–25 мМ [31].

В результате было установлено, что в нативной системе, вообще не содержащей неспаренных оснований, все три спирали расположены симметрично (рис. 4б). Когда же в структуре появляется дополнительная петля, угол между двумя из этих спиралей увеличивается до такой степени, что они становятся соосными и вступают в стэкинг-взаимодействие друг с другом, а третья спираль, соседняя с дополнительной петлей, отклоняется (рис. 4в). При этом с увеличением числа звеньев в петле малая спираль образует все более острый угол по отношению к большой [27]. Показано также, что термостабильность трехчленного сочленения не зависит от наличия дополнительной петли; разрушение спиральной структуры в ходе термической денатурации начинается с внешних концов спирализованных участков и развивается, подобно застежке-молнии, по направлению к точке разветвления [28]. Эти данные, полученные с помощью FRET, подтверждают представления о геометрии таких структур, сформулированные на основе иных подходов в работах, в которых исследовалась химическая модификация нуклеиновых оснований, непосредственно входящих в узловую структуру, деградация цепи ДНК или электрофоретическая подвижность в зависимости от размера боковой петли (см., например, [29]).

С помощью FRET изучалась третичная структура молоткового рибозима, представляющего собой в комплексе с субстратом узел стыковки трех дуплексов. Флуоресцеином и тетраметилродамином были мечены концы субстратной цепи, в которой в месте расщепления цитидин заменен на его 2'-дезоксиприимидин, что позволяет сохранить целостность субстрата в составе фермент-субстратного комплекса. При этом была получена серия конструкций, в которой варьировали размеры всех трех двуспиральных участков. Значения эффективности FRET были вычислены как функции взаимных ориентаций спиралей и сравнены с экспериментально найденными величинами. Сделан вывод об Y-форме молекулы, в кото-

рой спирали I и II (ср. рис. 5) сближены друг с другом, а спираль III направлена в противоположную сторону, и на основании полученных данных сформулирована пространственная модель молекулы рибозима [30].

Близкий по характеру подход (терминальное мечение флуоресцеином (донор) и $Su3$ (акцептор) двуспиральных участков молоткового рибозима) был использован при исследовании с помощью FRET динамики взаимного расположения этих участков в составе рибозим-субстратного комплекса при постепенном увеличении концентрации Mg^{2+} от 0 до 10 мМ [31] (рис. 5). Полученные результаты согласуются с имеющимися представлениями о наличии в молотковом рибозиме двух центров связывания ионов магния и существовании двух конформационных переходов, сопровождающих последовательное заполнение этих центров. При этом прослеживаются три различные конформации молекулы и переходы между ними. Были определены равновесные концентрации Mg^{2+} и константы связывания (около 10000 и 1100 M^{-1}), соответствующие этим переходам; считается, что расщепление цепи происходит в результате второго конформационного перехода. Таким образом, используя FRET, авторы подтвердили и более детально охарактеризовали некоторые стороны механизма функционирования этого важного класса молекулярных инструментов [31].

С помощью FRET было также показано, что мутации A14G и G8U резко дестабилизируют пространственную структуру рибозима, блокируя первый этап фолдинга и связывание первого иона Mg^{2+} , что приводит к утрате каталитической активности при любых концентрациях магния. В то же время, мутация A13G вызывает ион-индуцированное образование новой третичной структуры, а мутации по G5 приводят к ингибированию второй стадии фолдинга, не затрагивая первого конформационного перехода [32].

Аналогичный подход использовался при изучении формирования структуры другой разновидности каталитически активных РНК – шпилечного рибозима, который в природном контексте представляет собой узел сочленения четырех двухспиральных ветвей. Сближение двух из этих ветвей (А и В) обеспечивает взаимодействие имеющих в них двух неспаренных участков (внутренних петель, фланкированных двумя короткими спиральями), которые и образуют при этом каталитический центр. Авторы работы [33] изучали влияние концентрации Mg^{2+} на пространственное расположение ветвей модельного четырехходового сочленения, не содержащего внутренних петель – такого рода крестообразные структуры ДНК и РНК как правило представляют собой два наложенных друг на друга дуплекса, каждый из которых содержит две ветви в состоянии коаксиального стэкинга. Конформация такой системы описывается углом между этими спиральными участками. В работе было показано, что при повышении концентрации Mg^{2+} концы четырех ветвей данной структуры смещаются согласованно попарно с образованием так называемой антипараллельной конформации. При этом была определена характеристическая концентрация ионов Mg^{2+} и вычислена соответствующая константа связывания ($2000 M^{-1}$). Предполагается, что центр связывания иона металла локализован в районе узла стыковки спиральных ветвей. Сопоставляя полученные результаты с литературными данными, авторы предложили структурную модель функционирования нативного рибозима, содержащего центр связывания второго иона Mg^{2+} в месте взаимодействия внутренних петель двух сближенных ветвей, образующих каталитический центр [33]. В работе [34] описано изучение свойств модельных четырехходовых сочленений.

FRET был использован также в анализе третичной структуры самого шпилечного рибозима и динамики его взаимодействия с субстратом путем отслеживания изменений в степени близости двух независимо формирующихся структурных доменов А и В, каждый из которых мечен одним из участников пары донор–акцептор флуоресценции [35–38]. Был сконструирован рибозим-субстратный комплекс, в котором отсутствует закрывающая петля, наиболее удаленная от места связывания субстрата. Это позволило ввести как донор (флуоресцеин), так и акцептор (гексахлорфлуоресцеин) в состав одной, рибозимной цепи и обеспечить эквимольное соотношение флуорофоров в местах, удобных для измерения соответствующих эффектов (рис. 6).

Авторы работ [36, 37] стремились рассеять последовательность реакций с участием шпилечного рибозима на индивидуальные стадии, в частности, для выяснения роли докинга (сближения)

структурных доменов. Было показано, что докинг необходим как для расщепления, где он является скоростью-лимитирующей стадией, так и для лигирования, где он предшествует скоростью-лимитирующему конформационному переходу или медленной химической стадии. Большинство модификаций (структуры РНК или же условий), которые ингибируют катализ, делают это, препятствуя докингу. Таким образом, мутации и модификации, ингибирующие какую-либо стадию после связывания субстрата, не обязательно затрагивают непосредственно стадию катализа [37]. В частности, ионы металлов не являются обязательными химическими участниками реакций, катализируемых рибозимами [36].

Полученные данные свидетельствуют о том, что фолдинг малых молекул РНК, таких как шпилечные рибозимы, в общем аналогичен фолдингу крупных рибозимов (например, интрона группы I *Tetrahymena*, классического представителя ресничатых и объекта рибозимных исследований). Константы скорости, найденные для субстратного комплекса и для комплекса, содержащего связанные продукты расщепления, сходны с константами, определенными для глобального фолдинга в более сложных молекулах РНК. Образование вторичной структуры в двух независимо складывающихся доменах происходит быстро и предшествует образованию закрытого комплекса. Гибкий район между двумя доменами функционирует как шарнир, делая возможным резкий изгиб, который позволяет доменам взаимодействовать друг с другом. Намного более высокая скорость докинга у интрона тетрахимены, по видимому, обусловлена большим числом контактов между субдоменами. В то же время скорость обмена между конформерами шпилечного рибозима сходна со скоростью обмена между популяциями конформеров, соответствующих альтернативному стэкингу в тетраспиральных ДНК-сочленениях, что согласуется с представлением о том, что междоменные взаимодействия хотя и слабы, но специфичны и функционально важны [37].

С использованием искусственных разветвленных структур и их комбинаций исследовали возможность конструирования наномеханических устройств, которые могут стать основой для сборки и функционирования управляемых молекулярных машин [39]. С этой целью была синтезирована одна из таких структур, у которой донорно-акцепторной парой флуоресцентных красителей помечены движущиеся друг относительно друга жесткие структурные элементы. В качестве таких элементов были использованы фрагменты молекулы ДНК, содержащие две точки перекреста (DX). Каждый из этих мотивов представляет собой две антипараллельные двойные спирали, которые перекрещиваются друг с другом в двух точках, разделенных нечетным числом полувитков.

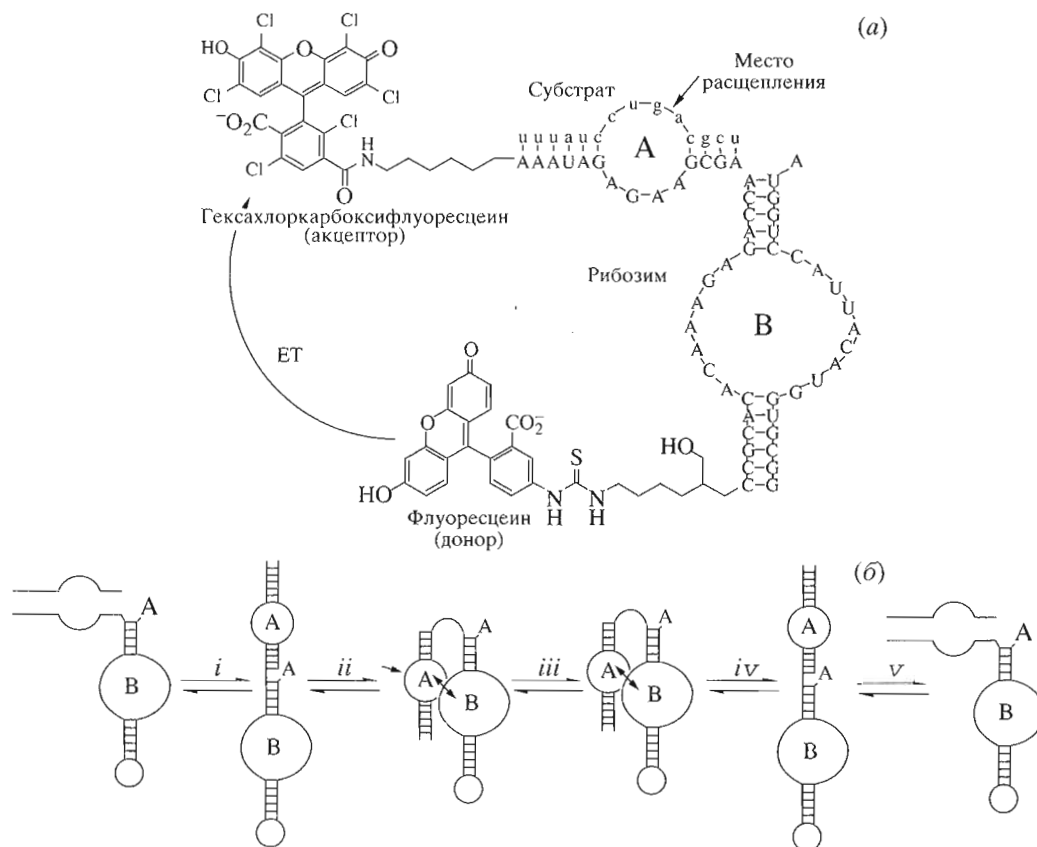


Рис. 6. Меченный флуоресцентными красителями функционально активный фрагмент шпильного рибозима (а). Стадии расщепления субстрата рибозимом: *i* – связывание субстрата; *ii* – стыковка доменов (докинг); *iii* – гидролиз фосфодиэфирной связи; *iv* – расстыковка доменов; *v* – диссоциация продуктов реакции (б) [37]. А, В – структурные домены рибозим-субстратного комплекса.

Жесткие элементы соединены двуцепочечным спиральным участком длиной в 4.5 витка, который способен переходить из правозакрученной *B*-формы в левозакрученную *Z*-форму, поворачивая при этом друг относительно друга *DX*-элементы и изменяя расстояние между донором и акцептором. Показано, что данная система позволяет надежно измерять взаимное смещение флуорофоров на расстояние около 2 нм [39].

3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С БЕЛКАМИ И РИБОЗИМАМИ

FRET довольно активно применяется для исследования кинетики ферментативного расщепления нуклеиновых кислот и анализа активности соответствующих ферментов. Дegradaция меченых нуклеиновых кислот приводит к разобщению флуорофоров, что легко детектируется по эмиссионному спектру. Дуплексы, меченные донором и акцептором по 5'-концам, использовались для исследования в реальном времени кинетики расщепления ДНК эндонуклеазой *PaeR7* [40] и расплетания геликазой [41]. Перенос энергии оказался удобным методом для мониторинга

деградации олигонуклеотидов *in vivo* [42, 43]. Так, исследовалась нуклеолитическая активность интегразы ВИЧ-1 на модельном субстрате: разъединение красителей при действии фермента проявляется в увеличении интенсивности флуоресценции донора, которая в составе исходного субстрата гасилась [42].

FRET был использован также для анализа активности РНКазы А. Субстратом при этом служил нонадезоксинуклеотид A_4rUA_4 , в котором среди восьми звеньев *dA* имелось единственное рибо-звено *rU*, естественным образом определяющее место расщепления. По-видимому, этот субстрат может реагировать со связывающим карманом фермента на всем его протяжении [44].

С помощью FRET была детально исследована кинетика замещения одной из цепей 30-звенного дуплекса (терминально меченного парой флуоресцеин-гексахлорфлуоресцеин) гомологичным 50-звенным олигонуклеотидом, которое происходит под действием белка RecA и моделирует одну из важнейших стадий гомологичной рекомбинации. Было показано, что процесс носит много-стадийный характер и проходит по крайней мере

через два промежуточных комплекса, что не удалось обнаружить другими методами [45]. В процессе гомологичной рекомбинации были дифференцированы несбалансированное образование гомологичных сочленений на каждом из концов дуплексной ДНК и последующая направленность обмена цепей. Показано, что как и в случае RecA белка *Escherichia coli*, гомологичные белки Rad51 *Homo sapiens* и *Saccharomyces cerevisiae* развивают обмен цепей ДНК преимущественно в 5'-3'-направлении. Таким образом, 5'-3'-полярность является консервативным свойством рекомбинационных филаментов [46].

С помощью FRET изучалась преорганизация (конформация) ДНК-субстрата (одноцепочечной матрицы) в связывающем кармане фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* [47]. Двойной мутант фермента (S751C, C907S), в котором было изменено положение единственного остатка цистеина, метили иодацетамидофлуоресцеином. Модельные дуплексы, состоящие из 13-звенной затравки и 35–38-звенной матрицы, меченной примерно в середине одноцепочечного участка карбоксиродамином, были сконструированы таким образом, что поочередное добавление соответствующих dNTP приводило к достройке праймера с остановкой в определенных позициях. Периодичность изменения эффективности FRET в зависимости от числа достроенных нуклеотидов позволила сделать вывод о том, что одноцепочечная матрица в составе комплекса с ферментом имеет спиральную конформацию.

Была изучена инициация обратной транскрипции генома ВИЧ, включающая в себя гибридизацию одной из нитей акцепторной ветви специфической лизиновой тРНК с участком связывания праймера на геномной РНК [48]. Показано, что нуклеокапсидный белок вируса, резко ускоряющий образование этого дуплекса *in vitro*, не способен раскручивать акцепторную ветвь тРНК в отсутствие вирусного генома. Наблюдавшееся в ходе гибридизации увеличение на 4 нм расстояния между концами акцепторной ветви означает, что негибридирующаяся нить этой ветви полностью вытесняется в ходе образования иницирующего комплекса.

Было продемонстрировано образование комплекса между донор-меченым $\sigma 70$ -холоферментом РНК-полимеразы *E. coli* и акцептор-меченой нематричной олигонуклеотидной нитью, в то время как взаимодействия с матричной нитью не наблюдались. При этом олигонуклеотид связывался только в одной ориентации. Таким образом, $\sigma 70$ использует два механизма дискриминации матричной и нематричной цепей: специфичность, определяемую первичной структурой, и специфичность, определяемую полярностью [49].

Продемонстрирована способность двуспиральной ДНК существенно изменять свою геометрию под влиянием специфического комплексообразования с белком: в присутствии ДНК-связывающе-

го фрагмента дрожжевого регулятора транскрипции PAP1 два участка в составе ДНК, разделенные 5.7 нм и меченные флуоресцеином и эозином, сближались до 4.9 нм, что соответствует изгибу двойной спирали 26° [50].

С помощью FRET были выявлены некоторые интересные характеристики рибозимного катализа. Так, в случае молотковых рибозимов было показано, что облегчающий олигонуклеотид (facilitator; он гибридизуется с субстратом вблизи 3'-конца рибозима) повышает эффективность рибозимного катализа, уменьшая скорость диссоциации рибозим-субстратного комплекса, которая конкурирует с расщеплением. Стабилизируя комплекс, образующийся с участием фланкирующих последовательностей рибозима, облегчитель способен повышать каталитическую активность даже при низких концентрациях ионов магния, существующих в клетке [51]. FRET был использован кроме того для мониторинга лигирования РНК в составе интронов группы I и расщепления РНК молотковыми рибозимами [52], а также исследования кинетики рибозимного катализа [53].

FRET зарекомендовал себя как универсальный и высокоэффективный метод изучения разнообразных структурно-функциональных аспектов нуклеиновых кислот и других биополимеров. При достойном настоящем его несомненно ждет блестящее будущее.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты № 97-03-32927а и № 98-03-33017а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лаквич Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии: Пер. с англ. М.: Мир, 1986.
2. Векшин Н.Л. // Итоги науки и техники. Сер. Радиационная химия. Фотохимия. 1989. Т. 7. С. 3–176.
3. Clegg R.M. // Meth. Enzymol. 1992. V. 211. P. 353–388.
4. Wu P., Brand L. // Anal. Biochem. 1994. V. 218. P. 1–13.
5. Selvin P.R. // Meth. Enzymol. 1995. V. 246. P. 300–334.
6. Clegg R.M. // Curr. Opin. Biotechnol. 1995. V. 6. P. 103–110.
7. Clegg R.M. // Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy / Eds X.F. Wang, B. Herman. New York: Wiley, 1996. P. 179–252.
8. Glazer A.N., Mathies R.A. // Curr. Opin. Biotechnol. 1997. V. 8. P. 94–102.
9. De Silva A.P., Gunaratne H.Q.N., Gunlaugsson T., Huxley A.J.M., McCoy C.P., Rademacher J.T., Rice T.E. // Chem. Rev. 1997. V. 97. P. 1515–1566.
10. Lankiewicz L., Malicka J., Wiczek W. // Acta Biochim. Polonica. 1997. V. 44. P. 477–490.
11. Cardullo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C., Wolf D.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 8790–8794.
12. Ozaki H., McLaughlin L.W. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 5205–5214.
13. Clegg R.M., Murchie A.I.H., Zechel A., Lilley D.M.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 2994–2998.

14. Parkhurst K.M., Parkhurst L.J. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 285–292.
15. Parkhurst K.M., Parkhurst L.J. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 293–300.
16. Morrison L.E., Stols L.M. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 3095–3104.
17. Yang M., Ghosh S.S., Millar D.P. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 15329–15337.
18. Mergny J.-L., Boutorine A.S., Garestier T., Belloc F., Rougée M., Bulychev N.V., Koshkin A.A., Bourson J., Lebedev A.V., Valeur B., Thuong N.T., Hélène C. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 920–928.
19. Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 257. P. 597–617.
20. Sixou S., Szoka F.C., Jr., Green G.A., Guisti B., Zon G., Chin D.J. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 662–668.
21. Ota N., Hirano K., Warashina M., Andrus A., Mullah B., Hatanaka K., Taira K. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 735–743.
22. Ratilainen T., Holmén A., Tuite E., Haaima G., Christensen L., Nielsen P.E., Nordén B. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 12331–12342.
23. Tóth K., Sauermann V., Langowski J. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 8173–8179.
24. Gohlke C., Murchie A.I.H., Lilley D.M.J., Clegg R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 11660–11664.
25. Vamosi G., Clegg R.M. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 14300–14316.
26. Mergny J.-L. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 1573–1581.
27. Stühmeier F., Welch J.B., Murchie A.I.H., Lilley D.M.J., Clegg R.M. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 13530–13538.
28. Stühmeier F., Lilley D.M.J., Clegg R.M. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 13539–13551.
29. Perkins T.A., Goodchild J. // *Methods Mol. Biol.* 1997. V. 74. P. 241–251.
30. Tuschl T., Gohlke C., Jovin T.M., Westhof E., Eckstein F. // *Science*. 1994. V. 266. P. 785–789.
31. Bassi G.S., Murchie A.I.H., Walter F., Clegg R.M., Lilley D.M.J. // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 7481–7489.
32. Bassi G.S., Mollegaard N.E., Murchie A.I.H., Lilley D.M.J. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 3345–3354.
33. Walter F., Murchie A.I.H., Lilley D.M.J. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 17629–17636.
34. Walter F., Murchie A.I., Duckett D.R., Lilley D.M. // *RNA*. 1998. V. 4. P. 719–728.
35. Murchie A.I., Thomson J.B., Walter F., Lilley D.M. // *Mol. Cell*. 1998. V. 1. P. 873–881.
36. Murray J.B., Seyhan A.A., Walter N.G., Burke J.M., Scott W.G. // *Chem. Biol.* 1998. V. 5. P. 587–595.
37. Walter N.G., Hampel K.J., Brown K.M., Burke J.M. // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 2378–2391.
38. Walter F., Murchie A.I.H., Thomson J.B., Lilley D.M.J. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 14195–14203.
39. Mao C., Sun W., Shen Z., Seeman N.C. // *Nature*. 1999. V. 397. P. 144–146.
40. Ghosh S.S., Eis P.S., Blumeyer K., Fearon K., Millar D.P. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 3155–3159.
41. Bjornson K.P., Amaratunga M., Moore K.J.M., Lohman T.M. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 14306–14316.
42. Lee S.P., Censullo M.L., Kim H.G., Knutson J.R., Han M.K. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 227. P. 295–301.
43. Uchiyama H., Hirano K., Kashiwasake-Jibu M., Taira K. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 380–384.
44. James D.A., Woolley G.A. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 264. P. 26–33.
45. Gumbs O.H., Shaner S.L. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 11692–11706.
46. Gupta R.C., Golub E.I., Wold M.S., Radding C.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 9843–9848.
47. Furey W.S., Joyce C.M., Osborne M.A., Klenerman D., Peliska J.A., Balasubramanian S. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 2979–2990.
48. Chan B., Weidemaier K., Yip W.T., Barbara P.F., Musier F.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 459–464.
49. Heyduk E., Heyduk T. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 3315–3322.
50. Ozaki H., Iwase N., Sawai H., Kodama T., Kyogoku Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. V. 231. P. 553–556.
51. Perkins T.A., Wolf D.E., Goodchild J. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 16370–16377.
52. Hanne A., Ramanujam M.V., Rucker T., Krupp G. // *Nucleosides Nucleotides*. 1998. V. 17. P. 1835–1850.
53. Perkins T.A., Goodchild J. // *Ribozyme Protocols* / Ed. P.C. Turner. New York: Humana Press, 1997. P. 241–251.

Fluorescence Resonance Energy Transfer in Nucleic Acid Research

I. A. Prokhorenko, V. A. Korshun, and Yu. A. Berlin[#]

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Recent data are reviewed on the employment of frequency resonance energy transfer (FRET) in studying hybridization and higher structures of nucleic acids as well as their enzyme- and ribozyme-catalyzed reactions.

Key words: energy transfer, fluorescent labels, modified oligonucleotides, ribozymes, nucleic acid three-dimensional organization

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: yuber@ibch.siobc.ras.ru.