

На правах рукописи

ГОЛЫШЕВ ВИКТОР МИХАЙЛОВИЧ

РАЗВИТИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ
РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

**Научный
руководитель**

Ломзов Александр Анатольевич

кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией структурной биологии ИХБФМ СО РАН

**Официальные
оппоненты**

Головин Андрей Викторович

доктор химических наук, профессор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

Шернюков Андрей Владимирович

кандидат химических наук, с.н.с. лаборатории магнитной радиоспектроскопии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

**Ведущая
организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства".


Защита диссертации состоится “30” марта 2022 года в 16-45 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.150.01 при ФГБУН Институте химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН) по адресу: 630090, Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХКГ СО РАН и на сайте <http://kinetics.nsc.ru>. Текст автореферата размещён на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, ИХКГ СО РАН, учёному секретарю диссертационного совета 24.1.150.01; e-mail: ref_dissovet@kinetics.nsc.ru.

Автореферат разослан “ ” _____ 2022 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



И. П. Поздняков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Короткие фрагменты нуклеиновых кислот (НК) – олигонуклеотиды, их производные и аналоги, имеющие в своей структуре различные модификации, широко используют в качестве молекулярных инструментов как в различных областях фундаментальных исследований, так при решении широкого спектра прикладных задач. Для создания агентов, способных высокоэффективно работать в данных областях, необходимо, чтобы олигонуклеотиды обладали рядом свойств, главным из которых является возможность и эффективность формирования специфических комплексов с комплементарными последовательностями ДНК и/или РНК.

Нативные олигонуклеотиды зачастую не обладают совокупностью физико-химических или молекулярно-биологических свойств, которые бы позволили их успешно использовать. В связи с этим уже разработан и продолжает расширяться широкий спектр аналогов и производных нуклеиновых кислот.

На момент начала данного исследования не существует способов оценки гибридизационных свойств производных нуклеиновых кислот на этапе предшествующем разработке подходов к их химическому синтезу и непосредственно синтезу этих соединений. Создание подходов для прогностического расчета свойств новых производных послужит фундаментальной основой рационального конструирования новых производных нуклеиновых кислот.

В качестве модельных производных НК с еще не изученными физико-химическими свойствами выбраны частично положительно заряженные и незаряженные производные олигонуклеотидов: глицин-морфолиновые и фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) и их комплексы с ДНК и РНК.

Степень разработанности темы исследования

Термодинамические параметры комплексообразования могут быть получены только для достаточно протяженных комплексов цепей НК и их производных. Обычно для исследования гибридизационных свойств коротких олигомеров используют их комплексы с полимерными матрицами, а в качестве характеристики стабильности таких комплексов - температуру плавления. Использование методов компьютерного моделирования, в частности метода молекулярной динамики (МД), для выяснения функциональных характеристик для новых аналогов и производных НК не носит систематиче-

ского характера. На момент начала работы физико-химические свойства комплексов глицин-морфолиновых и фосфорилгуанидиновых олигомеров с комплементарными ДНК и РНК не были изучены.

Целью работы является детальное изучение физико-химических свойств глицин-морфолиновых и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов и их комплементарных комплексов с ДНК и РНК, направленное на разработку подходов прогностического расчета их функциональных характеристик.

Задачи:

1. Создать подход для изучения физико-химических свойств комплексов коротких олигонуклеотидов и их производных и аналогов с ДНК и РНК.
2. Исследовать физико-химические свойства комплексов глицин-морфолиновых и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с ДНК и РНК.
3. Разработать подходы для расчёта гибридизационных свойств комплементарных комплексов производных с НК на основе функциональных характеристик, определенных экспериментально и методами молекулярно-динамического моделирования.

Научная новизна

Создан подход для изучения физико-химических свойств коротких низкостабильных комплексов НК и их производных. С его помощью охарактеризованы комплексы пентааденилатов глицин-морфолина с ДНК и РНК. Впервые проведено детальное исследование физико-химических свойств нового класса незаряженных производных НК – фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (ФГО) при помощи экспериментальных методов и методов компьютерного моделирования. Показана возможность достоверного определения концентрации ФГО при помощи метода УФ-спектроскопии. Определено влияние ФГ-модификаций на структуру модифицированных дуплексов. Разработана предсказательная модель для расчёта термодинамических параметров комплексообразования для ФГО/ДНК дуплексов при различных ионных силах раствора. С использованием представительного набора РНК/ДНК и РНК/РНК дуплексов впервые продемонстрирована принципиальная возможность достоверного расчета термодинамических параметров их формирования с использованием методов молекулярно-динамического моделирова-

ния и анализа МД-траекторий методом MMGBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area).

Теоретическая и практическая значимость

Данные о физико-химических свойствах ФГО и модель для расчета термодинамических параметров формирования ФГО/ДНК дуплексов будут применяться при дизайне ФГО зондов для приложений, нацеленных на использование их комплементарно-специфических взаимодействий с ДНК. В частности, при использовании ФГО в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР), что позволяет увеличить специфичность данного подхода. Кроме того, данные незаряженные зонды являются перспективными для селективного связывания молекул-мишеней в системах молекулярной диагностики, построенных на основе полевых транзисторов.

Модель определения термодинамических параметров комплексообразования для коротких низкостабильных олигонуклеотидов будет использована при исследовании новых аналогов и производных НК, для которых затруднен синтез протяженных олигомеров. Опробованный в работе подход расчета термодинамических параметров комплексообразования при помощи обработки МД траекторий методом MMGBSA может быть использован для оценки термостабильности комплексов новых аналогов и производных НК.

Методология и методы исследования

Экспериментальное исследование физико-химических свойств комплексов новых производных с НК проведено при помощи метода термической денатурации и метода остановленной струи с оптической регистрацией сигнала, оптической УФ-спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма. Моделирование методом молекулярной динамики проведено с использованием пакета программ AMBER с модифицированными МД-библиотеками для новых производных НК. Анализ молекулярно-динамических траекторий получения термодинамических параметров комплексообразования проводили при помощи методов MMGBSA и MMPBSA (Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area).

Положения, выносимые на защиту

1. Метод получения достоверных величин термодинамических параметров формирования комплексов коротких олигонуклеотидов и их производных, обладающих низкой термодинамической ста-

бильностью, основанный на анализе свойств их тандемных комплексов.

2. Структура и гибридизационные свойства тандемных комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК. Комплексы глицин-морфолиновых олигомеров с ДНК обладают сниженной, а с РНК - повышенной термической стабильностью относительно аналогичных немодифицированных тандемных ДНК/ДНК комплексов.

3. Структура ДНК-дуплексов практически не меняется при введении ФГ-групп. ФГ-модификации незначительно снижают термическую стабильность ДНК-дуплексов в физиологических условиях. Основной вклад в дестабилизацию ФГО/ДНК дуплексов вносит увеличение константы скорости диссоциации комплексов. Термостабильность полностью модифицированных ФГО/ДНК дуплексов слабо зависит от ионной силы раствора. Основной вклад в изменение термостабильности комплексов ФГО вносят эффекты сольватации.

4. Модель расчета термодинамических параметров комплексообразования, основанная на приближении ближайших соседей с частично или полностью модифицированной цепью в ФГО/ДНК дуплексах, позволяет получать величины термодинамических параметров с высокой точностью.

5. Возможность рассчитывать величины энтальпии формирования НК-дуплексов с точностью сопоставимой с экспериментальной, используя методы ММРВ(GB)SA при обработке молекулярно-динамических траекторий. Термостабильность комплексов олигонуклеотидов с модифицированным рибозофосфатным остовом может быть оценена данным методом на качественном уровне.

Достоверность работы

Достоверность представленных в диссертационной работе результатов и заключений обусловлена использованием современных экспериментальных подходов, методов компьютерного моделирования и воспроизводимостью полученных результатов. Значимость обсуждений и выводов в работе была признана мировым научным сообществом, что подтверждается публикациями в рецензируемых российских и международных журналах.

Апробация работы

Результаты и материалы диссертации были представлены на различных международных и российских конференциях: МНСК-54

(Новосибирск, Россия, 2016); BGRS/SB 2016 (Новосибирск, Россия); МССМВ'17 (Москва, Россия); МНСК-55 (Новосибирск, Россия, 2017); BioExcel Summer School on Biomolecular Simulation (Пула, Италия, 2018); Albany 2019: 20th Conversation (Олбани, США); OpenBio-2020 (Кольцово, Россия); Bio-Top 2020: актуальные вопросы современной биологии on-line.

Личный вклад соискателя

Вклад автора состоит в поиске, анализе и обобщении литературных данных по теме исследования, проведении всех компьютерных расчетов, анализе полученных данных, проведении представленных экспериментов, кроме части экспериментов по термической денатурации комплексов с ФГО в присутствии сорастворителей (этанола, этилен- и полиэтиленгликолей). Подготовка тезисов докладов и статей проводилась автором совместно с научным руководителем и соавторами работ.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, списка сокращений, списка цитируемой литературы, состоящего из 177 наименований. Работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 53 рисунка и 21 таблицу.

Соответствие специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Диссертационная работа соответствует п. 3 «молекулярная динамика, межмолекулярные потенциалы и молекулярная организация веществ, компьютерная молекулярная динамика как метод диагностики структуры и динамики веществ» паспорта специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность и разработанность темы, сформулированы цели и задачи исследования, описаны научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, методы исследования, формулируются положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов исследования, личный вклад автора и сведения об апробации результатов.

Первая глава посвящена обзору литературы. В *разделе 1.1.1* описаны нуклеиновые кислоты (НК) как объект исследования, вве-

дены понятия структурных особенностей НК. В *разделе 1.1.2* обсуждаются производные и аналоги НК, их биологические и физико-химические свойства, а также области применения. Кроме того, обсуждаются объекты исследования – глицин-морфолиновые аналоги (являющиеся морфолиновыми карбоксамидными миметиками) НК и фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды, несущие N, N'-замещенные остатки гуанидина. В *разделе 1.1.3* кратко описаны термодинамические свойства дуплексов НК и их производных и более подробно модели расчета термодинамических параметров комплексообразования, в частности – модель ближайших соседей. *Вторая часть* обзора литературы посвящена моделированию биомолекулярных систем методами молекулярной динамики. В *разделе 1.2.1* описаны поля сил для моделирования биомолекул. В *разделе 1.2.2* рассмотрены подходы для расчёта гибридизационных свойств биополимеров при помощи методов МД. Основной упор делается на рассмотренных в данной работе методах MMPBSA и MMGBSA. В *разделе 1.3* описаны подходы к определению концентрации олигонуклеотидов. *Раздел 1.4* посвящен основному экспериментальному методу, используемому в данной работе - методу термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Он позволяет определять термодинамические параметры комплексообразования путем подгонки теоретической кривой изменения оптической плотности при изменении температуры к экспериментальной кривой.

Вторая глава посвящена описанию используемых материалов, экспериментальных методов и методов компьютерного моделирования и анализа. В *разделе 2.1* представлены использованные в работе олигонуклеотиды. В *разделе 2.2* описаны методики измерения концентрации олигомеров, определения термодинамических и кинетических параметров комплексообразования при помощи методов термической денатурации и остановленной струи с оптической регистрацией сигнала, изучения вторичной структуры НК методом спектроскопии кругового дихроизма. В *разделе 2.3* обсуждаются методы компьютерного моделирования НК, их производных и их комплексов. Подробно описана методика создание МД библиотек мономеров глицин-морфолиновых пентааденилатов и ФГО, процедуры МД моделирования и анализа полученных траекторий. Описана база данных термодинамических параметров (энтальпия и энтропия комплексообразования) для ДНК/РНК и РНК/РНК дуплексов, взятая из литературных источников.

Третья глава посвящена описанию и обсуждению полученных результатов. В разделе 3.1 описан разработанный подход для определения физико-химических свойств коротких производных НК. Он рассматривает тандемные комплексы, обладающие большей термической стабильностью по сравнению с



Рисунок 1. Схематическое изображение исследованной системы.

комплексами коротких олигонуклеотидов. В данной схеме для определения величин термодинамических параметров одновременно анализируют несколько кривых термической денатурации комплексов различной длины (Рисунок 1). За счет различного вклада от связывания цепей и вклада кооперативного контакта на стыке дуплексных структур в константу равновесия формирования комплексов разной молекулярности удастся разделить и достоверно определить два этих вклада. В предложенном нами подходе использована упрощенная модель, предполагающая одновременное взаимодействие n коротких олигонуклеотидов A с протяженной матрицей B без промежуточных и дополнительных состояний, то есть использование приближения “все-или-ничего”:

$$K_{eff}^n(n) \quad (1).$$



Взаимодействие n олигонуклеотидов A с цепью B можно описать эффективной константой равновесия, которая характеризуется энергией связывания n олигомеров и формирования $n-1$ кооперативного контакта на стыке дуплексных структур (Рисунок 1):

$$K_{eff}^n(n) = K_b^n K_c^{n-1} \quad (2)$$

$$K_i = e^{-\Delta G_i^\circ(T)/RT} \quad (3)$$

$$\Delta G_i^\circ(T) = \Delta H_i^\circ - T\Delta S_i^\circ \quad (4),$$

где K_i – это константа равновесия: эффективная ($i=“eff”$), связывания ($i=“b”$) или кооперативного взаимодействия ($i=“c”$); $\Delta G_i^\circ(T)$ и ΔH_i° , ΔS_i° – изменение свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии при формировании соответствующего структурного элемента тандемного комплекса. Таким образом, эффективные термодинамические параметры есть комбинация вкладов от формирования двойной спирали и взаимодействия на стыке дуплексных структур.

При соблюдении равенства концентраций олигонуклеотидов A и B , приведенных на один нуклеотид ($[A]_0 = n \cdot [B]_0$), нахождение концентрации свободного олигомера A сводится к решению алгебраического уравнения степени $n+1$ на концентрацию олигонуклеотида A в свободном состоянии ($[A]$):

$$K_{eff}^n [A]^{n+1} + [A] - [A]_0 = 0 \quad (5).$$

Используя одновременную подгонку нескольких кривых термической денатурации, полученных для комплексов с разным числом коротких олигонуклеотидов (n), можно определить отдельные энергетические вклады (связывание и кооперативный контакт) в эффективную константу равновесия.

Применимость разработанной схемы получения термодинамических параметров комплексообразования была проверена на примере комплекса нативного короткого олигонуклеотида (dA_5) с различными протяженными ДНК и РНК-матрицами ($(dT_5)_n$ и $(U_5)_n$ где $n = 3, 4, 5$).

Раздел 3.2 посвящен исследованию структуры и термодинамических свойств тандемных комплексов глицин-морфолиновых (gM) пентааденилатов (gMA_5) (Рисунок 2) с ДНК и РНК цепями длиной 15, 20, 25 нт ($n=3, 4, 5$) и полимерными цепями. В качестве референсных последовательностей к gM олигомерам были выбраны пентааденилаты ДНК (dA_5).

Первый подраздел содержит информацию о вторичной структуре тандемных комплексов пентааденилатов, охарактеризованной методом спектроскопии кругового дихроизма в 1 М NaCl в нейтральных значениях pH (10 мМ какодилат натрия, pH 7.2). Изучен предельный случай – комплексы полимерных цепей ДНК ($poly(dT)$) или РНК ($poly(U)$) с короткими олигомерами. В этом случае краевые эффекты в коротких олигомерах не будут вносить определяющего вклада. Было показано, что во всех случаях формируются комплексы с НК. Это видно по совпадению спектров кругового дихроизма (КД) смеси и суммы спектров при высокой температуре и значимому различию при низкой. При 20 °C форма КД-

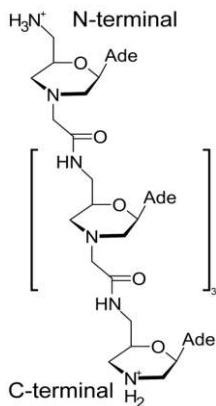


Рисунок 2. Структура пентааденилата глицин-морфолинового производного (gMA_5) при нейтральном значении pH.

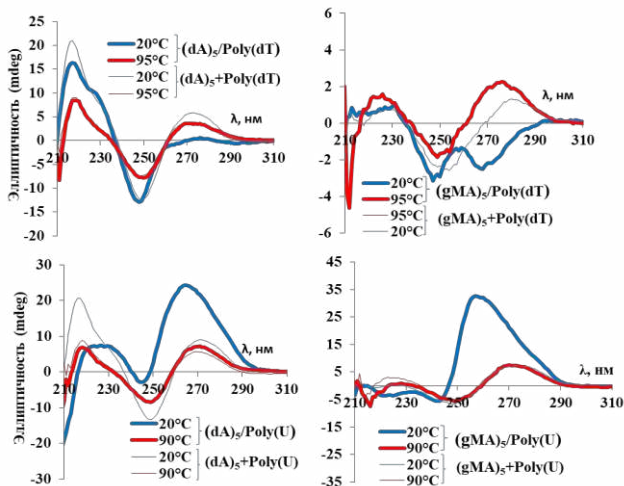


Рисунок 3. Спектры кругового дихроизма для смеси (тонкие линии) и суммы спектров (толстые линии) отдельных компонентов при высокой (красным) и низкой (синим) температуре для $(gMA_5)/poly(U)$ и $dA_5/poly(U)$, $dA_5/poly(dT)$ и $(gMA_5)/poly(dT)$.

спектров комплекса $(dA_5)/poly(dT)$ близка к спектру В-формы двойной спирали; КД спектры $(dA_5)/poly(U)$ и $(gMA_5)/poly(U)$, типичные для А-формы двойной спирали, а нетипичный вид спектра $(gMA_5)/poly(dT)$ не позволяет сделать вывод о его вторичной структуре (Рисунок 3). Для всех исследованных модельных систем наблюдаются точки изоэллиптичности, что косвенно служит свидетельством применимости модели двух состояний к описанию процесса денатурации таких комплексов.

Во втором подразделе рассмотрено влияние буферных условий на гибридизационные свойства tandemных комплексов gMA_5 с комплементарной ДНК. Для изучения влияния ионной силы раствора и значения рН на эффективность комплексообразования проведены эксперименты по исследованию термической денатурации для нативных и модифицированных комплексов при различных ионных силах раствора (10 мМ, 100 мМ, 1 М NaCl) и при различных значениях рН (5.5, 7.2, 8.0) буфера.

Уменьшение ионной силы раствора при исследованных значениях рН приводит к существенному снижению термостабильности нативной системы. Совершенно другое поведение наблюдали для модифицированного комплекса $(gMA_5)_5/(dT_{25})$. При нейтральном значении рН (7.2) происходит незначительное увеличение температуры плавления комплекса (на ~3.5 градуса) при снижении

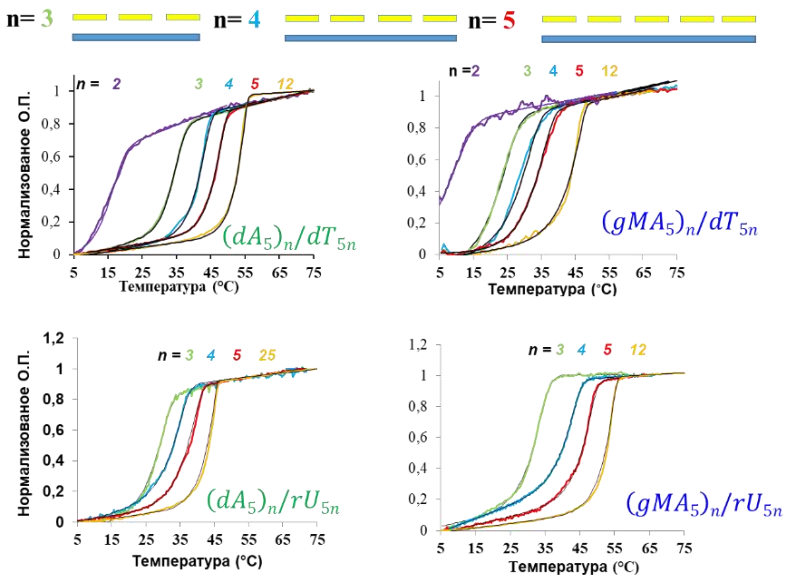


Рисунок 4. Экспериментальные (цветные толстые линии) и расчетные (тонкие черные линии, одновременная подгонка кривых при $n = 3, 4$ и 5) кривые термической денатурации для разного количества ($n = 3, 4, 5$ и $(poly(U/dT))$) тандемных олигонуклеотидов gMA_5 (A) и dA_5 .

концентрации Na^+ с 1M до 10mM. Несколько меньшая стабилизация (на ~ 1.5 градуса) наблюдается при pH 8.0. Однако при понижении pH до значения 5.5 наблюдается значимая термостабилизация комплекса (на ~ 6.5 градусов) при низких концентрациях Na^+ . В совокупности, определенные термодинамические параметры комплексообразования, величина гипохромного эффекта и литературные данные о зарядовом состоянии вторичных и третичных аминов свидетельствуют о том, что при pH 7.2 и 8.0 в глицин-морфолиновом олигомере положительно-заряжены только концевые аминогруппы (Рисунок 2), а при pH 5.5 дополнительно протонируются амины морфолиновых колец.

В третьем подразделе проведен анализ термодинамических параметров комплексообразования и кооперативного контакта при формировании тандемных комплексов. Использовано три подхода для определения термодинамических параметров. Первый - это одновременная подгонка трех кривых термической денатурации ($n = 3, 4$ и 5) для определения энтальпии и энтропии связывания ($\Delta H^{\circ}_b, \Delta S^{\circ}_b$) и кооперативного контакта ($\Delta H^{\circ}_c, \Delta S^{\circ}_c$) на стыке дуплексных структур (Рисунок 4). Второй - обработка одиночных кривых и получение эффективных термодинамических параметров

(ΔH°_{eff} , ΔS°_{eff} и ΔG°_{eff}). Третий - это использование концентрационной зависимости температуры плавления комплексов для определения эффективных термодинамических параметров.

Все три способа показали близкие значения эффективных термодинамических параметров комплексообразования, а термодинамические параметры связывания и кооперативного контакта, полученные подгонкой для комплексов с $n=3, 4$ и 5 , позволили описать и кривые термической денатурации с полимерными матрицами ДНК и РНК.

Было показано, что термическая стабильность тандемных комплексов ($dA_5)_n/(dT_{5^*n})$ оказывается незначительно выше, чем для $(gMA_5)_n/(rU_{5^*n})$, тогда как $(dA_5)_n/(rU_{5^*n})$ обладает наименьшей температурой плавления (где $n = 3, 4, 5$) при 1M NaCl при физиологическом значении рН (Таблица 1).

Четвертый подраздел посвящен молекулярно-динамическому моделированию тандемных комплексов нативных и глицин-морфолиновых пентааденилатов с 20-звенными РНК и ДНК. Был решен вопрос о конформации мономерных звеньев модифицированных олигомеров.

Таблица 1. Термодинамические параметры связывания и кооперативного взаимодействия, полученных одновременной подгонкой кривых термической денатурации ($n=3, 4, 5$) при рН равном 7.2, 1M NaCl, 10 мМ какодилате Na. В таблице приведены значения, усредненные по всем концентрациям ($[d(gM)A_5] = 4 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}$ и 4×10^{-5} M).

	РНК		ДНК	
	dA_5	gMA_5	dA_5	gMA_5
ΔH°_b , ккал/моль	-39.5	-45.3	-43.9	-30.2
ΔS°_b , кал/моль/К	-134	-168	-156	-104
ΔG°_b , ккал/моль	2.2	6.9	4.6	1.9
ΔH°_c , ккал/моль	-10.8	-19.1	-16.2	-11.2
ΔS°_c , кал/моль/К	0.0	0.0	0.0	0.0
ΔH°_{eff} , ккал/моль ^b	-47.6	-59.7	-60.4	-40.0
ΔS°_{eff} , кал/моль/К ^b	-134.5	-168.5	-170	-108
ΔG°_{eff} , ккал/моль ^b	-5.9	-7.4	-7.6	-6.5
T_{m1} , °C ^{b,c}	26.8	36.5	37.3	29.0

^b Эффективные термодинамические параметры рассчитаны для $n = 4$.

^c T_{m1} рассчитаны для концентрации пентануклеотида 10 мкМ.

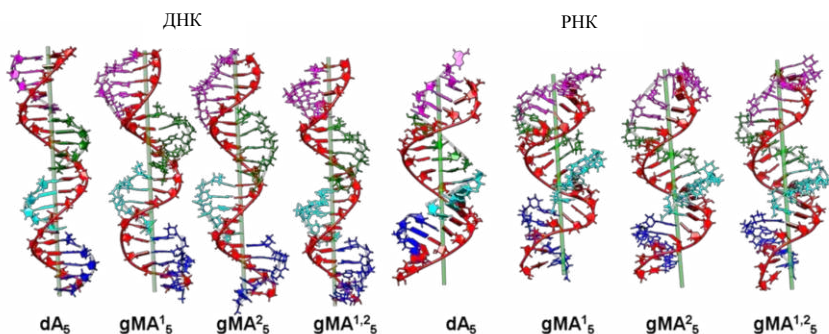


Рисунок 5. Наиболее представленные структуры в МД траекториях.

Так было установлено, что положение гетероциклического основания относительно плоскости кольца остова сохраняется в модифицированном мономере таким же, как и для нативного аденозина в β -положении [1], энергетически более выгодной конформацией морфолинового кольца является конформация “кресло”, а относительно положения С-Н связи для азота морфолинового кольца существует два конформера: gMA^1 – экваториальное, gMA^2 – аксиальное расположение связи.

МД моделирование показало, что форма ДНК/РНК tandemного комплекса близка к А-форме двойной спирали. В случае tandemного ДНК/ДНК комплекса наблюдается структура, являющейся промежуточной между В-формой и $oligo(A)$ трактом ДНК. В среднем, tandemные комплексы gM олигомеров являются более подвижными, чем нативные аналоги.

Структура модифицированных комплексов отличаются незначительно от нативных для внутренних пар оснований, а в случае концевых и расположенных на стыке дуплексных структур отклонения более значимы (Рисунок 5). Геометрия нативных ДНК или РНК цепей практически идентична у разных типов комплексов. В то же самое время наличие дополнительной связи в остова gM относительно нативных НК приводит к возникновению напряжений остова и нарушениям регулярной структуры. Это сильнее проявляется в комплексах с ДНК, чем с РНК, что связано с большей контурной длиной остова последних. Таким образом, можно ожидать, что химическое строение остова не позволит полностью модифицированным gM олигомерам формировать дуплексы с протяженными комплементарными цепями НК.

Пятый подраздел посвящен изучению физико-химических свойств комплексов гетеронуклеотидных последовательностей глицин-морфолиновых олигомеров с ДНК и РНК. На первом этапе изучена термостабильность tandemного комплекса олигомера $gM(AAACA)$ с 20-звенной ДНК. Температура плавления такого tandemного комплекса при нейтральном значении pH 7.2 в 1M NaCl была на 13 °C ниже температуры плавления комплекса $(gMA_5)_4/(dT_{20})$. Семизвенный олигомер в дуплексе с ДНК $gM(CCAAACA)/d(GCGTTTGG)$, РНК $gM(CCAAACA)/r(UGUUUGG)$ и tandemный комплекс с олигонуклеотидом $gM(CCAAACA)_2/r(UGUUUGGUGUUUGG)$ обладают термостабильностью значительно более низкой, чем нативные аналоги.

При помощи методов термической денатурации и спектроскопии кругового дихроизма было показано, что десятизвенный глицин-морфолиновый олигомер $gM(CAGCGGCGTG)$ не образует ни параллельных, ни антипараллельных комплексов с комплементарными ДНК и РНК.

Было установлено, что замена какодилатного буфера на фосфатный приводит к выпадению в осадок глицин-морфолинового олигомера, как и высокая концентрация их комплексов с НК ($\sim 10^{-3}$ M). Таким образом, дальнейшее исследование данных глицин-морфолиновых олигомеров представляется затруднительным в приложениях, предполагающих комплементарные взаимодействия модифицированных олигомеров с НК.

В разделе 3.3 диссертации представлены результаты исследования физико-химических свойств дуплексов фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (ФГО) с ДНК. ФГО - незаряженные производные нуклеиновых кислот, где один из немостиковых атомов кислорода в остатке фосфорной кислоты нуклеотида замещен на гуанидиновое производное, в данной работе - 1,3-диметилимидазолидин-2-имин. *В подразделе 3.3.1.* ставится задача, описан набор выбранных для исследования модельных олигомеров размером 8, 10 и 12 нт. Нативные олигомеры способны сформировать 21 полностью комплементарных ДНК/ДНК дуплекса. Полностью ФГ-модифицированные ДНК цепи образуют 21 ФГО/ДНК и 21 ДНК/ФГО частично модифицированных дуплекса, либо полностью модифицированные ФГО/ФГО комплексы.

Во втором подразделе исследовано влияние ФГ групп (обозначено символами PG в кодировке) на спектры поглощения в ульт-

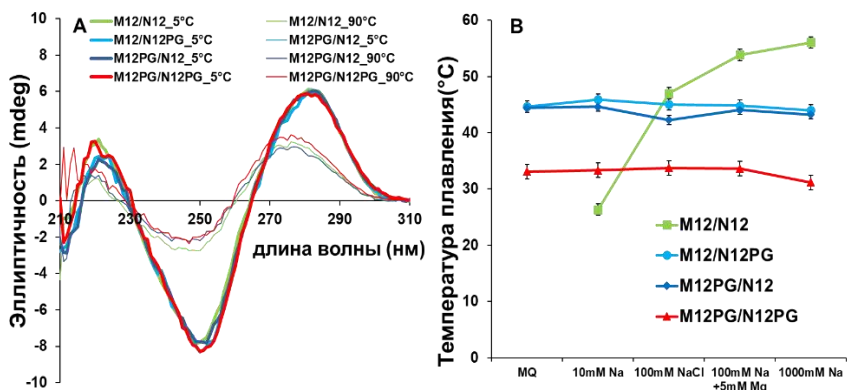


Рисунок 6. (А)Спектры КД додекамерных комплексов различных типов (ДНК/ДНК, ФГО/ДНК, ДНК/ФГО и ФГО/ФГО) при низкой (5 °С) и высокой (90 °С) температурах. Концентрация олигонуклеотидов 10 мкМ, буфер - 1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия рН 7.2. (В) Сравнение зависимостей температуры плавления от буферных условий для додекамерных комплексов различных типов (ДНК/ДНК: зеленый, ФГО/ДНК: темно-синий, ДНК/ФГО: голубой и ФГО/ФГО: красный).

трафиолетовой области спектра. Показано, что спектры нативных и полностью модифицированных олигонуклеотидов практически совпадают в области от 250 до 330 нм при высоких температурах, а в более коротковолновой области наблюдаются отличия из-за поглощения ФГ групп. Установлено, что для наиболее достоверного определения концентрации ФГО необходимо использовать оптическое поглощение олигомеров при 90 °С на длине волны 260 нм и коэффициенты экстинкции, рассчитанные в приближении суммы независимых вкладов мономерных звеньев для ДНК при высокой температуре.

Подраздел 3.3.3 посвящен исследованию структуры и гибридизационных свойств модельных комплексов окта- (М8/Н8), дека- (М10/Н10) и додекануклеотидов (М12/Н12) с одной или обеими полностью модифицированными ФГ-цепями. Исследование методом спектроскопии кругового дихроизма при низких температурах показало большую разупорядоченность ФГО цепей по сравнению с ДНК. Сопоставление спектров смеси олигонуклеотидов (Рисунок 6) показывает, что вторичные структуры всех типов комплексов (ДНК/ДНК, ФГО/ДНК, ДНК/ФГО и ФГО/ФГО) близки между собой для каждого из дуплексов окта-, дека- и додекамеров. Они типичны для В-формы двойной спирали ДНК [2]. Кроме того, было показано наличие точек изоэллиптичности для всех комплексов, что свидетельствует о формировании комплексов в приближении моде-

ли двух состояний («все-или-ничего»), предполагающей наличие только дуплекса и одноцепочечного состояния олигонуклеотидов.

Изучены гибридизационные свойства ФГО в модельных окта-, дека- и додекамерных дуплексах методом термической денатурации в различных буферных условиях (деионизованная вода, 10, 100 и 1000 мМ NaCl, а так же 100 мМ NaCl с 5 мМ MgCl₂) (Рисунок 6). По совокупности набора критериев показано, что процесс образования ДНК/ДНК и ФГО/ДНК дуплексов может быть описан в приближении модели двух состояний. Термостабильность ФГО дуплексов с ДНК слабо зависит от ионной силы раствора, незначительно увеличиваясь при уменьшении ионной силы раствора и сопоставима с термической стабильностью немодифицированных ДНК/ДНК дуплексов при 100 мМ NaCl. Термическая стабильность ФГО/ФГО комплексов существенно снижена относительно частично модифицированных ФГО/ДНК дуплексов. Наблюдаемое снижение термической стабильности модифицированных комплексов при высокой ионной силе раствора может быть связано с изменением активности воды (см. ниже).

В подразделе 3.3.4 методом остановленной струи исследовано влияние полной модификации одной из цепей на кинетику формирования дека- и додекамерных дуплексов. Константы скорости ассоциации нативных и модифицированных олигомеров находятся в диапазоне от 10^5 до 10^7 М⁻¹ с⁻¹ во всех исследованных случаях, увеличиваясь с ростом температуры. Температурные зависимости констант скоростей диссоциации ФГО и ДНК дуплексов в Аррениусовских координатах линейны и параллельны друг другу. Установлено, что дестабилизация ФГ-содержащих дуплексов происходит в результате значимого увеличения константы скорости диссоциации дуплекса, в то время, как константы скорости ассоциации отличаются не более чем на порядок.

Пятый подраздел посвящен поиску причин наблюдаемых структурных и термодинамических эффектов от введения ФГ модификаций при помощи методов молекулярного моделирования и анализа. Проведено моделирование методом МД в явной водной оболочке в течении 100 нс как для дуплексов, так и для одноцепочечных олигомеров. Исследованы модельные окта, дека- и додекамеры, изученные экспериментально. Структурные характеристики двойной спирали для нативных и модифицированных комплексов были типичны для В-формы ДНК и практически не различались

между собой, что совпадает с данными, полученными методом КД-спектроскопии.

При сравнении молекулярных моделей с небольшим числом ионов в моделируемой ячейке (нейтрализованы заряды остатков фосфорной кислоты ионами натрия) и случаем с высокой ионной силой раствора (~1 М NaCl) анализ взаимодействия комплексов с ионами и водным окружением не выявил значимых различий как для нативных, так и для модифицированных дуплексов. Установлено, что введение ФГ модификаций приводит к снижению структурированности водного окружения и к уменьшению числа водородных связей между модифицированными олигомерами и их дуплексами с водой. В то же время, изменение числа водородных связей при образовании дуплексов близко как для нативных, так и для модифицированных олигонуклеотидов. Это свидетельствует о том, что влияние активности воды на гибридизационные свойства как нативных, так и модифицированных дуплексов должно быть очень похоже.

В подразделе 3.3.6 исследовано влияние соразтворителей на термостабильности ФГО/ДНК дуплексов (Рисунок 7). В качестве агентов, снижающих активность воды, выбраны этанол, этиленгликоль (EG) и два полиэтиленгликоля со средним молекулярным весом 200 и 1000 (PEG200 и PEG1000). Для исследований выбраны модельные двенадцатизвенные дуплексы, так как они обладают достаточно высокой термостабильностью. Методом КД-спектроскопии показано, что наличие соразтворителей не приводит к изменениям формы двойной спирали при добавлении соразтворителей до 20 %. Увеличение доли этанола до 50 % приводит к линейному снижению температуры плавления всех исследованных комплексов. Кроме того, уменьшение активности воды (увеличение массовой доли соразтворителя) приводило к линейному увеличению обратной температуры плавления. Это позволило определить количество молекул воды, дополнительно связав-

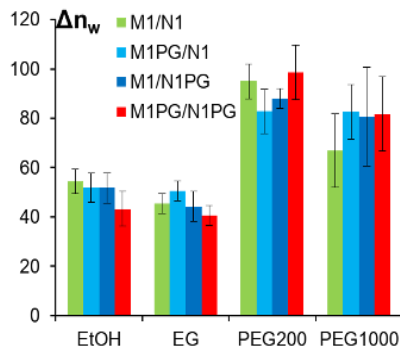


Рисунок 7. Количество молекул воды, присоединившихся в процессе образования нативного и модифицированных дуплексов, в присутствии различных соразтворителей (этанол, EG, PEG200 и PEG1000).

шихся с НК в процессе образования дуплекса (Рисунок 7), в соответствии с моделью Спинка и Чайреса [3]. Таким образом, было показано, что термодинамические эффекты при образовании ФГО-дуплексов в присутствии соразтворителей оказываются близки между собой. Это коррелирует с данными, полученными при МД анализе.

Подраздел 3.3.7 посвящен разработке подходов прогностического расчета гибридизационных параметров для ФГО/ДНК дуплексов на основании экспериментальных данных. В пункте 3.3.7.1. обсуждаются закономерности термодинамических параметров комплексообразования исследованного методом термической денатурации набора дуплексов при концентрации ионов Na^+ в растворе 10, 110 и 1010 мМ. В случае ДНК/ДНК дуплексов снижение концентрации ионов Na^+ приводит к значительному снижению их термостабильности, для ФГО/ДНК дуплексов наблюдается незначительное повышение термической стабильности с уменьшением ионной силы раствора (увеличением концентрации ионов Na^+). Усредненные значения термодинамических параметров для всей выборки ФГО/ДНК (84 комплекса) и ДНК/ДНК (42 комплекса) дуплексов близки в буфере, содержащем 100 мМ NaCl , 10 мМ какодилат натрия, рН 7.2.

В пункте 3.3.7.2. обсуждены модели прогностического расчета для ФГО/ДНК дуплексов. Полученные данные указывают на возможность применения модели ближайших соседей (БС) для ФГ-содержащих олигомеров. Предложено два подхода для построения предсказательной модели термодинамических параметров формирования дуплексов. Первый подход основан на определении инкрементов модели БС для всех 16 ФГ-модифицированных динуклеотидных ФГО/ДНК пар. Второй рассматривает введение ФГ-модификации в динуклеотидный шаг как дополнительной поправки к параметрам модели БС для ДНК. Было показано, что наибольшим дестабилизирующим эффектом обладает введение ФГ группы в шаг 5'-С*С-3'/5'-GG-3' (ФГ-группа обозначена символом “*”), а наименьшим - в 5'-G*С-3'/5'-GC-3'. Точность предложенных моделей при различных ионных силах раствора сопоставима с точностью модели БС для ДНК/ДНК дуплексов.

В разделе 3.4 изучена возможность расчета термодинамических параметров комплексообразования с использованием МД моделирования. В подразделе 3.4.1. показана принципиальная возмож-

ность расчета энтальпии и энтропии комплексообразования при помощи методов обработки МД траекторий. Проведено МД моделирование (100 нс) для каждого дуплекса и отдельных олигомеров из набора 65 ДНК/РНК [4] и 75 РНК/РНК [5] дуплексов, для которых опубликованы экспериментально полученные величины термодинамических параметров комплексообразования. Полученные траектории проанализированы методами ММРВ(GB)SA и Q-harm/N-mode для расчета энтальпии и энтропии связывания, соответственно.

Использование метода ММГБСА дает наилучшую корреляцию экспериментальных и расчетных величин как для РНК/РНК, так и для ДНК/РНК комплексов, причем использование однотраекторного подхода позволяет добиться величины ошибки ~10%, что сопоставимо с точностью модели БС для таких видов дуплексов.

В *подразделах 3.4.2. и 3.4.3.* проведен анализ применимости МД-подходов для расчета гибридизационных свойств глицин-морфолиновых и фосфорилгуанидиновых олигомеров. Наблюдается качественное согласие рассчитанных величин термодинамических параметров с экспериментальными данными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Детально изучены физико-химические свойства глицин-морфолиновых и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (ФГО) и их комплексов, на основании чего созданы подходы для изучения и прогностического расчета их свойств.

1. Разработан метод экспериментального определения достоверных величин термодинамических параметров комплексообразования, а также формирования отдельных структурных элементов tandemных комплексов коротких низкостабильных комплексов НК и их производных.

2. Показано, что по данным КД-спектроскопии РНК в tandemных комплексах с глицин-морфолиновыми пентааденилатами находится в А-форме. Структуру с ДНК в аналогичных комплексах установить не удалось. Определены гибридизационные свойства пентааденилатов глицин-морфолинов с ДНК и РНК. Комплексы глицин-морфолиновых олигомеров с ДНК обладают сниженной, а с РНК - повышенной термической стабильностью относительно аналогичных немодифицированных tandemных ДНК/ДНК комплексов.

3. Изучены физико-химические свойства ФГО. Формирование комплексов ФГО/ДНК и ФГО/ФГО может быть описано в рамках приближения модели двух состояний. Термостабильность ФГО комплексов незначительно увеличивается при уменьшении ионной силы раствора и сопоставима с термической стабильностью немодифицированных ДНК/ДНК дуплексов при 100 мМ NaCl. Термическая стабильность ФГО/ФГО комплексов существенно снижена относительно ФГО/ДНК дуплексов. Изменение активности воды приводит к близким изменениям термостабильности ДНК/ФГО и аналогичным им ДНК/ДНК дуплексам. Установлено, что введение ФГ-модификаций не изменяет форму двойной спирали, повышает подвижность цепи, а изменение сольватации является наиболее вероятной причиной изменения термостабильности комплексов.

4. На основании приближения ближайших соседей разработана модель прогностического расчета величин термодинамических параметров формирования ФГО/ДНК дуплексов (ΔG°_{37} , ΔH° , ΔS° и $T_{пл}$), как для полностью, так и частично-модифицированных олигомеров в различных солевых условиях (10 – 1010 мМ Na⁺). Прогностическая точность разработанного подхода при расчете свободной энергии Гиббса составляет 0.3 ккал/моль, а температуры плавления – 1.4 °С.

5. Показана возможность достоверного расчета энтальпии комплексобразования (ΔH°) для наборов РНК/ДНК (75 шт.) и РНК/РНК (65 шт.) дуплексов при анализе МД траекторий дуплексов методом MMGBSA. Ошибка расчета сопоставима с величиной экспериментальной ошибки и составляет 8%. Оценку гибридизационных свойств дуплексов ФГО с комплементарными ДНК и глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК можно проводить на качественном уровне.

Публикации автора по теме диссертации

1. A new approach to precise thermodynamic characterization of hybridization properties of modified oligonucleotides: Comparative studies of deoxyribo- and glycine morpholine pentaadenines / **V. M. Golyshev**, T. V. Abramova, D. V. Pyshnyi, A. A. Lomzov // *Biophysical Chemistry*. – 2018. – Vol. 234. – P. 24-33. DOI: 10.1016/j.bpc.2017.12.004.
2. Structure and hybridization properties of glycine morpholine oligomers in complexes with DNA and RNA: Experimental and molecular dynamics studies / **V. M. Golyshev**, T. V. Abramova, D. V. Pyshnyi, A. A. Lomzov // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2019. – Vol. 123. – № 50. – P. 10571-10581. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b07148.
3. **Golyshev V. M.** Effects of phosphoryl guanidine modification of phosphate residues on the structure and hybridization of oligodeoxyribonucleotides / **V. M. Golyshev**, D. V. Pyshnyi, A. A. Lomzov // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2021. – Vol. 125. – № 11. – P. 2841-2855. DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c10214.
4. **Гольшев В. М.** Расчет энергии формирования дуплексов РНК/РНК и ДНК/РНК на основании метода молекулярной динамики / **В. М. Гольшев**, Д. В. Пышный, А. А. Ломзов // *Молекулярная биология*. – 2021. – Т. 55. – №. 6. – С. 1030-1044. DOI: 10.31857/S0026898421060069 // **Golyshev V. M.** Calculation of energy for RNA/RNA and DNA/RNA duplex formation by molecular dynamics simulation / **V. M. Golyshev**, D. V. Pyshnyi, A. A. Lomzov // *Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 55. – № 6. – P. 927-940. DOI: 10.1134/s002689332105006x
- A5. Structure and hybridization properties of phosphoryl guanidine oligonucleotides under crowding conditions / M. A. Kanarskaya, **V. M. Golyshev**, D. V. Pyshnyi, A. A. Lomzov // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2021. – Vol. 577. – P. 110-115. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.09.001

Список литературы:

1. Synthesis and properties of nucleic acid methylene carboxamide mimics derived from morpholine nucleosides / T. V. Abramova, M. F. Kassakin, Y. V. Tarasenko [et al.] // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2012. – Vol. 38. – № 4. – P. 400-411.
2. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA / J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renčiuk, M. Vorlíčková // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – Vol. 37. – № 6. – P. 1713-1725.

3. Spink C. H. Effects of hydration, ion release, and excluded volume on the melting of triplex and duplex DNA / C. H. Spink, J. B. Chaires // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – № 1. – P. 496-508.
4. Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes / N. Sugimoto, S. Nakano, M. Katoh [et al.] // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34. – № 35. – P. 11211-11216.
5. Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson - Crick base pairs / T. Xia, J. SantaLucia, M. E. Burkard [et al.] // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – № 42. – P. 14719-14735.

Работа поддержана грантами РФФИ № 20-43-543029, 19-34-90127, РНФ № 18-14-00357 и ПФНИ РФ № 0245-2021-0007, 0245-2021-010.