

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель

к.ф.-м.н. Ломзов Александр Анатольевич

Новосибирск - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ.....	17
1.1.1. Нуклеиновые кислоты.....	17
1.1.2. Производные нуклеиновых кислот.....	18
1.1.3. Термодинамические свойства НК и их производных.....	23
1.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ.....	28
1.2.1. Силовые поля в методе молекулярной динамики.....	29
1.2.2. Изучение гибридизационных свойств биополимеров при помощи метода молекулярной динамики.....	31
1.3. РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ.....	34
1.4. МЕТОД ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ С ОПТИЧЕСКОЙ РЕГИСТРАЦИЕЙ СИГНАЛА.....	37
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	41
2.1. МАТЕРИАЛЫ.....	41
2.1.1. Олигонуклеотиды.....	41
2.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ.....	42
2.2.1. Определение концентрации.....	42
2.2.2. Метод термической денатурации с оптической регистрацией сигнала.....	42
2.2.3. Спектроскопия кругового дихроизма.....	43
2.2.4. Метод остановленной струи.....	43
2.3. КОМПЬЮТЕРНЫЕ РАСЧЕТЫ.....	44
2.3.1. Библиотеки для глицин-морфолиновых пентааденилатов.....	44
2.3.2. Создание МД библиотек для фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов.....	44

2.3.3.	Подготовка структур для МД моделирования.....	45
2.3.4.	Процедура МД моделирования.....	45
2.3.5.	Анализ МД траекторий.....	47
2.3.6.	База данных ДНК/РНК и РНК/РНК дуплексов.....	48
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	49
3.1.	ПОДХОД ДЛЯ РАСЧЕТА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОРОТКИХ ПРОИЗВОДНЫХ НК.....	49
3.2.	СТРУКТУРА И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ГЛИЦИН-МОРФОЛИНОВЫХ ПЕНТААДЕНИЛАТОВ С ДНК И РНК	57
3.2.1.	Характеризация вторичной структуры комплексов методом спектроскопии кругового дихроизма	57
3.2.2.	Влияние буферных условий на гибридизационные свойства глицин-морфолиновых олигомеров	59
3.2.3.	Анализ термодинамических параметров комплексообразования и кооперативного контакта глицин-морфолиновых олигомеров.....	64
3.2.4.	Компьютерное изучение физико-химических свойств модельных комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов	71
3.2.4.1.	Структурные особенности тандемных комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК.....	71
3.2.4.2.	Сольватационные особенности тандемных комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК.....	78
3.2.5.	Изучение физико-химических свойств комплексов гетеронуклеотидных глицин-морфолиновых олигомеров с ДНК и РНК.....	79
3.3.	ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ДНК.....	83
3.3.1.	Модельные системы ФГО.....	83
3.3.2.	Определение влияния ФГ групп на спектры поглощения в УФ.....	86
3.3.3.	Изучение модельной системы окта-, дека- и додекамерных дуплексов	89
3.3.3.1.	Исследование структуры ФГО и их комплексов методом кругового дихроизма.....	89

3.3.3.2. Исследование гибридизационных свойств ФГО на примере модельных окта-, дека- и додекамерных дуплексов	92
3.3.3.3. Исследование гибридизационных свойств ФГО с РНК.....	98
3.3.4. Исследование кинетики формирования ФГО/ДНК дуплексов.....	100
3.3.5. Исследование ФГО и их дуплексов методами компьютерного моделирования.....	103
3.3.6. Влияние соразтворителей на термостабильно ФГО дуплексов с ДНК	109
3.3.7. Исследование гибридизационных свойств набора ФГО дуплексов	115
3.3.7.1. Анализ полученных результатов термодинамических параметров комплексообразования	116
3.3.7.2. Предсказательные модели для расчетов термодинамических параметров комплексообразования ФГО/ДНК дуплексов.....	118
3.4. РАСЧЕТ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ПАРАМЕТРОВ НА ОСНОВЕ МД МОДЕЛИРОВАНИЯ	123
3.4.1. МД моделирование ДНК/РНК и РНК/РНК комплексов.....	123
3.4.1.1. Энергия формирования РНК/РНК комплексов	125
3.4.1.2. Энергия формирования ДНК/РНК комплексов.....	130
3.4.2. Расчёт энергий формирования для комплексов с ФГО при помощи компьютерного моделирования	136
3.4.3. Расчёт энергий формирования комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК при помощи компьютерного моделирования	138
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	145
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Короткие фрагменты нуклеиновых кислот (НК) – олигонуклеотиды, их производные и аналоги, имеющие в своей структуре различные химические модификации, широко используют в качестве молекулярных инструментов как в различных областях фундаментальных исследований, так для решения широкого спектра прикладных задач. В частности, их используют в качестве молекулярных зондов для детального изучения работы ферментативных систем *in vitro* и *in vivo*, изучения метаболических путей и т.д. Аналоги нуклеиновых кислот уже используют в медицине в роли НК-направленных терапевтических средств [1], а также зондов в молекулярной диагностике [2].

Для создания агентов, способных высокоэффективно работать в данных областях необходимо, чтобы олигонуклеотиды обладали рядом свойств, одним из главных среди которых является возможность формировать специфические комплексы с комплементарными последовательностями ДНК и/или РНК, а также селективно воздействовать на молекулярно-биологические процессы. Нативные олигонуклеотиды зачастую не обладают совокупностью физико-химических, молекулярно-биологических и биологических свойств, которые бы позволили их успешно использовать. В связи с этим уже разработан и продолжают создаваться широкий спектр аналогов и производных нуклеиновых кислот. Такие соединения могут обладать модифицированными гетероциклическими основаниями, остатком сахара, замещенным остатком фосфорной кислоты или измененным сахарофосфатным остовом. Наибольшую популярность приобрели соединения, обладающие модифицированным остовом: фосфотиоатные производные (PS) [3], “замкнутые” нуклеиновые кислоты (LNA) [4], пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) [5] и фосфордиамидные морфолиновые олигонуклеотиды (PMO) [6]. Два последних можно отнести к отдельному классу незаряженных аналогов, к которым также можно отнести метилфосфонаты [7], фосфорамиды [8], и ряд

других, в которых замещен один из немостиновых атомов кислорода в остатке фосфорной кислоты [9]. Такие соединения уже используют в системах молекулярной диагностики, а также на их основе разработаны лекарственные препараты, одобренные управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) [10,11].

Наиболее важным свойством таких аналогов являются способность формировать специфичные стабильные комплексы с ДНК и/или РНК. Их физико-химические свойства должны быть достаточно изучены, и они должны обладать химической и биологической стабильностью. Важной положительной чертой аналогов НК является удобство, простота и вариативность их химического синтеза, что приводит к их умеренной стоимости, и как следствие, более широкому использованию.

Например, введение PS-модификации достаточно просто и требует лишь изменения одного из этапов эффективного твердофазного синтетического цикла – окисления атома фосфора. Это позволяет получать PS-олигомеры на основе практически любых амидофосфитных мономеров, в различных положениях олигомерной цепи [10]. В случае LNA олигомеров используют модифицированные мономеры, которые так же могут быть введены в любую позицию в рамках стандартного протокола синтеза [11]. PNA и PМО аналоги значительно проигрывают им, поскольку предполагают использование для их синтеза специальных предшественников и методов синтеза [12]. Амидофосфатные производные с замещенной фосфатной группой, обладают относительно простым методом синтеза по сравнению с другими нейтральными аналогами. Однако относительная простота получения не сделала их популярными из-за ряда причин. В частности, подверженности кислотному гидролизу [13] и сниженной стабильности их комплексов с РНК [14]. Обе эти проблемы – химическая стабильность и высокая эффективность молекулярной гибридизации, критически важны для их применения в качестве ген-направленных соединений при доставке методом эндоцитоза и блокирования транскрипции или трансляции. Кроме того, указанные незаряженные аналоги олигонуклеотидов имеют ограниченное применение в других областях исследований, например, НК диагностике. Для

ряда аналогов, несмотря на значительную эффективность связывания НК-аналитов, они могут быть использованы лишь в тех аналитических системах, в которых не требуется превращения гибридационных комплексов под действием НК-процессирующих ферментов (например, лигаз или полимераз).

Таким образом, поиск новых аналогов нуклеиновых кислот, которые позволяли бы использовать такие олигомеры в качестве элементов систем молекулярной диагностики или же разработать на их основе олигонуклеотидные терапевтические средства, способные эффективно проникать в клетки в отсутствие трансфекционных агентов или иных средств доставки остается актуальной задачей.

В 2009 году в ИХБФМ СО РАН был разработан способ синтеза производных НК, сочетающих в себе свойства РНА и РМО. В них мономеры соединяются при помощи пептидных связей, а остаток сахара заменен на морфолиновое кольцо. Было показано, что эти глицин-морфолиновые (gM) производные образуют стабильные комплексы с нативными ДНК и РНК в определенных буферных условиях. Такие свойства делают их перспективными агентами для использования в терапевтических целях и биосенсорных технологиях. До начала данной работы не были подробно изучены их физико-химические свойства, так как химический синтез протяженных цепей таких производных длиной более 8-10 нуклеотидных звеньев затруднен.

В 2014г. в ИХБФМ СО РАН разработаны новые незаряженные аналоги НК - фосфорилгуанидиновые (ФГ) олигонуклеотиды, несущие N, N'-замещенные остатки гуанидина [15]. Получение ФГ-производных, даже полностью замещенных, достаточно удобно, и существенно легче, чем синтез конструкций на основе РНА, РМО и gM. Модификация остова затрагивает только фосфатный остаток и может быть осуществлена в рамках стандартного твердофазного амидофосфитного метода синтеза на стадии окисления присоединенного звена. Следовательно, можно использовать различные коммерчески доступные мономеры (дезокси-, 2'-ОМе-, LNA, и др.), для создания разных комбинаций типов межнуклеотидных фосфатных звеньев (фосфодиэфирных, фосфотиоатных, фосфорилгуанидиновых) в рамках одной олигомерной цепи. Полностью

модифицированные ФГО устойчивы в кислых и щелочных условиях в диапазоне значений pH от 1 до 11, а так же подвержены действию нуклеаз. В отличие от отрицательно заряженного фосфотиоатного остатка ФГ-группа не несет заряда, и, следовательно, получаемые полностью замещенные ФГ-олигомеры являются электронейтральными в физиологических условиях. Для анализа полностью модифицированных олигомеров, разработан метод электрофоретического анализа нейтральных молекул в присутствии SDS (sodiumdodecylsulfate) [16].

На данный момент начаты исследования физико-химических свойств таких соединений. Полученные данные показывают, что физико-химические свойства отдельных диастереомеров ФГО оказываются чрезвычайно близки между собой [17]. Проведенные исследования влияния числа и позиции ФГ-модификаций на структуру и гибридизационные свойства показывают, что введение таких модификаций, даже во все остатки фосфорной кислоты олигомера, слабо изменяет тип пространственной организации олигонуклеотидов и их дуплексов с ДНК и РНК [18,19]. Обнаружено влияние нуклеотидного состава на стабильность их дуплексов с ДНК и РНК [18]. Кроме того, установлена возможность образования G-квадруплексов фосфорилуанидиновыми олигомерами [20]. Показана возможность эффективного использования ФГО при изучении работы ферментативных систем, например, для создания уникальных систем анализа специфических ферментативных активностей на примере тирозил-ДНК фосфодиэстеразы 1 [21]. Применение ФГ-модифицированных олигомеров в ПЦР анализе показало преимущество их использования для уменьшения мультимеризации ДНК при использовании Vst-полимеразы [22] или для выявления аллель специфичных мутаций [23].

Проведённые исследования биологической активности так же показывают высокий потенциал фосфорилгуанидиновых производных. Показана возможность их использования в системах регуляции биологической активности, в частности регуляции активности бактериальной рибонуклеазы Р [24,25] и для эффективного подавления вируса гриппа в клетках [26]. Стоит упомянуть, что полностью модифицированные незаряженных ФГО лучше проникают в клетку, по сравнению

с немодифицированными олигонуклеотидами, и обладают значительно увеличенным временем полудеградации [27].

В рамках оптимизации работы биосенсора на основе транзисторов со структурой кремний на изоляторе (КНИ-транзисторов) показана возможность использования полностью модифицированных ФГО, содержащих остатки тетраалкилзамещенного гуанидина – 1,3-диметилимидазолидин-2-имина, для достоверной детекции целевой РНК [28]. Главными преимуществами ФГО в данной модели является отсутствие отрицательного заряда остова, за счет чего наблюдается большая чувствительность и достоверность сигнала биосенсора.

Несмотря на то, что уже показано применение ФГО для решения разнообразных задач, их использование все еще остается ограниченным, ввиду низкого уровня изученности их физико-химических свойств. Во многом, успех применения РМО, РНА и LNA обусловлен тем, что структура их комплексов и гибридизационные свойства достаточно хорошо исследованы. Так, разработана эмпирическая модель предсказания температуры плавления РНА/ДНК дуплексов, основанная на пересчете термостабильности для ДНК/ДНК дуплексов [29]. В случае LNA-содержащих олигонуклеотидов показана применимость модели ближайших соседей для расчета энергии их комплексообразования с ДНК [30–32].

Данные о гибридизационных свойствах олигомеров, как нативных, так и модифицированных совершенно необходимы при создании молекулярных зондов в диагностических системах, ПЦР анализе, при дизайне моделей для исследования работы ферментативных систем и генной терапии и при изучении влияния пространственной организации нуклеиновых кислот на их биологическую функцию. Важность достоверного расчета гибридизационных свойств подтверждается тем, что до сих пор появляются работы, направленные на улучшение прогностического расчета таких свойств для нативных НК [33–35], несмотря на то, что первые модели были предложены более 40 лет назад и были существенно улучшены в конце 1990-х – начале 2000-х годов [33].

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 используют температуру плавления. Использование методов компьютерного моделирования, в частности метода молекулярной динамики (МД), для выяснения функциональных характеристик для новых аналогов и производных НК не носит систематического характера. На момент начала работы физико-химические свойства комплексов глицин-морфолиновых и фосфорилгуанидиновых олигомеров с комплементарными ДНК и РНК не были изучены.

Целью данного исследования 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 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 показана принципиальная возможность достоверного расчета термодинамических параметров их формирования с использованием методов молекулярно-динамического моделирования и анализа МД-траекторий методом MMGBSA.

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 более 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 MMPB(GB)SA.

Положения, выносимые на защиту:

1. Метод получения достоверных величин термодинамических параметров формирования комплексов коротких олигонуклеотидов и их производных, обладающих низкой термодинамической стабильностью, 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 автора. 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 соразтворителей (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, трёх глав, заключения, списка цитируемой литературы, состоящего из 177 наименований. Работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 53 рисунка и 21 таблицы.

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.

Публикации

По результатам представленного исследования опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах, входящих в международные реферативные базы данных Web of Science и Scopus, рекомендованных ВАК:

1. **Golyshev V. M., Abramova, T. V., Pyshnyi, D. V., & Lomzov, A. A.** A new approach to precise thermodynamic characterization of hybridization properties of modified oligonucleotides: Comparative studies of deoxyribo- and glycine morpholine

pentaadenines //Biophysical chemistry. – 2018. – Т. 234. – С. 24-33. DOI: 10.1016/j.bpc.2017.12.004.

2. **Golyshev V. M.**, Abramova, T. V., Pyshnyi, D. V., & Lomzov, A. A. Structure and hybridization properties of glycine morpholine oligomers in complexes with DNA and RNA: experimental and molecular dynamics studies //The Journal of Physical Chemistry B. – 2019. – Т. 123. – №. 50. – С. 10571-10581. DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b07148.

3. **Golyshev V. M.**, Pyshnyi D. V., Lomzov A. A. Effects of Phosphoryl Guanidine Modification of Phosphate Residues on the Structure and Hybridization of Oligodeoxyribonucleotides //The Journal of Physical Chemistry B. – 2021. – Т. 125. – №. 11. – С. 2841-2855. DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c10214.

4. Kanarskaya M. A., **Golyshev V. M.**, Pyshnyi D. V., Lomzov A. A. Structure and hybridization properties of phosphoryl guanidine oligonucleotides under crowding conditions //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2021. – Т. 177.– С. 110-115. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.09.001

5. **В. М. Голышев**, Д. В. Пышный, А. А. Ломзов. (2021) Расчет энергии формирования РНК/РНК и ДНК/РНК дуплексов на основании метода молекулярной динамики. Молекулярная Биология, 55(6), 1030-1044// **V. M. Golyshev**, D. V. Pyshnyi, A. A. Lomzov. (2021) Calculation of RNA/RNA and DNA/RNA duplexes formation energy based on molecular dynamics simulation. Molecular Biology, 55(6), 927-940.

Благодарности

Автор благодарит за предоставление олигонуклеотидов для исследований с.н.с. ЛОС ИХБФМ Абрамову Т.В. (глицин-морфолиновые олигонуклеотиды) инженера ЛБМХ ИХБФМ СО РАН Бушуеву Т.Ю (ДНК), м.н.с. Крашенинину О.А. ЛХРНК (РНК), а так же ООО “НооГен” (ФГО).

Автор выражает особую благодарность член-корреспонденту, д.х.н., профессору РАН Д.В. Пышному (ИХБФМ СО РАН) за обсуждение, рекомендации, наставления, а также неоценимую помощь по искусству представления

полученных данных; к.х.н. М.С. Купрюшкину, доктору философии И. С. Довыденко, к.х.н. Г. Ю. Шевелеву, к.х.н. И.А. Пышной, В.С. Апухтиной и Т.Д. Жаркову за обсуждение полученных данных. Особую благодарность автор выражает к.ф.-м.н. А. А. Ломзову (ИХБФМ СО РАН) за рекомендации и практическое руководство, неоценимый вклад как в обучение всем экспериментальным методикам, так и методам компьютерного моделирования, постоянную поддержку и великолепное научное руководство.

И конечно же благодарю всю мою семью за любовь и поддержку!

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Нуклеиновые кислоты и их производные

1.1.1. Нуклеиновые кислоты

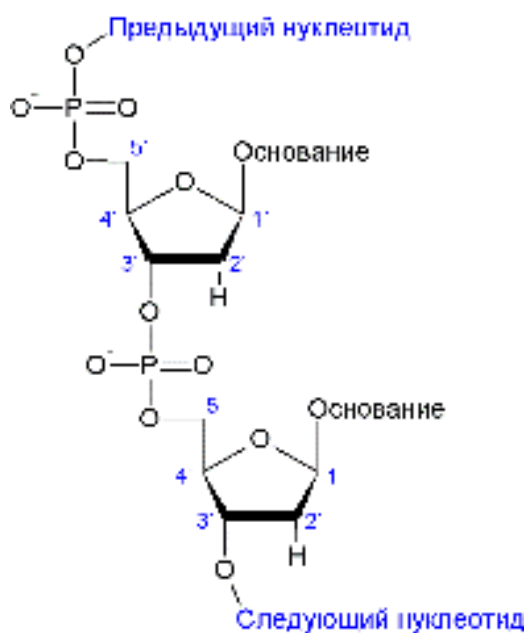


Рисунок 1. Схематичное изображение цепи ДНК.

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) – это биологические полимеры, выполняющие в живом организме такие функции как хранение, передача и реализация наследственной информации. Мономерами нуклеиновых кислот являются нуклеотиды, которые в свою очередь состоят из гетероциклического основания, сахара пентозы - рибозы или дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. В состав нуклеиновых кислот входят азотистые основания двух типов: пуриновые – аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые – цитозин (С) и тимин (Т), а в РНК тимин заменен на уридин (U) [36]. В НК азотистое основание соединено с пентозой N-гликозидной связью, образованной N₁-атомом пиримидина или N₉-атомом пурина с 1' атомом углерода в пентозе (Рисунок 1).

Первичная структура НК - направленная от 5' к 3' последовательность нуклеотидов в цепи. Нуклеозиды соединены между собой фосфодиэфирной связью, расположенной между 5' атомом углерода одного к 3' атомом углерода другого нуклеозида.

Две комплементарные цепи могут образовывать антипараллельные правозакрученные двойные спирали за счет комплементарных взаимодействий

Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) – это биологические полимеры, выполняющие в живом организме такие функции как хранение, передача и реализация наследственной информации. Мономерами нуклеиновых кислот являются нуклеотиды, которые в свою очередь состоят из гетероциклического основания, сахара пентозы - рибозы или дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. В состав нуклеиновых кислот входят азотистые основания двух типов: пуриновые – аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые – цитозин (С) и тимин (Т), а в РНК тимин заменен на уридин (U) [36]. В НК азотистое основание соединено с пентозой N-гликозидной связью, образованной N₁-атомом пиримидина или N₉-атомом пурина с 1' атомом углерода в пентозе (Рисунок 1).

при образовании Уотсон-Криковских пар [37]. При этом основания формируют водородные связи: аденин образует две водородные связи с тиминном (или уридином в РНК), а гуанин с цитозином - три водородные связи. Дополнительно такие структуры стабилизируются за счет стэкинг взаимодействия между парами азотистых оснований [38]. Такие структуры называются каноническими дуплексами.

1.1.2. Производные нуклеиновых кислот

Производные и аналоги нуклеиновых кислот, обладающие улучшенными относительно нативных аналогов свойствами, используют для нужд терапии [39,40], биосенсорных технологий [41], молекулярно-биологических исследований и в биотехнологии [42]. Существует большое количество различных производных нуклеиновых кислот, в которых может быть модифицировано гетероциклическое основание, сахар, фосфатный остов или и то и другое. Введение модификаций в структуру олигонуклеотидов в основном служит для улучшения их физико-химических и молекулярно-биологических свойств относительно природных аналогов. Их применяют чтобы преодолеть ограничения природных нуклеиновых кислот, повысить аффинность и селективность, повысить устойчивость олигонуклеотидов к нуклеазам, направленно изменять термодинамические свойства и обеспечить способность проникать через биологические мембраны.

Так, модификация сахара может увеличивать сродство к мишени или увеличивать время без существенной деградации (под действием ферментов). Среди таких модификаций можно особо выделить следующие:

Функционализация по 2' атому углерода, которая зачастую может быть совмещена с процедурой твердофазного синтеза, а также не вносит существенных искажений в дуплексные структуры. Наиболее исследованными коммерчески доступными среди них являются 2'OMe, 2'F и 2'O-метоксиметил (2'MOE) (Рисунок 2), которые несколько повышают термостабильность комплексов с

комплементарными ДНК и РНК и значительно увеличивают устойчивость к действию клеточных нуклеаз.

Мостиковые нуклеиновые кислоты (BNA) [43], среди которых особо можно выделить такой класс как замкнутые НК (LNA) (Рисунок 2) в котором атомы С4' и О2' соединены метиленовым линкером. Такие модификации значительно повышают термическую стабильность, незначительно увеличивают резистивность олигонуклеотидов к действию нуклеаз, и уменьшают конформационную подвижность сахара [41]. LNA являются коммерчески доступными, но их стоимость значительно превышает стоимость 2'-функционализированных олигонуклеотидов [44].

В свою очередь основная цель модификации гетероциклических оснований в НК заключается в повышении аффинности связывания с мишенью при сохранении правил комплементарности без изменения конформации двойной спирали. Наиболее часто встречающимися модификациями являются

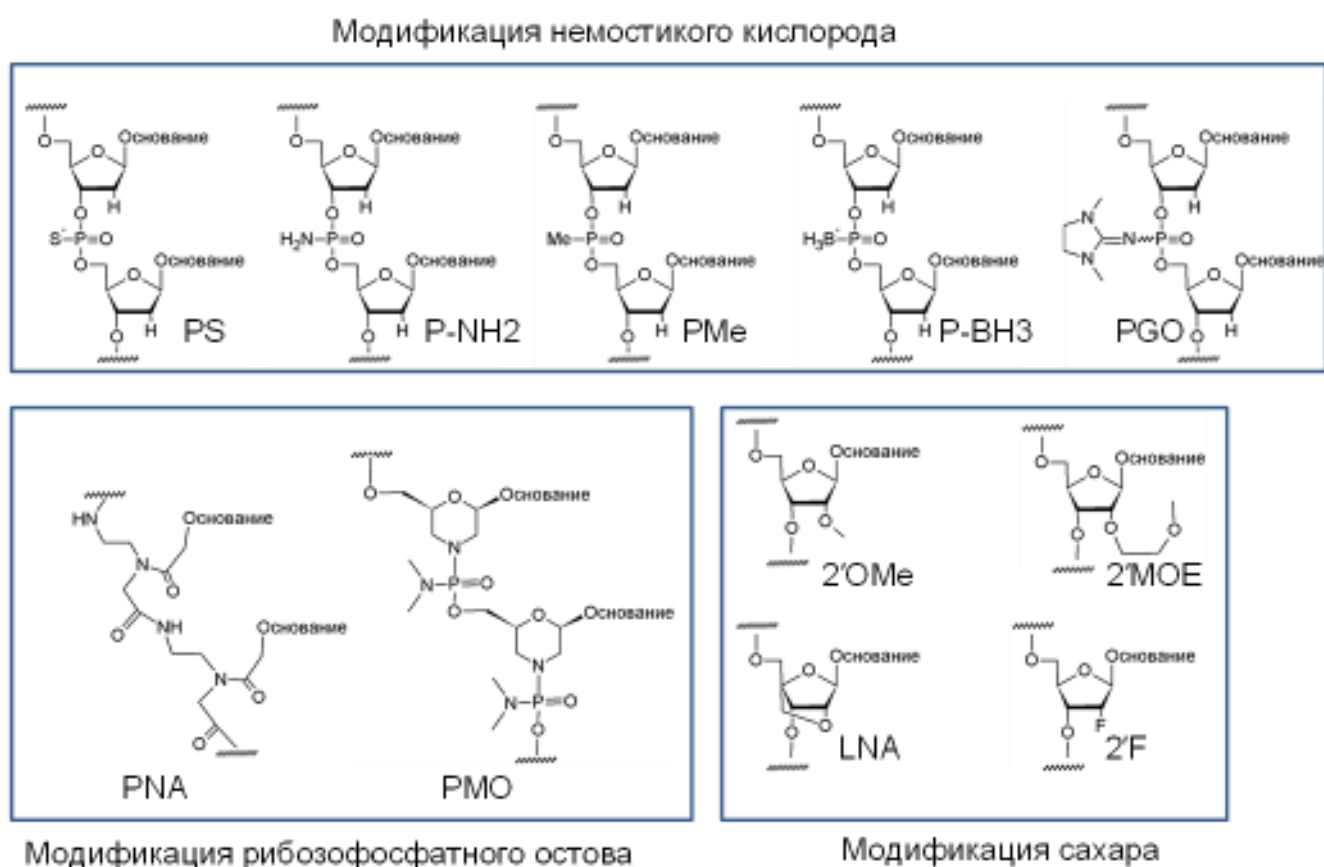


Рисунок 2. Производные и аналоги нуклеиновых кислот.

модификации по пятому положению в пиримидинах (Т, U и С), например, 5-метилцитозин (m5dC), которые используются для снижения иммунного ответа организма на введенные НК [45]. Так же, часто встречающейся модификацией является так называемые G-клевши(G-clamp) [46], которая значительно увеличивает термическую стабильность совершенного дуплекса и сильно снижают ее в случае нуклеотидного несоответствия.

В живом организме и *in vitro* нативных РНК и ДНК фосфодиэфирный остов подвергается деградации (то есть расщеплению фосфодиэфирной связи) под действием различных экзо- и эндонуклеаз. Так, например, при внутривенном введении 25 званого нативного олигонуклеотида в обезьяну полураспад наблюдался уже на 5ой минуте [47]. Для увеличения продолжительности времени полураспада вводятся различные модификации, увеличивающие это время на несколько порядков.

Для этого прибегают к различным химическим модификациям фосфодиэфирного остова. Самой первой такой модификацией является фосфотиоатная модификация (PS) (Рисунок 2). В этом производном один из немостиковых атомов кислорода фосфатного остатка замещён атомом серы [48]. Такая модификация значительно увеличивает нуклеазную резистивность, биодоступность, способствует проникновению в клетки олигонуклеотидов, а также может быть легко получена незначительной модификацией процедуры твердофазного фосфоамидитного синтеза. На основе фосфотиоатной химии зарегистрировано 5 лекарственных препаратов [40].

Наряду с фосфотиоатной модификацией, можно встретить большое число различных модифицированных аналогов с замещенным немостиковым кислородом [9]. Огромный вклад в этой области сделал Марвин Карутерс, благодаря которому были разработаны подходы для создания таких производных при помощи твердофазного синтеза. Наиболее распространёнными и достаточно хорошо исследованными являются такие модификации как: боранофосфанаты (P-BH3, Рисунок 2), которые могут применяться при бор-нейтрон захватной терапии рака [49], незаряженные алкилфосфанаты (например, метилфосфонат(PMe)) [50]

(Рисунок 2), для которых создана процедура ферментативной сборки полностью модифицированной цепи по матрице ДНК [51], амидфосфанаты (P-NH₂) [52] (Рисунок 2) и многие другие.

Отдельно стоит отметить производные НК, в котором модифицирован весь рибозофосфатный остов. Фофсорамидатные морфолиновые олигонуклеотиды (РМО) [6] и пептидил нуклеиновые кислоты (PNA) [5], которые не обладают зарядом (в отличие от отрицательно заряженных нативных НК) нашли очень широкое применение. Морфолиновые олигонуклеотиды успешно применяются для нокдауна генов, обладают повышенной резистивностью к действию нуклеаз, и на данный момент одобрено 3 терапевтических препарата на их основе [53]. На данный момент разработана процедура твердофазного синтеза такого типа производных [54].

ПНК имеет остов, содержащий пептидную связь (Рисунок 2). Их комплексы с комплементарными ДНК и РНК более термодинамически устойчивы по сравнению с нативными олигонуклеотидами той же последовательности. ПНК способны образовывать двух- и трехцепочечные структуры посредством формирования Уотсон-Криковских, Хугстиновских или обратных Хугстиновских пар [55].

В 2009 году в ИХБФМ СО РАН был разработан способ синтеза производных НК, сочетающих в себе свойства модификаций PNA и РМО [56]. В них мономеры соединяются при помощи пептидных связей, а сахар в них заменен на морфолин. Было показано, что эти глицин-морфолиновые производные (gM) образуют стабильные комплексы с нативными ДНК и РНК в определенных буферных условиях. Такие свойства делают их перспективными агентами для использования в терапевтических целях и биосенсорных технологиях. Но ввиду сложности синтеза протяжённых олигомеров изучение их физико-химических свойств затруднено.

В 2014 году в ИХБФМ СО РАН были разработаны новые незаряженные аналоги НК -фосфорилгуанидиновые (ФГ) производные олигонуклеотидов, несущие N-замещенные остатки гуанидина (Рисунок 2 и Рисунок 3) [57].

Модификация остова, затрагивает лишь фосфатный остаток и может быть введена в структуру олигонуклеотидов в рамках стандартного твердофазного амидофосфитного метода синтеза на стадии окисления присоединенного звена. Показана возможность введения в структуру синтезируемых фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов различных функциональных блоков в рамках процедуры автоматического синтеза, например, 2'-дезоксиде-, 2'-ОМе-нуклеотидов, LNA, фосфотиоатов и др.

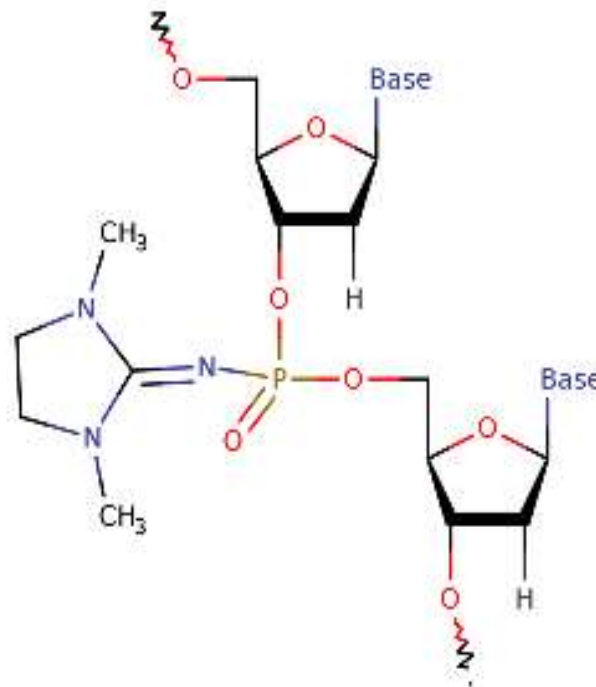


Рисунок 3. Структура динуклеотидной пары с введенной ФГ модификацией(1,3-диметилимидазолидин-2-имин [DMI]).

ФГО стабильны в кислых и щелочных условиях в диапазоне значений рН от 1 до 11, а также устойчивы к действию нуклеаз. Введение даже одиночных модификаций приводит к предотвращению деградации олигомеров в 10% телячьей эмбриональной сыворотки в течение нескольких дней [58]. Совокупность уже изученных свойств данных соединений показывает, что они станут при решении ряда задач достойными конкурентами PS-олигонуклеотидов, а в части – за счет сочетания уникальных свойств более эффективными агентами. Для успешного применения требуется проведение детального анализа их свойств, в частности физико-химических характеристик, таких как структура и стабильность формируемых ими комплексов. Такое исследование должно позволить построить модели достоверного прогностического расчета термостабильности комплексов ФГО с НК. Это даст возможность направлено конструировать ФГ-содержащие олигонуклеотидные производные для различных применений в области НК-

направленных агентов, для целей молекулярной биологии, диагностики и терапии заболеваний.

1.1.3. Термодинамические свойства НК и их производных

Для успешного применения нуклеиновых кислот и их производных необходима информация о способности и эффективности формирования ими комплексов с ДНК и РНК.

С точки зрения термодинамики, следующие факторы определяют, как наиболее значимые для термодинамической стабильности НК-дуплексов. Образование водородных связей между гетероциклическими основаниями, стэкинг взаимодействие между соседними основаниями одной цепи, конформационная энтропия олигонуклеотидов в двухцепочечном и одноцепочечном состояниях [33]. Взаимодействие с окружающим пространством (растворитель, ионы, со-растворители и др.) определяет, как тип формирующегося комплекса, так и его стабильность. Так, влияние на термическую стабильность оказывают особенности гидратации НК-цепей [59,60] и катионы, которые снижают расталкивание полианионных цепей НК, а их влияние может быть учтено в рамках теоретической модели конденсации противоионнов [61,62].

Количественной мерой, характеризующей эффективность образования комплексов НК является константа равновесия, которая определяется термодинамическими параметрами: изменением энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса. Эти характеристики могут быть либо определены экспериментально, либо рассчитаны с применением каких-либо моделей. Для определения величин термодинамических параметров комплексообразования олигонуклеотидов с ДНК, РНК или другими олигонуклеотидами могут быть использованы такие, наиболее распространенные экспериментальные методы, как метод термической денатурации с регистрацией оптического сигнала (например, оптического поглощения [63], эллиптичности поляризованного света [64] или флуоресценции [65,66]) или калориметрические методы (например,

изотермическая титрационная калориметрия (ИТС) [67,68] или дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) [67]).

Для нативных и ряда модифицированных НК разработаны теоретические модели, позволяющие проводить прогностический расчет их комплексообразующих свойств основанные только на знании первичной структуры - нуклеотидной последовательности. Наиболее распространенной и эффективной является модель ближайших соседей (nearest neighbor). Суть данной модели состоит в возможности описания свойств олигонуклеотидов и их комплексов путем представления величины физико-химического параметра в виде суммы вкладов отдельных динуклеотидов или динуклеотидных пар в составе нуклеотидной цепи и ряда поправок. В рамках такого подхода могут быть рассчитаны различные свойства нативных комплексов нуклеиновых кислот: величины термодинамических параметров комплексообразования [69,70], коэффициенты молярного поглощения олигонуклеотидов [71] и спектры кругового дихроизма (КД) олигонуклеотидов и их комплексов [72]. Применение модели ближайших соседей не ограничивается только полностью комплементарными комплексами нативных олигонуклеотидов. Она может быть использована для прогнозирования свойств комплексов, содержащих различные элементы вторичной структуры: внутренние и концевые нуклеотидные несоответствия (мисматчами), одноцепочечные нависания, выпетливания, шпильчатые структуры, одноцепочечные разрывы [73].

Модель ближайших соседей позволяет рассчитывать термодинамические параметры комплексообразования: ΔH° , ΔS° , $\Delta G^\circ(37)$ и $T_{пл}$. Было установлено, что для описания гибридизационных свойств комплементарных ДНК/ДНК и РНК/РНК комплексах требуется параметры для 10 динуклеотидных пар, в то время как для химерных комплексов ДНК/РНК необходимо учитывать 16 вкладов от динуклеотидных пар [74]. Это связано с асимметричностью последних ($5'-dGG-3'/5'-rCC-3' \neq 5'-rGG-3'/5'-dCC-3'$ и $5'-dGG-3'/5'-dCC-3' = 5'-dCC-3'/5'-dGG-3'$). Кроме того, необходимо учитывать вклад от фактора инициации образования дуплекса,

вклад от концевых пар, а также в случае самокомплементарного комплекса, энтропийную поправку, связанную с симметрией дуплекса.

При термодинамическом анализе образования НК дуплексов, в первом приближении, изменением теплоёмкостей одноцепочечного и двухцепочечного состояний зачастую пренебрегают ($\Delta C_p=0$) [70,75–77]. Тем не менее, в данном приближении, рассчитанные величины термодинамических параметров оказываются близки к экспериментально определяемым значениям. Такое предположение обычно не вносит существенных расхождений, во-первых, из-за так называемой энтальпийно-энтропийной компенсации, а также небольшой разницы между стандартной температурой (37 °С) и температурами плавления для дуплексов, образование которых подчиняется модели двух состояний (обычно лежат в диапазоне от 20 до 70 °С) [33].

Таблица 1. Значения инкрементов модели ближайших соседей для ДНК/ДНК дуплексов в 1М NaCl без соразтворителей [73], и в 100 мМ NaCl с 40% PEG200 [78].

Последовательность нуклеотидов	1М NaCl без соразтворителей			100 мМ NaCl с 40% PEG200		
	ΔH° , ккал/моль	ΔS° , кал/моль/К	ΔG°_{37} , ккал/моль	ΔH° , ккал/моль	ΔS° , кал/моль/К	ΔG°_{37} , ккал/моль
5'-AA-3'/3'-TT-5'	-7.9	-22.2	-1.01	-6.5	-19.2	-0.55
AT/TA	-7.2	-20.4	-0.87	-9.4	-29.4	-0.28
TA/AT	-7.2	-21.3	-0.59	-4.3	-13.3	-0.18
CA/GT	-8.5	-22.7	-1.46	-13.1	-38.8	-1.07
GT/CA	-8.4	-22.4	-1.45	-9.2	-26.8	-0.89
CT/GA	-7.8	-22.1	-0.95	-3.4	-7.9	-0.95
GA/CT	-8.2	-22.2	-1.31	-4.9	-13	-0.87
CG/GC	-10.6	-27.2	-2.16	-6.4	-16.1	-1.41
GC/CG	-9.8	-24.4	-2.23	-4.2	-9.3	-1.32
GG/CC	-8	-19.9	-1.83	-4	-8.9	-1.24
Концевая пара G/C	0.1	-2.8	0.97	-10.1	-35.1	0.79
Концевая пара A/T	2.3	4.1	1.03	-2.9	-12.7	1.04
Коррекция на симметрию	0	-1.4	0.43	0	-1.4	0.43

Таблица 2. Значения инкрементов модели ближайших соседей для РНК/РНК дуплексов в 1М NaCl без соразтворителей [77], и в 1МNaCl с 20% PEG200 [79].

Последовательность нуклеотидов	1М NaCl без соразтворителей			1М NaCl с 20% PEG200		
	ΔH° , ккал/моль	ΔS° , кал/моль/К	ΔG°_{37} , ккал/моль	ΔH° , ккал/моль	ΔS° , кал/моль/К	ΔG°_{37} , ккал/моль
5'-AA-3'/3'-UU-5'	-6.82	-19.0	-0.93	-6.3	-17.5	-0.88
AU/UA	-9.38	-26.7	-1.1	-6.7	-18.2	-1.13
UA/AU	-7.69	-20.5	-1.33	-12.7	-36.6	-1.36
CU/GA	-10.48	-27.1	-2.08	-8.8	-21.7	-2.03
CA/GU	-10.44	-26.9	-2.11	-13	-36	-1.91
GU/CA	-11.4	-29.5	-2.24	-12.8	-33.7	-2.36
GA/CU	-12.44	-32.5	-2.35	-14.5	-39.1	-2.36
CG/GC	-10.64	-26.7	-2.36	-9.0	-22.0	-2.19
GG/CC	-13.39	-32.7	-3.26	-14.6	-36.3	-3.32
GC/CG	-14.88	-36.9	-3.42	-18.9	-49.9	-3.44
Инициация	4.09	-1.5	3.61	5.3	2.2	4.63
Концевая А/У пара	3.72	10.5	0.45	2.8	7.3	0.55
Симметрия	0	-1.4	0.43	0	0	0.68

Таблица 3. Значения инкрементов модели ближайших соседей для РНК/ДНК дуплексов в 1М NaCl [76], и в 100мМ NaCl [69] без соразтворителей

Последовательность нуклеотидов	1МNaCl без соразтворителей			100мМNaCl без соразтворителей		
	ΔH° , ккал/моль	ΔS° , кал/моль/К	ΔG°_{37} , ккал/моль	ΔH° , ккал/моль	ΔS° , кал/моль/К	ΔG°_{37} , ккал/моль
5'-r(AA)-3'/3'- d(TT)-5'	-7.8	-21.9	-1	-7.8	-22.9	-0.7
rAC/dGT	-5.9	-12.3	-2.1	-10.1	-27.3	-1.5
rAG/dCT	-9.1	-23.5	-1.8	-9.4	-26.2	-1.3
rAU/dAT	-8.3	-23.9	-0.9	-5.8	-17.5	-0.4
rCA/dTG	-9	-26.1	-0.9	-9.8	-27.4	-1.2
rCC/dGG	-9.3	-23.2	-2.1	-9.5	-24.8	-1.7
rCG/dCG	-16.3	-47.1	-1.7	-9	-24.3	-1.4
rCU/dAG	-7	-19.7	-0.9	-6.1	-17.9	-0.4
rGA/dTC	-5.5	-13.5	-1.3	-8.6	-22.7	-1.5
rGC/dGC	-8	-17.1	-2.7	-10.6	-27.7	-2
rGG/dCC	-12.8	-31.9	-2.9	-13.3	-35.7	-2.3
rGU/dAC	-7.8	-21.6	-1.1	-9.3	-25.5	-1.4
rUA/dTA	-7.8	-23.2	-0.6	-6.6	-19.7	-0.5
rUC/dGA	-8.6	-22.9	-1.5	-6.5	-16.3	-1.4
rUG/dCA	-10.4	-28.4	-1.6	-8.9	-23.3	-1.6
rUU/dAA	-11.5	-36.4	-0.2	-7.4	-24.3	0.2
Концевые rG-dC/rC-dGb*	1.9	-3.9	3.1	0	-4.9	2
Концевые rA-dT/rU-dAc**				0	-7	2.6

* Учет при наличии хотя бы одной такой пары

** Учет при наличии на обоих концах

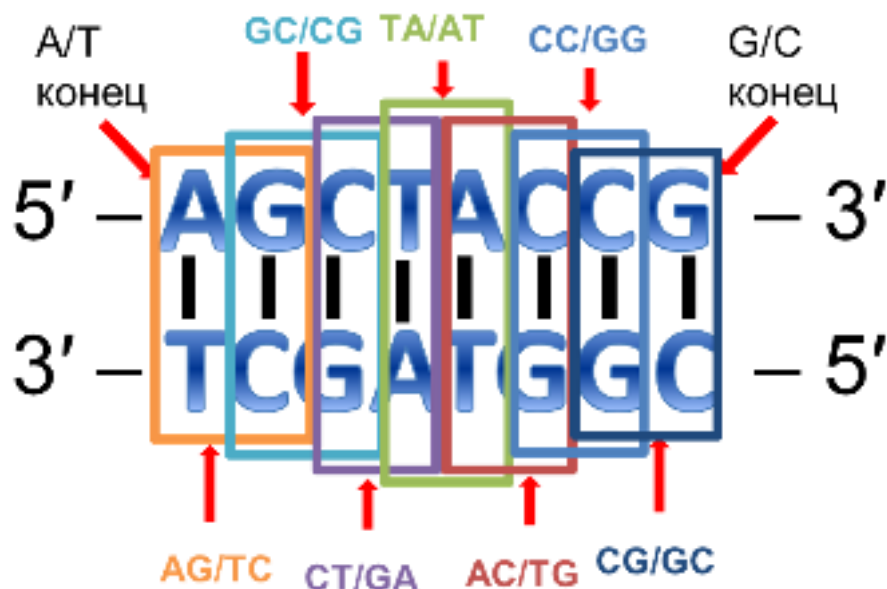


Рисунок 4. Схема для расчёта величин термодинамических параметров комплексообразования для ДНК дуплекса с использованием модели ближайших соседей.

Показано, что модель ближайших соседей быть применена для достоверного расчета энергий формирования дуплексных структур может к нативным ДНК/ДНК, РНК/РНК и РНК/ДНК комплексам в стандартных условиях (1М NaCl, pH=7.2) и в условиях с пониженной ионной силой раствора, а также в присутствии соразтворителей (Таблицы 1, 2 и 3).

Для примера, проведем расчет энтальпии комплексообразования для ДНК дуплекса 5'-d(AGCTACCG)-3'/5'-d(CGGTAGCT)-3' в 1 М NaCl (Рисунок 4). В данном дуплексе представлены следующие динуклеотидные пары: 5'-AG-3'/3'-TC-5' - 2 раза, 5'-AC-3'/3'-TG-5' - 1 раз, 5'-TA-3'/3'-AT-5' - 1 раз, 5'-GC-3'/3'-CG-5' - 1 раз, 5'-CG-3'/3'-GC-5' - 1 раз, 5'-GG-3'/3'-CC-5' - 1 раз. Кроме того, присутствуют концевые А/Т и G/С пары. Данный дуплекс не является симметричным, поэтому энтропийную поправку не включаем в расчет. Таким образом, энтальпии комплексообразования будет рассчитана как сумма описанных выше вкладов (Таблица 1):

$$\begin{aligned}
 \Delta H^{\circ}_{\text{суммарный}} &= 2 \cdot \Delta H^{\circ}_{\text{AG/TC}} + 1 \cdot \Delta H^{\circ}_{\text{AC/TG}} + 1 \cdot \Delta H^{\circ}_{\text{TA/AT}} + 1 \cdot \Delta H^{\circ}_{\text{GC/CG}} + 1 \cdot \Delta H^{\circ}_{\text{CG/GC}} + 1 \cdot \Delta H^{\circ}_{\text{GG/CC}} \\
 &+ \Delta H^{\circ}_{\text{A/T конец}} + \Delta H^{\circ}_{\text{G/C конец}} = \\
 &= 2(-7.8) + 1(-8.4) + 1(-7.2) + 1(-9.8) + 1(-10.6) + 1(-8.0) + 2.3 + 0.1 = -57.2 \text{ ккал/моль}
 \end{aligned}$$

Аналогично могут быть рассчитаны значения энтропии и свободной энергии Гиббса комплексообразования, которые составляют -157.9 ккал/моль/К и -8.3 ккал/моль. Экспериментально определенные величины для данного дуплекса в стандартных условиях составляют -56.6 ккал/моль, -151 ккал/моль/К и -8.7 ккал/моль. (см. Таблица 11).

Недавно, на основе модели ближайших соседей, была продемонстрирована возможность предсказания стабильности дуплексов, содержащих неприродные гетероциклические основания в ДНК, так называемых "Хачимоджи" нуклеиновых кислот [80]. В случае модифицированного рибозофосфатного остова достоверный расчет термодинамических параметров формирования комплексов с использованием данного приближения был показан только для LNA [30,81] и ненуклеотидных вставок на основе диэтиленгликолей [82]. Для оценки термостабильности РНА/ДНК комплексов используют эмпирическую зависимость для пересчета температуры плавления, используя соответствующую величину для ДНК/ДНК комплексов [83], в то время как модель ближайших соседей не дает высокой достоверности прогностического расчёта [29].

Величины термодинамических инкрементов модели ближайших соседей, связанные с формированием структурных элементов комплексов, получают путем статистического анализа большого числа экспериментальных данных о термодинамических свойствах НК-комплексов различной нуклеотидной композиции. Для этого необходимо синтезировать представительный набор олигонуклеотидов и провести их детальной физико-химический анализ. Такой подход затруднен в применении к новым производным и аналогам нуклеиновых кислот, химический синтез которых, типично, на первых этапах после их разработки, еще не оптимизирован и не автоматизирован.

Альтернативой этому могут выступать методы молекулярного моделирования, которые потенциально могут позволить проводить расчет структуры и гибридизационных свойств аналогов НК на этапе, предшествующем их химическому синтезу.

1.2. Молекулярно-динамическое моделирование биомолекулярных систем

Молекулярное моделирование биологических полимерных систем является мощным теоретическим инструментом исследования. Наряду с квантово-механическими методами, которые позволяют получать результаты только для систем небольшого размера (обычно от единиц до сотен атомов), методы молекулярной механики (ММ) и молекулярной динамики (МД) являются основными методами моделирования биомолекулярных систем. Методы ММ и МД рассматривают молекулы в виде системы атомов, взаимодействующих в рамках классической механики и электростатики. Их параметры взаимодействия называют силовыми полями. Силовые поля используются при вычислении энергии системы взаимодействующих атомов и обычно учитывают только парные аддитивные взаимодействия.

Существует большое количество программных пакетов для МД моделирования биологических систем. Наиболее распространенными среди них являются GROMACS, CHARMM, NAMD и AMBER [84,85]. Для МД анализа нуклеиновых кислот наиболее популярным является пакет программ AMBER с семейством силовых полей специально оптимизированных для комплексов нуклеиновых кислот [86,87].

1.2.1. Силовые поля в методе молекулярной динамики

Силовое поле — это набор функций и их параметров для расчета отдельных энергетических вкладов в потенциальную энергию атомной системы. Оно включает в себя информацию о ковалентных и нековалентных взаимодействиях. Вклады от ковалентных взаимодействий включают в себя энергии связей, углов, двугранных углов. В свою очередь вклад от нековалентных взаимодействий содержат электростатические (Кулоновское взаимодействие) и Ван-дер-Вальсовы взаимодействия. Последние обычно описывается при помощи потенциала Леонард-Джонса (потенциал 6-12). Таким образом, потенциальная энергия

системы может быть описана суммой всех этих вкладов для всех атомов в моделируемой системе (уравнение (1)):

$$E = \sum_{i < j} \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}} + \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right) + \sum_{\text{связи}} K_b (x - x_0)^2 + \sum_{\text{углы}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{дигедральные углы}} V_n (1 + \cos(n\varphi - \gamma)) \quad (1)$$

В случае учета электростатического и Ван-дер-Вальсового вклада q_i и q_j это частичные заряды на атомах, ϵ - это диэлектрическая проницаемость среды, $R_{0,ij}$ - это расстояние, при котором наблюдается минимум энергии Ван-дер-Вальсового взаимодействия, ϵ_{ij} - это глубина этого минимума, r_{ij} - расстояние между атомами i и j . При учете вкладов энергии связей и углов параметры x_0 и θ_0 - это равновесные значения длины связи и угла, а K_b и K_θ - это силовые константы в гармоническом приближении. Учет вклада торсионных углов описывается также в гармоническом приближении при этом V_n , n и γ - это амплитуда, номер гармоники и фаза.

В каждом силовом поле задаются силовые константы, равновесные положения, а также частичные заряды для атомов молекул. Параметризация силовых полей обычно проводится при помощи квантово-механических расчетов и известных равновесных значений, полученных при помощи экспериментальных методов (ЯМР или рентгеноструктурного анализа). Силовые поля должны воспроизводить экспериментально наблюдаемые свойства систем, для которых они были построены.

На данный момент не существует универсального силового поля для всех биомолекул, а для каждого класса макромолекул существуют свои силовые поля, как для белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов, а также для малых органических молекул. В случае нуклеиновых кислот выделяют два семейства силовых полей AMBER и CHARMM, которые достаточно хорошо воспроизводят их структурные свойства [86,88,89]. В то же время, связь между потенциальной энергией, определяемой в силовых полях и реально существующими энергиями остается под вопросом. Таким образом, проверка методов молекулярного

моделирования, включающих параметризацию силовых полей в применении к расчету энергии взаимодействия биополимеров, может быть осуществлена с использованием известных баз данных термодинамических параметров, например, описывающих взаимодействие в дуплексах НК. Некоторой аналогией этого может служить параметризация при построении моделей (например, уровней теорий) в теории функционала плотности.

1.2.2. Изучение гибридизационных свойств биополимеров при помощи метода молекулярной динамики

В последнее десятилетие наблюдается большой прогресс в разработке различных подходов для расчёта термодинамических параметров межмолекулярных взаимодействий [15]. Среди них наиболее распространёнными являются методы MMPBSA (Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area calculation) [90] и MMGBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area calculation) [91,92], методы анализа потенциала средней силы (PMF), например, метод анализа взвешенных диаграмм (WHAM) [93] или метод анализа вариационного профиля свободной энергии (ν FEP) [94]. Разработан ряд подходов, которые позволяют эффективно покрывать рассматриваемое фазовое пространство для более эффективного расчёта структуры и свободной энергии как самих молекул, так и изменения энергии при взаимодействии нескольких молекул. Среди них можно выделить методы алхимических превращений [95], например, методы возмущения свободной энергии (FEP) [96] и термодинамического интегрирования (TI) [97]. К их недостаткам можно отнести необходимость больших затрат вычислительных мощностей и времени расчета, которое необходимо затратить для получения достоверных результатов моделирования.

Для оценки энергии взаимодействия молекул простыми и вычислительно эффективными являются популярные техники MMGBSA и MMPBSA. В данных методах для каждой конформации молекул рассчитывают энергии комплекса и его составных частей, полученные при МД моделировании, а растворитель (который был представлен в моделировании в явном или неявном виде) заменяется

окружением с заданной диэлектрической проницаемостью. Энергия связывания (ΔG_{bind}) в данных подходах включает в себя изменение суммарной молекулярно-механической энергии (ΔE_{MM}), энергии сольватации (ΔG_{solv}) и вклада конформационной энтропии ($T\Delta S$) [98]:

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (2)$$

В свою очередь ΔE_{MM} содержит вклады внутренней энергии (ΔE_{int}), учитывающей деформацию связей, углов и двугранных углов, электростатического вклада (ΔE_{elec}) и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (ΔE_{vdW}):

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{int} + \Delta E_{elec} + \Delta E_{vdW} \quad (3)$$

Сольватационный вклад является суммой вкладов от полярного ($\Delta G_{PB/GB}$) и неполярного (ΔG_{SA}) взаимодействия исследуемой молекулы с растворителем:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{PB/GB} + \Delta G_{SA} \quad (4)$$

Первая является электростатической энергией, которая может быть рассчитана либо при прямом решении уравнения Пуассона-Больцмана (PB, метод MMPBSA), либо при помощи обобщенного метода Борна (GB, метод MMGBSA). Вклад неполярных взаимодействий обычно представляют в виде линейной функции от площади молекулы, доступной для взаимодействия с растворителем (SASA–площадь поверхности доступная растворителю) [91]:

$$\Delta G_{SA} = \gamma \cdot SASA + b \quad (5)$$

Для расчёта свободной энергии Гиббса, энтропийный вклад, учитывающий конформационную составляющую, обычно рассчитывают с помощью методов анализа нормальных мод колебаний (NMA) [91] или при помощи квазигармонического приближения (QHarm) [99]. Первый метод имеет высокую вычислительную сложность и позволяет проанализировать энтропийный вклад только для небольшого числа снимков МД траектории (до нескольких тысяч), в то время как второй – работает существенно быстрее.

Такие методы оценки энергии межмолекулярных взаимодействий широко используют при исследовании взаимодействий биополимеров с малыми молекулами, например, в молекулярно-биологических исследованиях [100] или при разработке новых лекарственных препаратов [101]. Помимо этого, продемонстрировано успешное применение данных подходов для расчета энергии формирования комплексов как нативных [102,103], так и химически модифицированных олигонуклеотидов с ДНК и РНК [104,105]. Однако, в последнем случае исследования не носят систематического характера и являются иллюстрацией возможностей методов.

1.3. Расчет концентрации олигонуклеотидов

Для экспериментальной характеристики олигомеров нуклеиновых кислот и их производных и дальнейшей экспериментальной работы с ними необходимо достаточно точно определять их концентрацию. Одним из подходов для этого является общий фосфатный анализ, который базируется на определении концентрации фосфатных групп после полного разрушения олигомера до ортофосфатов под действием кислой среды, высокой температуры и последующего колориметрического анализа формирования фосфолибдатного комплекса [106]. Данный метод определения применим как к нативным, так и к некоторым модифицированным олигонуклеотидам, в которых сохраняется фосфатный остов (например, к фосфотиоатам или метилфосфонатам [106]).

Другим способом является гидролиз межнуклеотидных фосфодиэфирных связей олигомеров под действием химических реагентов или ферментов до мономеров [107], и дальнейший спектрофотометрический анализ мономерных звеньев в УФ-области [108]. Третий подход предполагает запись спектров оптического поглощения при высокой температуре (~ 80-95 °C), при которой предполагается полное разрушение вторичных структур и стэкинг-взаимодействия между соседними нуклеотидами. В этом случае, коэффициент молярной экстинкции рассчитывают, как сумму вкладов от отдельных нуклеотидов при данной температуре [106]. Четвертый метод, который наиболее часто используют, основан на приближении модели ближайших соседей и учитывает стэкинг-взаимодействие между соседними нуклеотидами, что позволяет рассчитать коэффициент молярного поглощения как сумму вкладов от динуклеотидных пар и поправки, связанной с концевыми нуклеотидами [71,72]. Он дает достоверные результаты только для олигомеров, имеющих стандартные, немодифицированные нуклеотиды, которые не образуют вторичные структуры, например, внутримолекулярные шпильчатые или межмолекулярные самокомплементарные комплексы.

Коэффициент молярной экстинкции показывает то, насколько химический компонент поглощает свет на определенной длине волны. Поглощение образца зависит от длины оптического пути и от концентрации образца в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера следующим образом:

$$A = \varepsilon Cl \quad (6)$$

Коэффициент молярной экстинкции для олигонуклеотидов зависит от нуклеотидной последовательности и буферных условий, в которые помещен исследуемый образец. Обычно для олигонуклеотидов используют коэффициент молярной экстинкции, определенный или рассчитанный на длине волны 260 нм. Расчётные значения коэффициентов экстинкции зачастую отличаются от экспериментально определенных (при помощи метода количественного ЯМР или при помощи стандартного фосфатного метода) на 10-20% [106,107,109]. Это связано со структурированием цепей. Коэффициенты молярной экстинкции для мономеров, вклады от динуклеотидных пар и концевых поправок для олигодезоксирибонуклеотидов при нормальных условиях представлены в таблице 4.

Таблица 4. Набор коэффициентов экстинкции для мономеров, динуклеотидных пар и концевых поправок для олигодезоксирибонуклеотидов на длине волны 260 нм при нормальных условиях [71].

5'--3'	$\varepsilon_{260}, 10^3 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	5'--3'	$\varepsilon_{260}, 10^3 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$
A	15.4	CA	9.8
C	7.2	CC	7.2
G	11.5	CG	8.55
T	8.7	CT	7.15
EA,AE	7.7	GA	11.75
EC,CE	3.7	GC	8.15
EG,GE	5.75	GG	10.1
ET,TE	4.35	GT	9.9
AA	12	TA	11.35
AC	9.8	TC	8.15
AG	11.55	TG	8.9
AT	10.75	TT	8.1

Коэффициент молярной экстинкции для одноцепочечного олигодезоксирибонуклеотида может быть рассчитан по следующей формуле:

$$\varepsilon_{260}(\text{полное}) = \sum_{i,j=A,C,G,T,E} N_{ij} \cdot \varepsilon^{ij} \quad (7)$$

Так, например, при комнатной температуре коэффициент экстинкции для олигонуклеотида d(AGCTACCG) в приближении модели ближайших соседей будет рассчитан следующим образом:

$$\begin{aligned} \varepsilon_{260}(\text{AGCTACCG}) &= \varepsilon^{\text{EA}} + \varepsilon^{\text{AG}} + \varepsilon^{\text{GC}} + \varepsilon^{\text{CT}} + \varepsilon^{\text{TA}} + \varepsilon^{\text{AC}} + \varepsilon^{\text{CC}} + \varepsilon^{\text{CG}} + \varepsilon^{\text{GE}} = \\ &= (7.7 + 11.55 + 8.15 + 7.15 + 11.35 + 9.8 + 7.2 + 8.55 + 5.75) \cdot 10^3 = 77.2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

При высокой температуре (более 80 °C) коэффициент экстинкции может быть рассчитан в приближении невзаимодействующих мономерных звеньев:

$$\begin{aligned} \varepsilon_{260}(\text{AGCTACCG}) &= (\varepsilon^{\text{A}} + \varepsilon^{\text{G}} + \varepsilon^{\text{C}} + \varepsilon^{\text{T}} + \varepsilon^{\text{A}} + \varepsilon^{\text{C}} + \varepsilon^{\text{C}} + \varepsilon^{\text{G}}) \cdot = \\ &= (15.4 + 11.5 + 7.2 + 8.7 + 15.4 + 7.2 + 7.2 + 11.5) \cdot 10^3 = 84.1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

На данный момент не создано более точных моделей для расчёта коэффициентов экстинкции для одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов, ввиду сложностей учета выхода гетероциклических оснований из одноцепочечного стэкинга в олигомерной цепи [110–112], что вносит определяющий вклад в погрешность при определении концентрации таким путем, которая может достигать 20% [106,107].

Определение концентрации при помощи оптических методов для производных нуклеиновых кислот обычно осуществляют теми же методами, что и для нативных цепей. Так, общепринятым для фосфотиоатов [113], боранофосфатов [114] и метилфосфанатов [50] является использование коэффициентов экстинкции для ДНК из модели ближайших соседей и измерения оптической плотности образцов олигомеров при 25 °C. Для LNA, из-за большей жесткости цепи, часто используют измерение оптического поглощения при высокой температуре [115] и/или модели ближайших соседей с параметрами для ДНК [30,31]. В случае PNA используют либо коэффициенты экстинкции, полученные в модели ближайших соседей для ДНК [116], либо, как рекомендует производитель, используют поглощение на 80 градусах, а экстинкцию определяют

как сумму вкладов мономерных ДНК-звеньев для олигомеров идентичной последовательности.

1.4. Метод термической денатурации с оптической регистрацией сигнала

Процесс образования двойной спирали парой комплементарных олигонуклеотидов можно описать моделью «застежка – молния» [67]. Первым шагом этого процесса является образование единственной пары комплементарных нуклеотидов, связанных водородными связями. Образование такого комплекса энергетически невыгодно и, следовательно, структура нестабильна. Образование второй пары протекает легче. Третья пара формирует зародыш, который так же еще не является стабильным. После этого происходит внутримолекулярное быстрое нарастание связанных пар, сопровождающееся уменьшением свободной энергии Гиббса. Процесс похож на застегивание замка молнии. Данный процесс является обратимым для коротких (до ~50 – 100 п.о.) последовательностей НК.

Формирование комплекса олигонуклеотидов описывают моделью двух состояний (1), в предположении, что в системе присутствует только комплекс и его свободные компоненты, а доля промежуточных форм пренебрежимо мала. В этом случае процесс формирования полноразмерного комплекса описывается константой равновесия K :



Следовательно, процесс диссоциации олигонуклеотидов, в приближении равности нулю изменения теплоемкости в двух - и одноцепочечном состоянии ($\Delta C_p=0$) характеризуется термодинамическими параметрами комплексообразования:

$$K = e^{-\frac{\Delta G^0}{RT}}, \quad (9)$$

$$\Delta G^0(T) = \Delta H^0 - T\Delta S^0, \quad (10)$$

Одним из наиболее распространенных методов для определения термодинамических параметров комплексообразования НК является метод

термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. По изменению оптического поглощения при увеличении температуры на определенных длинах волн (260 или 268 нм для дуплексов) можно зарегистрировать переход из двуцепочечного состояния в одноцепочечное [63]. Это возможно в результате существования гипохромного эффекта - большего оптического поглощения одноцепочечного состояния по сравнению с двуцепочечным. Для описания экспериментальных кривых термической денатурации требуются модельные предположения о самом процессе образования комплекса, так и о его оптическом поглощении.

В случае если рассматриваются раствор двух комплементарных цепей с одинаковыми концентрациями ($[A]_0=[B]_0$), то константа равновесия может быть выражена через долю двуцепочечного состояния ($\alpha = [AB]/(2[A]_0)$).

$$K = \frac{2\alpha}{(1-\alpha)^2 C_T}, \quad (11)$$

где $C_T = [A]_0 + [B]_0 = 2[A]_0$ – суммарная концентрация олигонуклеотидов в растворе.

Термодинамические параметры можно определить из кривых изменения оптического поглощения от температуры. В этом случае предполагают линейную зависимость оптического поглощения от температуры для одно- (12) -(13) и двуцепочечного (14) состояний:

$$D_A = a_A T + b_A, \quad (12)$$

$$D_B = a_B T + b_B, \quad (13)$$

$$D_{AB} = a_{AB} T + b_{AB}, \quad (14)$$

где D_i – поглощение при данной температуре, a_i – коэффициент при первой степени зависимости оптического поглощения от температуры, b_i – константа, $i = A, B, AB$. Тогда зависимость оптического поглощения от доли

олигонуклеотидов, находящихся в комплексе (α), может быть выражена в следующем виде [63]:

$$D = \frac{[AB]}{C_T} D_{AB} + \frac{[A]}{C_T} D_A + \frac{[B]}{C_T} D_B = \alpha D_{AB} + (1 - \alpha)(D_A + D_B) = \quad (15)$$

$$\alpha D_{AB} + (1 - \alpha) D_{A+B},$$

$$\text{где } D_{A+B} = a_{A+B} T + b_{A+B}, \quad (16)$$

a_{A+B} и b_{A+B} - коэффициенты суммарного поглощения олигонуклеотидов в одноцепочечном состоянии.

Варьируя величины термодинамических параметров и оптических характеристик (a_{AB} , b_{AB} , a_{A+B} , b_{A+B} , ΔH° , ΔS°) добиваются максимального совпадения экспериментальной и теоретической кривых термической денатурации. Таким образом определяют величины термодинамических параметров (ΔH° , ΔS° , ΔG°_{37}) формирования комплексов.

Наглядным параметром для описания перехода между двумя состояниями является температура плавления ($T_{пл}$) - такая температура, при которой доля двуцепочечного состояния (α) равна 0.5. Если комплекс олигонуклеотидов формируется в соответствии с моделью двух состояний (уравнение (8)), то $T_{пл}$ может быть выражена через термодинамические параметры следующим образом:

$$\frac{1}{T_{пл}} = \frac{\Delta S^\circ}{\Delta H^\circ} + \frac{R}{\Delta H^\circ} \ln\left(\frac{C_T}{4}\right) \quad (17)$$

Дополнительным подходом для определения термодинамических параметров комплексообразования является концентрационный метод, в котором, используя зависимость обратной температуры плавления от логарифма концентрации олигонуклеотидов (уравнение (17)) можно определить по наклону линейной зависимости ($\frac{R}{\Delta H^\circ}$) величину энтальпии комплексообразования, а по точке пересечения этой зависимости с 0 ($\frac{\Delta S^\circ}{\Delta H^\circ}$) можно определить энтропию.

Таким образом, имеющиеся данные о физико-химических свойствах глицин-морфолиновых и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов не систематичны и недостаточно полны. Детальное изучение этих аналогов и производных НК и их комплексов экспериментальными методами и методами компьютерного моделирования, построение на основании этого моделей прогностического расчета их свойств, в том числе гибридизационных позволит осуществлять рациональный дизайн конструкций на их основе для решения задач фундаментальных исследований, и эффективно их использовать для нужд генодиагностики, ПЦР анализа и при создании ген-направленных соединений.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды были синтезированы твердофазным автоматическим фосфитамидным методом с использованием автоматического ДНК/РНК-синтезатора ASM-800 (Biosset, Россия) и коммерчески доступных синтонов и твердофазного носителя (Glen Research, США) и выделены по стандартной процедуре [116] в случае ДНК Бушуевой Т.Ю ЛБМХ ИХБФМ СО РАН, а в случае РНК Крашенининой О.А. ЛХРНК ИХБФМ СО РАН. Все глицин-морфолиновые олигомеры были предоставлены Абрамовой Т.В. ЛОРС ИХБФМ СО РАН. Все фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды, полностью модифицированные остатком тетраалкил-замещенного гуанидина – 1,3-диметилимидазолидин-2-имина (1,3-dimethylimidazolidine-2-imine или DMI) были любезно предоставлены ООО “НооГен” [15,57]. ФГО представляли из себя рацематную смесь для каждого модифицированного фосфатного остатка (всего 2^n стереоизомеров для каждого олигонуклеотида содержащи его n модифицированных фосфатных остатков).

Гомогенность использованных нативных олигонуклеотидов была более 98% по данным анализа, проведенного методом гель-электрофореза в денатурирующем 20% полиакриламидном геле (акриламид/бисакриламид 29:1, 8 М мочевины) с прокрашиванием красителем Stains-all (Sigma, США). Молекулярную массу модифицированных олигонуклеотидов подтверждали методом MALDI TOF масс-спектрометрии (ЦМСА ИХБФМ СО РАН).

2.2. Экспериментальные методы

2.2.1. Определение концентрации

Концентрацию олигонуклеотидов определяли при помощи спектрофотометра UV-2100 (Shimadzu, Япония) либо на Cary 300 Bio (Varian, Австралия) при комнатной температуре, используя величины молярных коэффициентов поглощения (ϵ_{260}) моно- и динуклеотидов [71] в случае нативных систем, и используя коэффициенты поглощения (ϵ_{260}) для мононуклеотидов при 90 °С для модифицированных.

2.2.2. Метод термической денатурации с оптической регистрацией сигнала

Эксперименты по термической денатурации с оптической регистрацией сигнала были выполнены в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 0.2 см на спектрофотометре Cary 300-Bio (Varian, Австралия) оборудованного шестисекционным кюветодержателем с пельтье элементом для изменения температуры. Измерения проводили на длинах волн 260, 270 и 330 нм (базовая линия), используя ширину щели 1 нм, время усреднения сигнала 1 с, скорость изменения температуры 0.5 °С/мин в диапазоне температур от 5 до 95 °С [117].

Значения термодинамических параметров получали как из кривых нагрева, так и охлаждения на длинах волн 260 и 270 нм путем подгонки теоретических кривых к экспериментальным в рамках приближения модели двух состояний. Анализ проводили с помощью программы «Simplex 3.2» (А. В. Иванов, ИЛФ СО РАН), учитывая зависимость плотности воды от температуры [119]. Все образцы для термической денатурации были растворены в деионизованной воде MilliQ или в 10 мМ какодилатном буфере $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$ (pH7.2) с различным содержанием NaCl и MgCl_2 .

2.2.3. Спектроскопия кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма (КД) были записаны на спектрополяриметре Jasco J600 (Jasco, Япония) в 1 см термостатируемой кварцевой кювете, соединённой с водяным термостатом Huber CC3 (Huber, Германия). Запись КД-спектров проводили в диапазоне длин волн от 200 до 330 нм с разрешением 1 нм, шириной щели 1 нм и временем интегрирования 1 с. Данные усредняли по 10 повторным измерениям спектра. Исследования проводили в температурном диапазоне от 5 до 90 °С.

2.2.4. Метод остановленной струи

Исследование кинетических характеристик формирования бимолекулярных комплексов проводили методом остановленной струи (Stopped-flow) с оптической регистрацией сигнала при концентрации каждого из олигонуклеотидных компонентов $2 \cdot 10^{-6}$ М, на установке по изучению быстрых процессов (SX.18MV, Applied Photophysics, Великобритания), оборудованной ксеноново-аргоновой лампой с мощностью 150 Вт. Температура образца поддерживалась при помощи прокачки через шприцевой отсек теплоносителя, который термостатировался циркуляционным термостатом 2219 Multitemp II (LKB, Швеция).

После быстрого смешения равных объемов олигонуклеотидов (мертвое время ~ 2 мкс), регистрировали зависимость оптического поглощения на длине волны 270 нм от времени, для каждого эксперимента было получено не менее 4000 значений оптического поглощения. Данные по трем экспериментам в одинаковых условиях усреднялись и подвергались обработке с использованием кинетических схем [118].

2.3. Компьютерные расчеты

2.3.1. Библиотеки для глицин-морфолиновых пентааденилатов

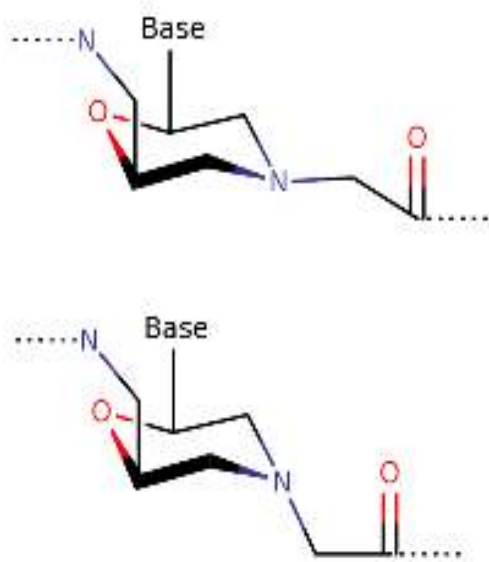


Рисунок 5. Структуры аксиального и экваториального конформеров глицин-морфолина.

Глицин-морфолиновые (gM) мономеры аденина (gMA) были построены в программе xleap (AmberTools 14). Геометрии всех возможных мономеров были оптимизованы при помощи теории функционала плотности с уровнем теории B3LYP/6-311G** в пакете Gaussian 09 [119]. Два возможных конформера N-замещенного морфолина (экваториальный и аксиальный) были найдены для N-концевого и внутреннего gMA мономера (Рисунок 5).

Морфолиновое кольцо представлено в конформации кресло [120], все остальные изомеры и конформеры в растворе не представлены, что определяется процедурой химического синтеза таких производных.

Частичные заряды для N-концевых, внутренних и для C-концевого gMA мономеров были рассчитаны по процедуре RESP [122]. Всего было создано пять файлов библиотек для МД моделирования. Параметры силового поля были взяты из силового поля parmBSC1 [121] для немодифицированной части и GAFF [122] для недостающих параметров.

2.3.2. Создание МД библиотек для фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов

Существует два возможных стереоизомера (Rp- и Sp-) для внутренних и 3'-концевых нуклеотидов для DM1-модифицированной ДНК (16 различных нуклеотидов). Геометрию всех возможных мономеров оптимизовали при помощи

теории функционала плотности с уровнем теории B3LYP/6-311G** в пакете Gaussian'09 [119]. Частичные заряды мономеров были рассчитаны по процедуре RESP [122]. Всего было создано 16 файлов библиотек для МД моделирования ФГО: 8 для внутренних и по 4 для 3' и 5' концевых нуклеотидов. Параметры силового поля были взяты из силового поля parmBSC1 [121] для немодифицированной части и GAFF [122] для недостающих параметров ФГ группы и фосфамидной связи.

2.3.3. Подготовка структур для МД моделирования

Стартовые структуры РНК/ДНК и РНК/РНК дуплексов и ДНК(gM)/РНК тандемного комплекса имели А- форму двойной спирали, а ДНК/ДНК дуплексы и ДНК(gM)/ДНК тандемный комплекс- В-форму [123]. Структуры дуплексов были созданы в программе NAB пакета программ AmberTools14 [124] и при помощи программы UCSF Chimera [125].

Стартовые структуры ФГО/ДНК и ФГО/ФГО дуплексов были получены из нативных ДНК/ДНК путем замещения в каждом динуклеотидном шаге немостикового кислорода на DM1 остатки, причем стереоизомеры Rp- и Sp- чередовались, начиная с Rp-диастереомера для первого межнуклеозидного фосфатного остатка с 5'-конца. Одноцепочечные олигонуклеотиды были получены из дуплексов путем удаления одной из цепей.

2.3.4. Процедура МД моделирования

Молекулярно-динамическое моделирование проведено в пакете программ AMBER16 с использованием паралельных вычислений на центральных процессорах и видеокартах. Для ДНК использовали силовое поле ff99bsc0 [128] (в случае моделирования РНК/ДНК дуплексов) и ff99bsc1 [121] во всех остальных случаях, для РНК - ff99bsc0+chiOL3 [129]. МД моделирование проводили в явной водной оболочке (модель TIP3P) при температуре 300 К. Электростатические

взаимодействия описывали методом сети частиц Эвальда с решеткой равной 1 \AA . Давление в системе было равно 1 бар (баростат Берендсена), температура в системе поддерживалась при помощи масштабирования скоростей с периодом привязки 10 пс. Для увеличения шага интегрирования использовали алгоритм SHAKE для водородных связей. Шаг интегрирования составлял 2 фс. Использовали область расчета нековалентных взаимодействий (nonbonded cutoff) 10 \AA . Координаты каждого атома системы записывали каждые 10 пс моделирования. Дуплексы и одноцепочечные олигонуклеотиды были помещены в кубическую ячейку с расстоянием 12 \AA от моделируемой молекулы до границ ячейки. Для нейтрализации отрицательного заряда НК в периодической ячейке использовали ионы натрия. Параметры для ионов использовали ionsjc_tip3p [126].

Процедура моделирования состояла из следующих шагов.

- 1) Создание PDB файла, содержащего данные о координатах каждого атома в структуре дуплекса или одноцепочечной НК.
- 2) Создание водного окружения (модель воды TIP3P, кубические периодические условия, 12 \AA от моделируемой молекулы до границы ячейки) и добавление ионов натрия для нейтрализации периодической системы (либо дополнительное добавление ионов натрия и хлора для увеличения ионной силы раствора).
- 3) Минимизация всей системы с фиксированной НК (10 000 шагов минимизации) (PMEMD.MPI).
- 4) Нагрев системы с фиксированной НК в течении 2.5 нс с шагом интегрирования 0.5 фс от 0 до 300 К (PMEMD.CUDA).
- 5) Уравновешивание плотности системы при постоянном давлении 1 бар в течении 500 пс (SANDER.MPI) с зафиксированной НК.
- 6) Уравновешивание системы при постоянном давлении 1 бар и давлении 300 К в течении 5 нс (PMEMD.CUDA).
- 7) МД моделирование в течение 100/1000 нс в NPT ансамбле (1 бар, 300 К) (PMEMD.CUDA).

2.3.5. Анализ МД траекторий

Все снимки равновесного участка МД траектории были использованы для анализа. Вращательное и поступательное движение было удалено из траектории, исследуемая молекула либо комплекс располагали в центре периодической ячейки. Траектории визуализировали в пакете UCSF Chimera [127]. Модуль `crptraj` [131] пакета AmberTools использовался для расчета среднеквадратичных отклонений (RMSD) и среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) атомов НК, построения карт плотности воды и ионов вокруг молекулы, а также радиальных функций распределения. Методы иерархического кластерного анализа для поиска наиболее представленных структур в МД траектории при анализе тяжелых атомов системы был использован при получении 10 наиболее представленных в траектории структур.

Гидратация (число молекул воды, находящихся на заданном расстоянии от НК) была рассчитана для наборов атомов большой бороздки (O6, N7 и O4), атомов малых бороздок (N3, O2 и N2) и атомов кислорода фосфатных остатков (OP, O3', и O5'). Было подсчитано количество молекул воды, расположенных на расстоянии менее 3.4 Å от данных атомов. Количество молекул воды в первой гидратной оболочке было вычислено для всех атомов, что представляет собой количество молекул воды, находящихся на расстоянии менее 3.4 Å от атомов исследуемой системы. Радиальное распределение протонов воды $g(r)$ рассчитывали для набора немостиковых атомов кислорода фосфатных остатков. Для расчета количества катионов вблизи исследуемых атомов применяли критерий расстояния менее 6 Å [132]. Число водородных связей (H-bond) рассчитывали в соответствии с геометрическими критериями, когда расстояние между тяжелым донорным атомом и акцепторным атомом Н-связи составляло менее 3.0 Å, а угол составлял от 135° до 180°. При расчете плотности воды и ионов натрия использовали выравнивание относительно средней структуры с шагом решетки 0.2 Å.

Расчет энтальпии и энтропии комплексообразования проводили в одно- и трехтраекторном подходе. Для этого использовали модуль MMPBSA.py пакета программ AMBER16.

Для вычислений методом MMGBSA использовали параметры $igb=1$ [127]. Ионная сила раствора была установлена равной 100 мМ. Для расчета методами MMGBSA и MMPBSA и Q-Harm использовали каждый записанный снимок МД траектории, в случае NMA - каждую десятую сохраненную конформацию.

2.3.6. База данных ДНК/РНК и РНК/РНК дуплексов

Экспериментальные значения термодинамических параметров формирования НК-комплексов были взяты из литературных источников. В случае комплементарных ДНК/РНК дуплексов были использованы данные работы [76]. Из рассмотрения были исключены дуплексы, содержащие фосфатные остатки на 3'-конце. Таким образом, база данных включала термодинамические параметры комплексообразования для 65 дуплексов длиной от 5 до 12 пар оснований (в среднем 8 п.о.) и ГЦ-составом от 0 до 84% (в среднем 53%). Для комплементарных РНК/РНК дуплексов были использованы данные [77]. Из рассмотрения были также исключены дуплексы, содержащие концевые фосфатные группы. Таким образом база данных включала термодинамические параметры комплексообразования для 75 дуплексов длиной от 4 до 11 пар оснований (в среднем 7 п.о.) и долей Г/Ц пар от 22 до 100% (в среднем 58%).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Подход для расчета физико-химических свойств коротких производных НК

Для определения физико-химических свойств комплексов производных НК с комплементарными ДНК и РНК требуется, чтобы температура плавления такого комплекса была, по крайней мере, выше комнатной. Обычно при создании новых производных нуклеиновых кислот синтез таких протяженных (более 8 нуклеотидов) олигомеров сильно затруднен. Поэтому нами был предложен подход для определения физико-химических свойств для коротких низкостабильных олигонуклеотидов.

Для достоверного определения термодинамических параметров гибридизации коротких олигонуклеотидов с низкой термической стабильностью предложена схема (Рисунок б), в которой используются тандемные комплексы, обладающие большей термической стабильностью по сравнению с комплексами коротких олигонуклеотидов [128]. В данной схеме для получения величин термодинамических параметров анализируется несколько кривых термической денатурации комплексов различной длины. За счет различного вклада от связывания цепей и стэкинг взаимодействия в месте кооперативного контакта на стыке дуплексных структур в значение наблюдаемой константы комплексообразования у комплексов разной длины удается разделить и достоверно определить два этих вклада.

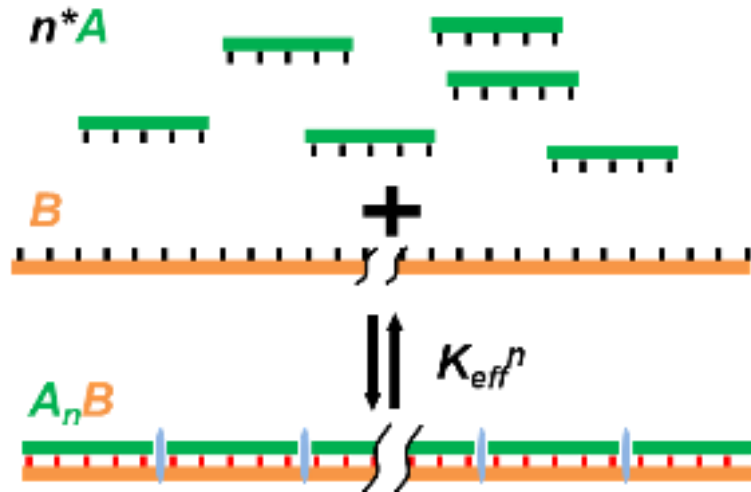


Рисунок 6. Схема взаимодействия коротких олигонуклеотидов А с матрицей В.

Формирование многокомпонентного комплекса можно описать следующей термодинамической схемой:



где A – короткий олигонуклеотид, B – это протяженная цепь, K_b – константа равновесия образования бимолекулярного процесса, K_c – константа образования кооперативного контакта (константа кооперативности). Процесс образования комплекса можно представить следующим образом: вначале формируется комплекс короткого олигонуклеотида A с комплементарной протяженной цепью B с константой равновесия K_b . На следующем этапе происходит последовательное присоединение следующего короткого олигонуклеотида A к комплексу AB , при этом возникает дополнительное стабилизирующее взаимодействие на стыке дуплексных структур, которое характеризуется константой кооперативных взаимодействий K_c . Таким образом процесс присоединения олигонуклеотида A к комплексу AB происходит с эффективной константой равновесия $K_b K_c$. Присоединение последующих олигонуклеотидов до полного заполнения всех мест на протяженном олигомере происходит аналогичным образом. В данной системе

возможно образование частичных комплексов с различными положениями коротких олигонуклеотидов на протяженной матрице, для учета которых может потребоваться использование комбинаторных методов анализа. В нашем подходе используется упрощенная модель, в которой предполагается взаимодействие всех n коротких олигонуклеотидов A с протяженной матрицей B без промежуточных и дополнительных состояний, то есть использование приближения “все-или-ничего”:



В этом случае, при соблюдении равенства концентраций олигонуклеотидов A и B приведенных на один нуклеотид ($[A]_0 = n \cdot [B]_0$), возможно составить уравнение материального баланса для концентрации каждого комплекса и представить эти концентрации в следующем виде (20) -(22):

$$[A]_0 = n * [A_n B] + [A] \quad (20)$$

$$[B]_0 = [A_n B] + [B] \quad (21)$$

$$[A_n B] = K_{eff}^n(n) [B] [A]^n \quad (22)$$

Таким образом, в соответствии с предложенной схемой, взаимодействие n олигонуклеотидов A с цепью B можно описать константой равновесия, которая характеризуется энергией связывания n олигомеров и формирования $n-1$ взаимодействий на стыке дуплексных структур. Можно ввести эффективную константу взаимодействия, которая описывает усредненный вклад от связывания одного из n олигонуклеотидов A , тогда :

$$K_{eff}^n(n) = K_b^n K_c^{n-1} \quad (23)$$

$$K_i = e^{-\Delta G_i^\circ(T)/RT} \quad (24)$$

$$\Delta G_i^\circ(T) = \Delta H_i^\circ - T \Delta S_i^\circ \quad (25)$$

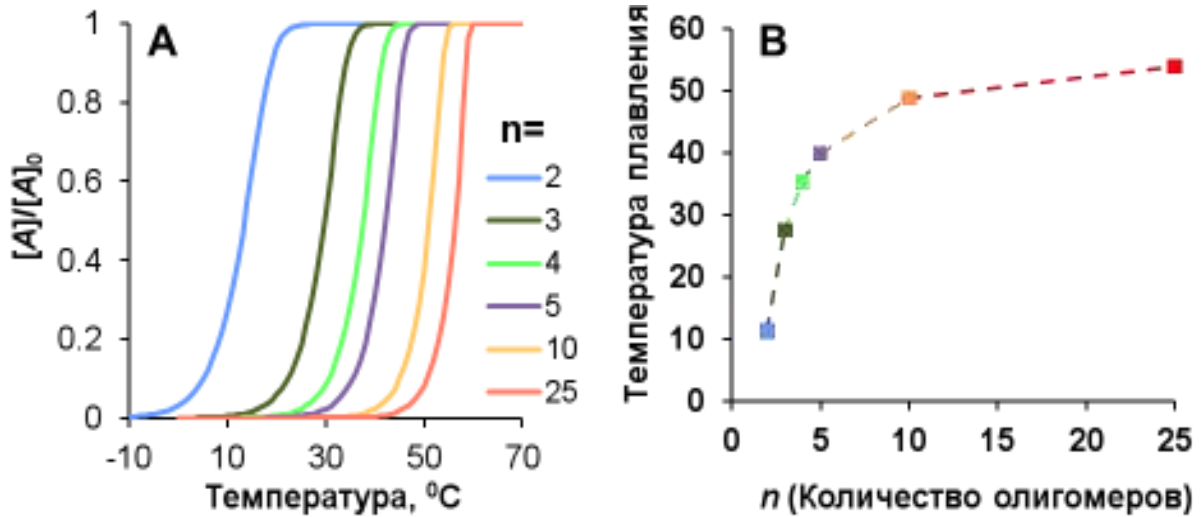


Рисунок 7. Теоретические кривые зависимостей концентрации свободного олигонуклеотида (А) и значений температур плавления (В) от количества взаимодействующих олигонуклеотидов A в тандемном комплексе A_nB ($n= 2, 3, 4, 5, 10$ и 25). Термодинамические параметры были взяты для комплекса $(dA_5)_n/(dT_{5*n})$. $[A]_0=1 \times 10^{-5}$ М.

Здесь K_i – это константа равновесия: эффективная ($i="eff"$), константа связывания ($i="b"$) или константа кооперативного взаимодействия ($i="c"$); $\Delta G^{\circ}_i(T)$ и ΔH°_i , ΔS°_i – изменение свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии при формировании соответствующего элемента тандемного комплекса. Таким образом, эффективные термодинамические параметры есть комбинация вкладов от формирования двойной спирали и от взаимодействия на стыке дуплексных, которые могут быть выражены следующим образом для любого n :

$$\Delta G^{\circ}_{eff}(T) = \Delta G^{\circ}_b(T) + \frac{n-1}{n} \Delta G^{\circ}_c(T), \quad (26)$$

$$\Delta H^{\circ}_{eff} = \Delta H^{\circ}_b + \frac{n-1}{n} \Delta H^{\circ}_c, \quad (27)$$

$$\Delta S^{\circ}_{eff} = \Delta S^{\circ}_b + \frac{n-1}{n} \Delta S^{\circ}_c, \quad (28)$$

Можно показать, что решение системы уравнений (20)-(22) сводится к решению алгебраического уравнения $n+1$ степени на концентрацию олигонуклеотида A в свободном состоянии ($[A]$):

$$K_{eff}^n [A]^{n+1} + [A] - [A]_0 = 0 \quad (29)$$

В общем случае данное уравнение может быть решено численными методами. Вычислив эффективные термодинамические параметры

комплексобразования можно определить температуру плавления тандемных комплексов (температуру, при которой половина олигонуклеотидов А находится в несвязанном состоянии в растворе). Выражение для температуры плавления может быть записано следующим образом:

$$T_{\text{пл}} = \frac{\Delta H_{\text{eff}}}{\Delta S_{\text{eff}} + R * \ln\left(\frac{[A]_0}{2}\right)} \quad (30)$$

Для данной схемы были построены графики концентрации короткого олигонуклеотида А в свободном состоянии от температуры при различных n и температуры плавления комплексов, которые наглядно показывают смещение перехода в область более высоких температур при увеличении числа взаимодействующих олигонуклеотидов (Рисунок 7).

Предложенная термодинамическая схема позволяет определить эффективные термодинамические параметры (K_{eff}) с помощью экспериментов по термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. В этом случае, оптическая плотность раствора смеси олигонуклеотидов при температурных изменениях может быть записана как (14):

$$OD = (C_{\text{дц}} + D_{\text{дц}}T)(1 - \alpha) + (C_{\text{оц}} + D_{\text{оц}}T)\alpha, \quad (31)$$

где OD – оптическая плотность раствора, T – температура в Кельвинах, $\alpha = [A]/[A]_0$ – доля несвязанного компонента А. Здесь мы предполагаем линейную зависимость базовых линий от температуры, типично наблюдаемую для такого типа экспериментов [63,129]. Для определения термодинамических параметров кривых термической денатурации комплексов должна быть минимизована разница между экспериментальной и теоретической кривыми зависимостей оптического поглощения от температуры путем варьирования двух термодинамических параметров ($\Delta H_{\text{eff}}^{\circ}$ и $\Delta S_{\text{eff}}^{\circ}$) и четырех оптических характеристик ($C_{\text{оц}}$, $C_{\text{дц}}$, $D_{\text{оц}}$, $D_{\text{дц}}$).

Если мы знаем температуры плавления комплексов при различных концентрациях, то с помощью концентрационного метода могут быть получены термодинамические параметры. Т.е. построив зависимость обратной температуры

плавления ($1/T_{пл}$) от логарифма концентрации олигонуклеотида A ($\ln([A]_0/2)$) величины наклона и отсечки данной прямой определяют значения эффективной энтальпии и энтропии комплексообразования (см. уравнение (30)). Для выделения вкладов от связывания и кооперативного контакта требуется знать эффективные параметры формирования комплексов с различным n . Альтернативно можно использовать одновременную подгонку нескольких кривых термической денатурации, полученных для комплексов с разным числом коротких олигонуклеотидов (n), взаимодействующих с комплементарными цепями различной длины. Это позволяет определять отдельные термодинамические параметры, из-за их различного удельного вклада в величину эффективной равновесной константы комплексообразования. В случае одновременной обработки p кривых термической денатурации с различной молекулярностью требуется варьировать $4 \times p$ оптических характеристики и 4 термодинамических параметра (энергии связывания и формирования кооперативного контакта).

Таким образом, создана теоретическая модель, описывающая взаимодействие коротких олигонуклеотидов с протяженной комплементарной НК-цепью и предложены экспериментальные подходы для получения термодинамических параметров связывания для коротких олигонуклеотидов.

На основе предложенной теоретической модели создана программа на основе MS Excel, которая позволяет анализировать термостабильность комплексов олигонуклеотидов и их компонент при различных температурах. На вход данной программе подаются кривые термической денатурации с оптической регистрацией сигнала комплексов различной заранее заданной длины, а так же концентрации исследуемых олигонуклеотидов. Далее, одновременной подгонкой теоретических кривых термической денатурации к экспериментальным получают термодинамические параметры связывания для коротких олигонуклеотидов, а так же параметры формирования кооперативного контакта до наилучшего совпадения теоретических и экспериментальных кривых. Доля несвязанного олигонуклеотида A для каждой температуры ищется из решения уравнения (29) методом Ньютона.

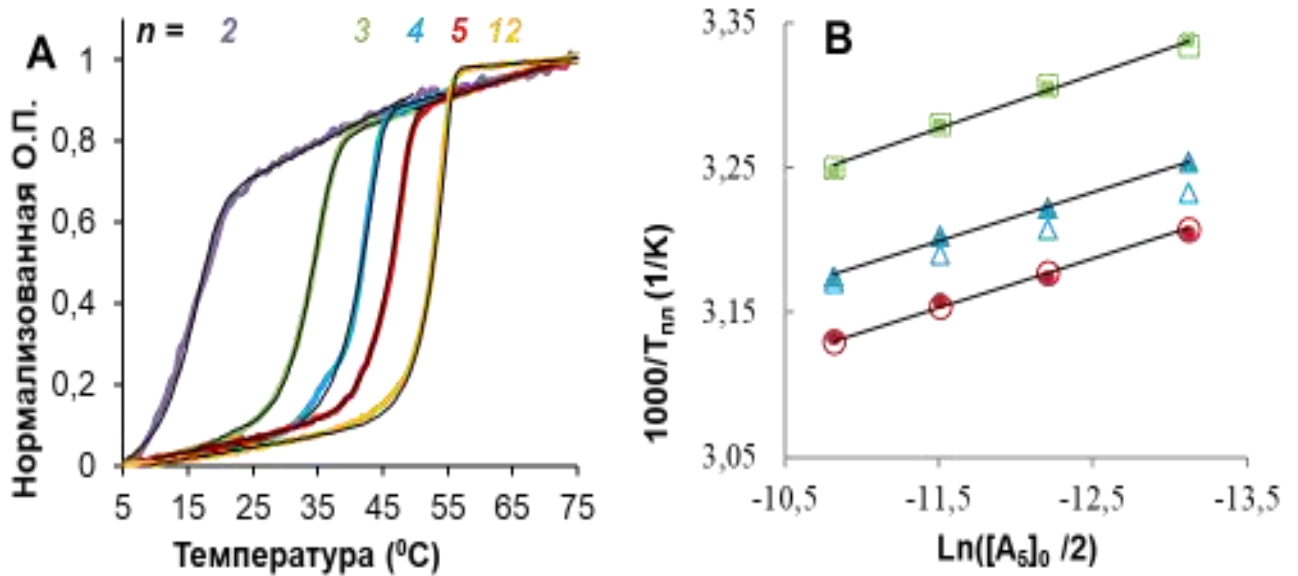


Рисунок 8. Экспериментальные (толстые цветные линии) и расчетные (тонкие черные линии, полученные одновременной подгонкой для $n = 3, 4$ и 5) кривые термической денатурации для комплексов имеющих различное количество ($n = 2, 3, 4, 5$ и 12) тандемных олигонуклеотидов dA_5 с ДНК(А) и концентрационные серии для комплексов с $n = 3, 4$ и 5 (В).

Применимость разработанной схемы получения термодинамических параметров комплексообразования была проверена на примере комплекса нативного короткого олигонуклеотида с различными протяженными ДНК и РНК-матрицами. Схема исследованной модельной системы приведена на Рисунок 9.

В качестве объекта для проверки применимости модели был выбраны пентаденилаты (dA_5) формирующие комплексы с комплементарными олиготимидилатами (dT_{5*n}), и олигорибоуридинами (rU_{5*n}) где $n=3, 4, 5$ (Рис. 9).



Рисунок 9. Схематичное изображение исследуемой системы.

Кроме того, для ДНК-комплексов была показана прогностическая способность расчета кривых денатурации $n = 2$ и 12 , при использовании термодинамических параметров, полученных в предыдущем случае. Термодинамические параметры комплексообразования и кооперативного контакта были определены в различных буферных условиях, а именно при

различных концентрациях NaCl (10, 100, 1000 мМ). В таблице 5 представлены значения эффективных термодинамических параметров полученных подгонкой теоретических кривых к экспериментальным и концентрационным методом для тандемных комплексов $(dA_5)_n/(dT_{5^*n})$.

При одновременной оптимизации кривых термической денатурации было найдено два устойчивых решения для $(dA_5)_n/(dT_{5^*n})$. В одном случае величины энтропии формирования кооперативного контакта $\Delta S_c^\circ=0$ кал/моль/К, а во втором отличалось от нуля значительно. Было выбрано решение с $\Delta S_c^\circ=0$. Это связано с тем, что структурные изменения в олигомерах и их комплексах малы при образовании кооперативного контакта в рамках предложенной модели “все-или-ничего”, а основной энтальпийный вклад вносит стэкинг-взаимодействие на стыке дуплексных структур. Полученные для данного случая значения энтальпии образования кооперативного контакта хорошо коррелируют с экспериментальными величинами для А/рА контакта (13-15 ккал/моль) [130] и с данными квантово-химических расчетов [131]. Значения энтропии и энтальпии связывания близки к значениям, предсказанным в модели ближайших соседей [73].

Таблица 5. Значения эффективных термодинамических параметров комплексообразования тандемных комплексов $(dA_5)_n/(dT_{5^*n})$ ($n = 3, 4$ и 5), полученные при помощи одновременного и индивидуального фитинга кривых термической денатурации при различных концентрациях олигонуклеотидов (представленные данные усреднены по концентрации и по значениям на 260 и 270 нм) и с помощью концентрационного метода при 1 М NaCl , 10 мМ Какодилат Na, концентрация на пентамер 10 мкМ.

$n=$	Одновременная подгонка			Индивидуальная подгонка		
	3	4	5	3	4	5
Подгонка теоретических кривых под экспериментальные						
ΔH°_{eff} , ккал/моль	-51.5	-60.4	-56.9	-54.4	-77.9	-66.5
ΔS°_{eff} , кал/моль/К	-146	-170	-157	-156	-226	-187
ΔG°_{eff37} , ккал/моль	-6.3	-7.6	-8.4	-6.1	-7.9	-8.6
$T_m, ^\circ C^*$	29.6	37.3	41.6	29.3	38.6	41.9
Концентрационный метод						
ΔH°_{eff} , ккал/моль	-50.4	-61.8	-65.5	-54.4	-77.9	-58.7
ΔS°_{eff} , кал/моль/К	-142	-175	-184	-156	-226	-162
ΔG°_{eff37} , ккал/моль	-6.3	-7.6	-8.5	-6.1	-7.9	-8.5
$T_{пл}, ^\circ C$	29.5	37.2	41.7	29.3	38.6	41.6

3.2. Структура и термодинамические свойства комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК

В качестве первого модельного объекта для изучения физико-химических свойств новых производных НК были выбраны глицин-морфолиновые (*gM*) пентааденилаты (*gMA*₅, Рисунок 10) и их тандемные комплексы с комплементарными цепями ДНК и РНК длиной 15, 20 и 25 нуклеотидов ($n=3, 4, 5$). Ранее была показана их способность образовывать комплексы с полимерными цепями НК, однако детального исследования термодинамических параметров формирования комплексов не проведено [132].

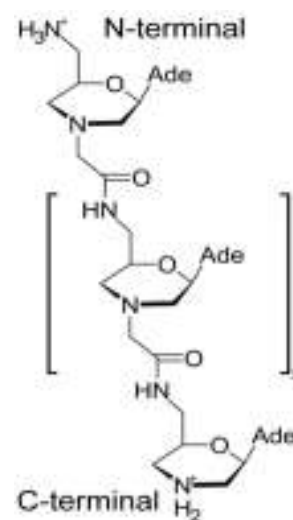


Рисунок 10. Структура пентааденилата глицин-морфолинового производного (*gMA*₅) при нейтральном значении pH.

3.2.1. Характеризация вторичной структуры комплексов методом спектроскопии кругового дихроизма

Для подтверждения образования комплексов были записаны спектры кругового дихроизма (КД) *dA*₅, (*gMA*₅), *poly(dT)* и *poly(rU)* и их комплементарных комплексов при различных температурах в стехиометрическом соотношении при расчетах на один нуклеотид (1:1). КД-спектр смеси и сумма спектров отдельных цепей в одинаковых концентрациях при 95 °С совпадают во всех случаях (Рисунок 11, красные линии). При низкой температуре (20 °С) наблюдается образование комплекса, так как спектры суммы отличается от спектра смеси (Рисунок 11, синие линии). Это указывает на изменения вторичной структуры, то есть на образование межмолекулярных комплексов.

В случае (*dA*₅)/*poly(dT)* комплекса форма КД-спектров близка к спектру *poly(dA)*/*poly(dT)* комплекса [133], что свидетельствует о формировании

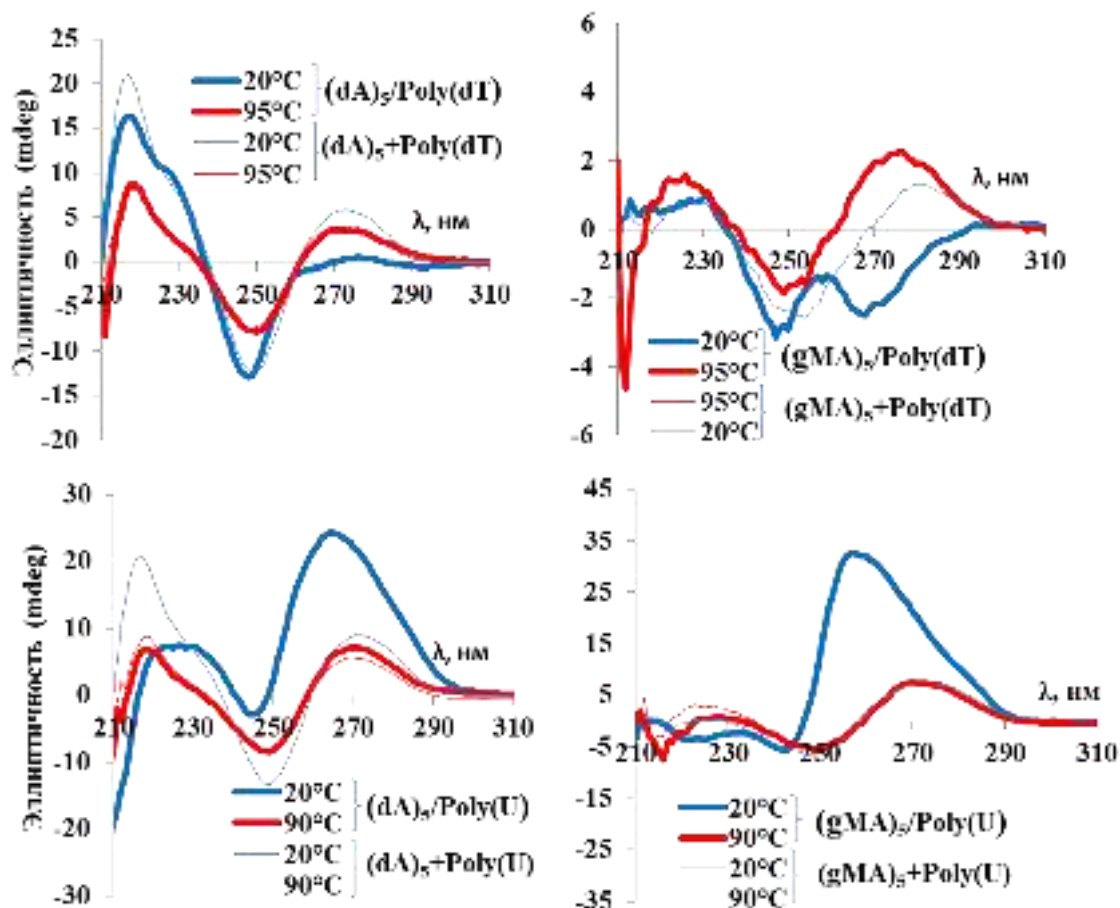


Рисунок 11. Спектры кругового дихроизма для смеси (толстые линии) и суммы спектров (тонкие линии) отдельных компонентов при высокой (красным) и низкой (синим) температуре для $(gMA)_5/poly(rU)$ и $dA_5/poly(rU)$, $dA_5/poly(dT)$ и $(gMA)_5/poly(dT)$.

антипараллельных тандемных комплексов. Наличие точек изоэллиптичности на длинах волн 240 и 260 нм в температурных сериях КД-спектров является дополнительным доказательством применимости модели “все-или-ничего” даже в самом неочевидном случае образования комплекса с полимерной цепью $(dA_5)/poly(dT)$, для которого величина $n = 12$ достаточно большая. Таким образом, можно заключить, что в случае более коротких комплексов $(dA_5)_n/(dT_{5*n})$, где $n = 2 - 5$, применимость модели все-или-ничего обоснована.

При анализе КД-спектров модифицированного пентамера с полимерной тимидилатной цепью наблюдали аналогичные зависимости. Спектры смеси совпадали с суммой спектров отдельных цепей при высокой температуре и различались при низкой. Существуют точки изоэллиптичности в районе 230 и 255 нм. Но, в отличие от структуры нативных комплексов, о типе комплекса

модифицированных олигомеров судить невозможно, так как референсных данных для спектров такой формы не существует.

КД-спектры $dA_5/poly(rU)$ и $(gMA_5)/poly(rU)$ при 20 °C имеют форму спектра, которая типична для А-формы двойной спирали [134]. В случае ДНК/РНК комплекса имеются положительные пики на длинах волны 228 и 263 нм высокой амплитуды, и отрицательный пик на длине волны 245 нм с малой амплитудой. Для $(gMA_5)/poly(rU)$ наблюдается очень похожий спектр, с максимумом на 258 нм и минимумом на 243 нм, но в отличие от нативного комплекса, ярковыраженный пик на 220-230 нм отсутствует. Такое различие может быть вызвано тем, что в данной области сказывается замена рибозофосфатного остова на глицин-морфолиновый, который имеет другой профиль оптического поглощения [135], а, следовательно, и сигнала кругового дихроизма.

Таким образом, для всех исследованных комплексов наблюдаются точки изоэллиптичности в температурных сериях спектров, что может косвенно служить свидетельством применимости модели двух состояний к описанию процесса термической денатурации таких комплексов. Кроме того, по форме КД спектров исследованных тандемных комплексов можно судить о форме их двойной спирали. Так $dA_5/poly(dT)$ имеет В-форму двойной спирали, а $(gMA_5)/poly(rU)$ и $dA_5/poly(rU)$ - А-форму. Отсутствие явной формы у $(gMA_5)/poly(dT)$ не позволяет сделать вывод о вторичной структуре данного комплекса.

3.2.2. Влияние буферных условий на гибридизационные свойства глицин-морфолиновых олигомеров

При использовании модифицированных олигонуклеотидов условия среды, в которую их помещают, могут в значительной степени варьироваться. Это существенно влияет на эффективность формирования комплексов в случае нативных зондов. Типично исследуют влияние ионной силы раствора на термостабильность комплексов. При нейтральном значении рН нативные олигонуклеотиды dA_5 и dT_{5^*n} имеют отрицательный заряд фосфатных остатков, которые отталкиваясь мешают формированию двойной спирали. Положительно

заряженные ионы в растворе хорошо экранируют отрицательно-заряженные фосфатные группы, а увеличение их концентрации в растворе приводит к большей термодинамической устойчивости комплексов НК.

В случае gM производных, таких исследований не проводили, а эффект влияния ионной силы раствора может оказаться рН-зависимым. Это связано с тем, что при изменении рН в диапазоне 5-8 может происходить протонирование/депротонирование вторичных и третичных аминогрупп морфолинового кольца [136]. Это будет значительно влиять на эффективность образования gM/НК комплексов, так как при протонировании будет возникать дополнительное притяжение между отрицательно заряженной нативной цепью и положительно заряженной модифицированной. Достоверной информации о зарядовом состоянии всех аминогрупп в остове морфолиновых производных олигонуклеотидов литературе не представлено. Для молекул с близкой химической структурой к структуре концевых первичного и вторичного аминов олигомера известны величины pK_a находящиеся в диапазоне 8-11 [118]. Таким образом, при нейтральном рН (7 – 7.2) они будут протонированы. В то же время судить о величинах pK_a для третичных аминов в структуре олигомерных цепей нельзя, так как они могут в значительной мере отличаться от случая мономеров и концевых остатков [118].

Для изучения влияния ионной силы раствора и значения рН на эффективность комплексообразования морфолин-глициновых производных были проведены эксперименты по термической денатурации нативных и модифицированных комплексов при различных ионных силах раствора (10 mM, 100 mM, 1 M NaCl) и при различных значениях рН (5.5, 7.2 и 8.0) буфера (Рисунок 12).

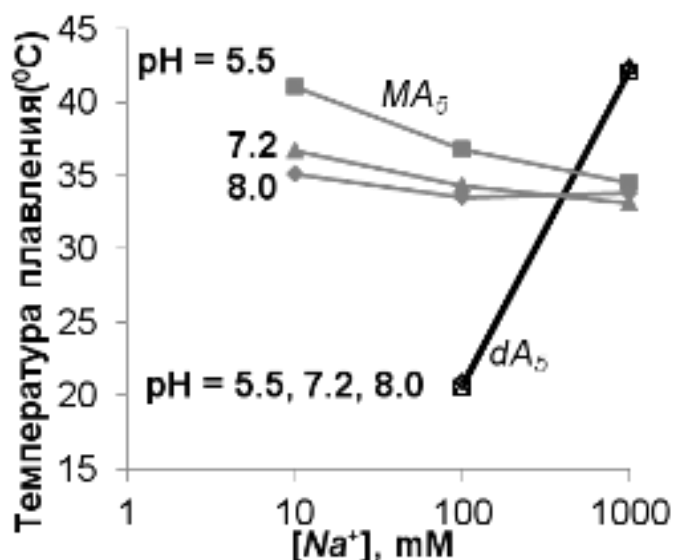


Рисунок 12. Зависимость температуры плавления комплексов $(dA_5)_5/(dT_{25})$ (черные незакрашенные фигуры) и $(gMA_5)_5/(dT_{25})$ (серые закрашенные) от концентрации ионов Na^+ и значения pH (pH = 5.5 – квадраты, 7.2 – треугольники, 8.0 – ромбы) полученные с помощью метода оптимизации индивидуальных кривых плавления.

Сравнительное исследование комплексов $(dA_5)_5/(dT_{25})$ и $(gMA_5)_5/(dT_{25})$ показывает различные зависимости термической стабильности от концентрации катионов и значений pH. Для комплекса $(dA_5)_5/(dT_{25})$ отсутствует влияние pH в исследованном диапазоне при заданных ионных силах раствора (Табл. 6, Рисунок 12). Не изменяются как температуры плавления комплексов, так и величины энергий Гиббса комплексообразования в рамках

величин экспериментальных погрешностей (Таблица 6). При этом, снижение концентрации NaCl с 1М до 100 мМ приводит к значительной дестабилизации комплекса: температура плавления снижается более чем на 20 градусов. Такой эффект обусловлен главным образом увеличением энтропийного дестабилизирующего вклада, что находится в полном соответствии с литературными данными о влиянии ионной силы раствора на термодинамику ДНК/ДНК дуплексов [119]. При уменьшении концентрации Na^+ до 10 мМ формирование комплекса в экспериментах по термической денатурации зарегистрировано не было.

Совершенно другое поведение наблюдали для модифицированного комплекса $(gMA_5)_5/(dT_{25})$. При нейтральном значении pH (7.2) происходит незначительное увеличение температуры плавления комплекса (на ~3.5 градуса) при снижении концентрации Na^+ с 1М до 10мМ (Табл. 6). Несколько меньшая стабилизация (на ~1.5 градуса) наблюдается при pH 8.0. Однако, при понижении pH до значения 5.5 наблюдается значимая термостабилизация комплекса

(gMA_5)₅/(dT_{25}) (на ~6.5 градусов) при снижении концентрации Na^+ в растворе (Таблица 6, Рисунок 12).

При всех значениях рН при снижении ионной силы раствора наблюдается уменьшение по абсолютной величине энтальпии комплексообразования, но энергия Гиббса, отвечающая за наблюдаемую термостабильность комплекса, растет по модулю. Это свидетельствует о некотором снижении эффективности стэкинга во всем многокомпонентном комплексе, но увеличении стабилизирующего электростатического взаимодействия между цепями.

Таблица 6. Эффективные термодинамические параметры формирования (dA_5)₅/(dT_{25}) и (gMA_5)₅/(dT_{25}) при различных концентрациях ионов соли и рН полученные индивидуальным фитингом кривых термической денатурации с оптической регистрацией сигнала при концентрации пентамеров 1×10^{-5} М/литр. Концентрации пентамеров и dT_{25} равны в пересчете на нуклеотид.

	рН	[Na^+], mM	ΔH°_{eff} , ккал моль	ΔS°_{eff} , ккал моль*К	ΔG°_{eff} ³⁷ , ккал моль	$T_{пл}$, °C
<i>dA₅</i>	5.5	10	Н.Д.*	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.
	5.5	100	-54.9	-162	-4.5	20.9
	5.5	1000	-61.5	-171	-8.6	42.4
	7	10	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.
	7	100	-55.9	-166	-4.4	20.5
	7	1000	-57.3	-157	-8.4	42.0
	8	10	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.
	8	100	-48.2	-140	-4.8	20.5
	8	1000	-49.7	-133	-8.4	42.5
	5.5	10	-25.3	-56	-7.8	41.1
	5.5	100	-32.6	-81	-7.5	36.8
	5.5	1000	-35.5	-91	-7.2	34.5
	7	10	-33.2	-82	-7.5	36.7
	7	100	-34.3	-87	-7.2	34.3
	7	1000	-39.3	-104	-7.0	33.1
<i>gMA₅</i>	8	10	-42.8	-115	-7.3	35.1
	8	100	-34.9	-89	-7.1	33.5
	8	1000	-42.7	-115	-7.1	33.8

Полученные данные свидетельствуют том, что при рН 7.2 и 8.0 зарядовые состояния модифицированного олигомера близки, а стабилизация комплекса при рН=5.5 свидетельствует о возникновении положительного заряда в

модифицированной цепи, что соответствует протонированию третичных аминов в морфолиновом кольце.

Для подтверждения сделанных выше заключений о зарядовом состоянии модифицированной цепи при различных значениях рН и выяснения деталей термодинамических эффектов были исследованы комплексы $(gMA_5)_n / (dT_{5*n})$ с $n=3, 4$ и 5 . Полученные данные обрабатывали при помощи процедуры одновременной оптимизации кривых термической денатурации. Величины отдельных термодинамических вкладов формирования тандемных комплексов морфолиновых олигомеров приведены в Таблице 7. Видно, что при понижении ионной силы раствора с 1М до 10 мМ при рН=7.2 значение энтальпии комплексообразования изменяется незначительно (~5%), в то время как энтропийная составляющая меняется более существенно (~20%). В противоположность этому, энтальпия формирования кооперативного контакта незначительно снижается при переходе от 1М до 100 мМ NaCl, и падает практически в два раза при уменьшении концентрации катионов до 10 мМ. Это коррелирует с увеличением отталкивания положительных первичного и вторичного аминов в месте одноцепочечного разрыва при уменьшении эффективности их экранирования при низких ионных силах раствора. Это приводит к низкой эффективности стэкинг-взаимодействия, которая характеризуется величиной ΔH°_c .

Стабилизирующий термодинамический эффект, вызванный изменением рН при низкой ионной силе раствора (10 мМ Na⁺) для комплексов (gMA₅)_n/(dT_{5*n}) с n=3, 4 и 5, обусловлен, главным образом, изменением термодинамических параметров формирования дуплексной структуры. Происходит снижение абсолютной величины ΔH_b° на 35%, но еще более значительно изменяется энтропийная составляющая – уменьшается по модулю практически в 2 раза. При этом изменение амплитуды ΔH_c° составляет хоть и значимые 20%, но в абсолютном выражении всего 1.4 ккал/моль. Это находит отражение в ширине и положении термодинамического перехода: при снижении рН он сдвигается в область больших температур, но ширина его увеличивается (Рисунок 13). Такие изменения отдельных термодинамических параметров свидетельствуют снижении эффективности стэкинг-взаимодействия внутри дуплексных структур за счет отсутствия эффективного экранирования возникающих положительных зарядов. Отсутствие столь значительного изменения в величине энергии кооперативного взаимодействия говорит об отсутствии изменений в зарядовом состоянии первичного и вторичного аминов.

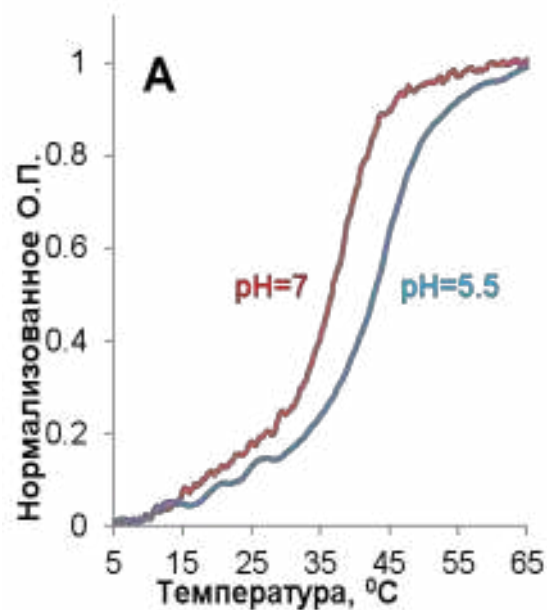


Рисунок 13. Нормализованные кривые термической денатурации для комплекса (gMA₅)₅/(dT_{5*5}) при концентрации Na⁺ 10 мМ и при значениях рН=5.5 и рН=7

3.2.3. Анализ термодинамических параметров комплексообразования и кооперативного контакта глицин-морфолиновых олигомеров

На следующем этапе работы при помощи, предложенной выше схемы были проанализированы термодинамические параметры комплексообразования как для комплексов нативного пентааденилата, так и комплексов глицин-морфолинового

аналога с комплементарными протяженными РНК и ДНК цепями: $(dA_5)_n/(dT_{5*n})$, $(gMA_5)_n/(dT_{5*n})$, $(dA_5)_n/(rU_{5*n})$ и $(gMA_5)_n/(rU_{5*n})$, где $n=3, 4$ и 5 .

Было 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 и кооперативного контакта на стыке дуплексных структур. Второй - обработка одиночных кривых и получение эффективных термодинамических параметров. Третий - это использование зависимости температуры плавления от концентрации для определения значений эффективных термодинамических параметров.

Анализ кривых термической денатурации выявил следующие закономерности:

- 1.) Температура плавления в тандемных комплексах возрастает с увеличением его длины.
- 2.) Наблюдаются слабые перекрытия кривых термической денатурации для комплексов разной молекулярности. Это значит, что вкладом от комплексов меньшей молекулярности (например, $n = 1, 2$ или 3), при образовании более высокомолекулярных структур (в данном случае $n = 4$) в первом приближении можно пренебречь.
- 3.) Для комплексов, содержащих разное число коротких взаимодействующих олигонуклеотидов ($n=3-5$), теоретические кривые отлично описывают экспериментальные кривые термической денатурации для отдельных кривых.
- 4.) Одновременная подгонка теоретических кривых под экспериментальные данные для всех трех кривых позволяет добиться хорошего совпадения (Рисунки 14 и 15). Исключение составляет случай тандемного комплекса $(dA_5)_n/(rU_{5*n})$, для которого в случае $n = 4 - (dA_5)_4/(rU_{20})$ скорее всего не выполняется в приближение двух состояний. Для данной системы были использованы только данные с $n=3, 5$.
- 5.) Эффективные термодинамические параметры, полученные при различных концентрациях, совпадают между собой ($C_t = 40, 100, 200, 400$ мкМ/ нуклеотид).

6.) Значения эффективных энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса полученные как индивидуальной подгонкой, так и одновременной по трем кривым отличаются не более чем на 15%.

7.) Значения гипохромного эффекта тандемных комплексов были близки к таковым для НК-дуплексов.

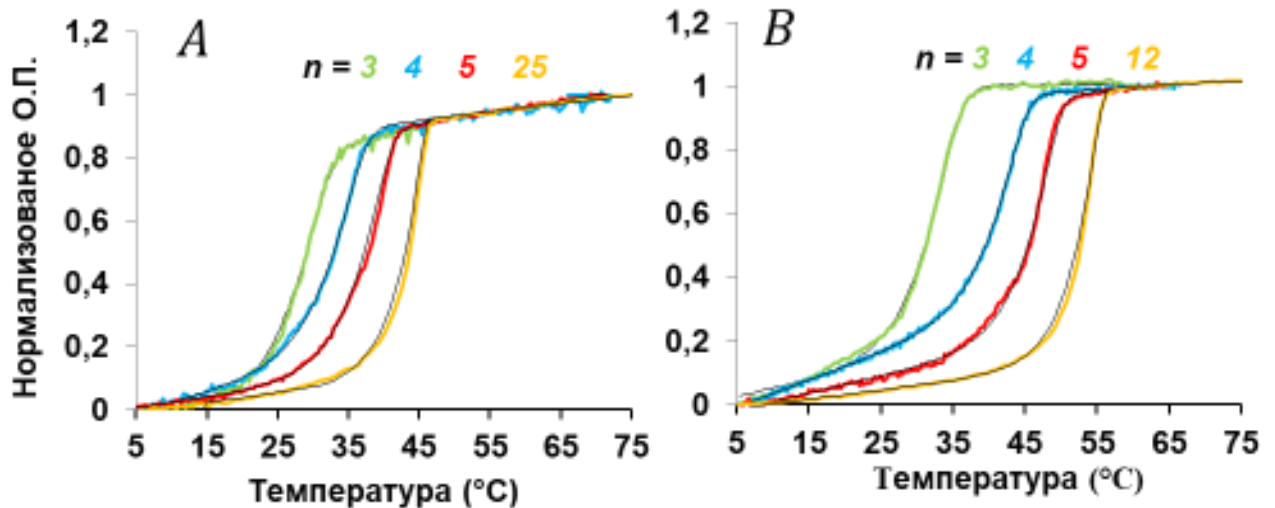


Рисунок 14. Экспериментальные (тонкие линии) и расчетные (толстые линии, одновременная подгонка кривых при $n = 3, 4$ и 5) кривые термической денатурации для разного количества ($n = 3, 4, 5$ и $(poly(rU))$) тандемных олигонуклеотидов gMA_5 (A) и dA_5 (B). Концентрации урациловых и адениновых остатков в каждом образце равны. Эксперименты проведены в какодилатном буфере при $pH=7.2$, 1 M Na^+ .

Сравнение термической стабильности нативных и модифицированных комплексов в стандартных условиях (1 M NaCl , $pH=7.2$) показывает меньшую термостабильность модифицированных, чем нативных комплексов в случае дезокситимидилатной матрицы, и обратную зависимость в случае рибоуридиновой матрицы (Табл. 7).

Температура плавления модифицированных комплексов (gMA_5) $n/(dT_{5*n})$ значительно ниже чем нативных (dA_5) $n/(dT_{5*n})$ (Табл. 7) Нельзя определенно утверждать, с каким вкладом это больше связано, с энергией связывания или образования кооперативного контакта. Оба этих вклада примерно в полтора раза меньше по амплитуде для модифицированных комплексов по сравнению с нативными. Это может быть связано с меньшей эффективностью стэкинг-взаимодействия.

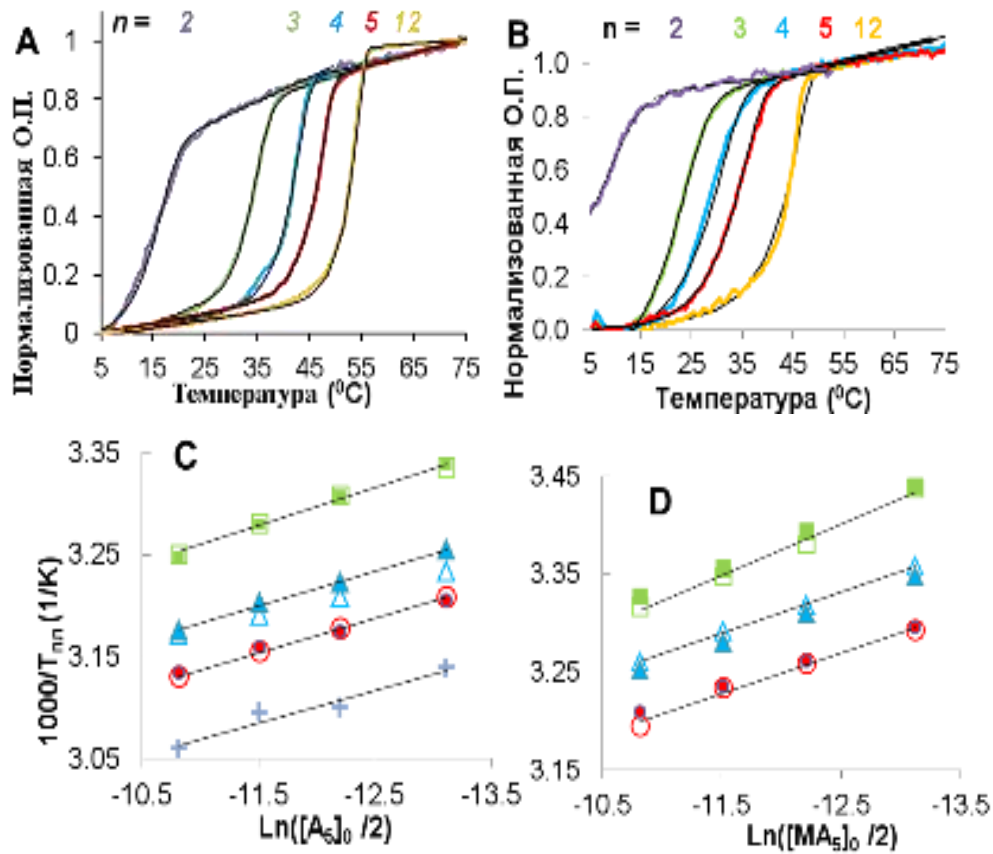


Рисунок 15. Экспериментальные (тонкие линии) и расчетные (толстые линии, одновременная подгонка кривых при $n = 3, 4$ и 5) кривые термической денатурации для разного числа ($n = 3, 4, 5$ и 10 или 12 для $(poly(dT))$) олигонуклеотидов dA_5 (A) и gMA_5 (B) в тандемных комплексах. Рассчитанные кривые для $n = 2$ и 12 были получены варьированием оптических параметров, используя уже полученные для ($n = 3-5$) термодинамические параметры ($[dA_5]_0 = [gMA_5]_0 = 1 \times 10^{-5}$ М). Концентрационная зависимость для комплексов, содержащих различное количество ОН в тандемных комплексах ($n = 3, 4, 5$ и 12 в случае $(poly(dT))$ dA_5 (C) and gMA_5 (D)). Концентрации тимининов и аденинов в каждом образце равны. Эксперименты проведены в какодилатном буфере при pH 7.2, 1M Na⁺.

Данное предположение подтверждается тем, что величина гипохромного эффекта для нативных комплексов несколько больше, чем для морфолиновых производных. Она составляет для нативных комплексов $(dA_5)_n / (dT_{5*n})$ - 26% ($n=3$), 23% ($n=4$) и 22% ($n=5$), а для модифицированных $(gMA_5)_n / (dT_{5*n})$ - 18% ($n=3$), 17% ($n=4$) и 17% ($n=5$).

Значения эффективных термодинамических параметров изменения энтропии и энтальпии комплексообразования, полученные при одновременной и индивидуальной подгонке кривых термической денатурации в случае нативных комплексов отличаются больше, чем в случае комплексов с морфолиновым производным.

Таблица 7. Термодинамические параметры связывания и кооперативного взаимодействия, полученных одновременной подгонкой кривых термической денатурации ($n=3, 4, 5$) при $pH=7.2$, $1M NaCl$, $10mM CaCl_2$. 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 $4 \times 10^{-5} M$).

	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_{nl} , °C ^{b,c}	26.8	36.5	37.3	29.0

^bЭффективные термодинамические параметры рассчитаны для $n = 4$. ^c T_{nl} рассчитаны для концентрации пентануклеотида $10 \mu M$.

В случае $(dA_5)_n / (dT_{5^*n})$ с $n=3-5$, значение ΔS°_{eff} для индивидуальной подгонки по абсолютному значению больше в среднем на 10-30 кал/моль/К, по сравнению со случаем одновременной подгонки, а в случае ΔH°_{eff} , эта разница составляет в среднем ~ 10 ккал/моль. Для величины ΔG°_{eff} не наблюдается таких больших отличий, и можно сказать, что значения ΔG°_{eff} совпадают в случае одновременной и индивидуальной подгонки в пределах экспериментальной ошибки. Значения температуры плавления так же совпадают между собой.

Величины, полученные концентрационным методом, практически совпадают как для индивидуальной подгонки, так и одновременной подгонки (отличие не более $\sim 10-15\%$).

В случае $(gMA_5)_n / (dT_{5^*n})$ комплексов не наблюдается столь больших различий в значениях величин ΔH°_{eff} и ΔS°_{eff} полученных при одновременной и индивидуальной подгонке, хотя с другой стороны не наблюдается закономерного роста по абсолютному значению эффективных энтальпии и энтропии комплексообразования при увеличении числа ОН в комплексе. Значения свободной энергии Гиббса в обоих случаях совпадают, а вот значения температур плавления при $n=3$ и 4 сильно отличаются, что может быть связано с проблемой

в определении базовой линии оптического поглощения в связанном состоянии. В случае термодинамических величин, полученных концентрационным методом ясно видно, что для комплекса $(gMA_5)_5/(dT_{5*5})$ в случае ΔS°_{eff} при одновременной подгонке и в случае концентрационного метода эти величины отличаются более чем на 35 кал/моль/К (~30%). Но с другой стороны, по данным концентрационного метода, видна зависимость величины энтропии и энтальпии от молекулярности комплекса. Значения свободной энергии Гиббса и температуры плавления в случае концентрационного метода практически совпадают с величинами, полученными подгонкой теоретических кривых под экспериментальные.

Термическая стабильность тандемных комплексов $(dA_5)_5/(dT_{25})$ оказывается незначительно выше чем для $(gMA_5)_5/(rU_{25})$, тогда как $(dA_5)_5/(rU_{25})$ обладает наименьшей температурой плавления при 1М NaCl при физиологическом значении рН.

Как было написано выше, для одновременной подгонки использовали только комплексы $(dA_5)_3/(rU_{15})$ и $(dA_5)_4/(rU_{25})$, образование которых может быть описано в рамках модели “все-или-ничего”. Полученные значения термодинамических параметров связывания (ΔH°_b , ΔS°_b , Таблица 7) близки к параметрам из модели ближайших соседей для РНК/ДНК [76], которые соответственно равны -46 ккал/моль и -145.6 кал/моль/К. Значение же энтальпии кооперативного контакта, которое равно -10.8 ккал/моль является наименьшим среди всех комплексов.

Энтальпия связывания для пентааденилата глицин-морфолинового производного с РНК всего на -5.8 ккал/моль отличается от ΔH°_b для РНК/ДНК системы, в то время как энтальпии связывания с ДНК матрицей отличаются очень значительно. Это может быть связано с увеличенной конформационной подвижностью глицин-морфолинового олигомера в одноцепочечном состоянии. Значение энтальпии кооперативного контакта в свою очередь по абсолютному значению является самым большим среди 4 изучаемых систем и значительно стабилизирует тандемный комплекс. Это может быть связано со стабилизацией

за счет электростатического притяжения положительно-заряженных концевых групп глицин-морфолина с отрицательно заряженными фосфатными группами в РНК.

Термодинамика связывания и кооперативного взаимодействия на стыке дуплексных структур точно описывает кривые плавления для нативных и gM-содержащих комплексов с политимидилатными ($poly(dT)$) и полиуридиновыми цепями ($poly(rU)$). В случае полимерных комплексов количество олигомеров, одновременно диссоциирующих из полимерной цепи – размер кооперативного звена, может быть оценено значением n при подгонке кривой плавления с использованием термодинамического параметра, полученного при процедуре одновременной подгонки. Для комплексов $(gMA_5)/poly(rU)$ и $(dA_5)/poly(rU)$ количество олигомеров в кооперативной единице (n) составляло 11 и 25 соответственно. Для комплексов с ДНК в обоих случаях n составляло ~ 12 . Полученные значения характеризуют персистентную длину (длину без изломов). Для тандемных комплексов коротких олигомеров это (изломы), скорее всего происходят в местах одноцепочечного разрыва. Разрушение кооперативного контакта приводит к дестабилизации комплекса. Таким образом, количество олигомеров, одновременно диссоциирующих от цепи полимерной матрицы, должно коррелировать с персистентной длиной. В случае ДНК/РНК дуплексов персистентная длина составляет около 49 нм (~ 200 п.н. или $n = 40$) [137], что выше, чем для ДНК/ДНК дуплексов - 42 нм (~ 125 п.н. или $n = 25$) [138] и в два раза выше, чем наблюдаемое значение для тандемных комплексов пентаденилатов. Это подтверждает возможность более вероятных изгибов двойной спирали в местах с одноцепочечным разрывом.

Подводя итог анализу экспериментально полученных данных можно сказать, что 1) доказана применимость предложенной термодинамической модели; 2) с ее использованием определены эффективные термодинамические параметры и отдельные вклады в формирование тандемных комплексов нативных и глицин-морфолиновых олигомеров с ДНК и РНК; 3) показана зависимость термической стабильности комплексов морфолиновых производных от рН

раствора в диапазоне 5.5 - 8.0 при низкой ионной силе раствора, в то время как для нативных она отсутствует; 4) анализ величин отдельных термодинамических вкладов позволил установить зарядовое состояние аминов в глицин-морфолиновом остове: первичный и вторичный амины концевых остатков протонированы во всем исследованном диапазоне значений pH, в то же время внутренние третичные амины морфолинового кольца протонируются при более низком значении pH равном 5.5.

3.2.4. Компьютерное изучение физико-химических свойств модельных комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов

3.2.4.1. Структурные особенности тандемных комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК

Отсутствие достоверной информации о пространственной организации комплексов глицин-морфолиновых производных НК не позволяет эффективно их использовать. Получение такой информации экспериментальными методами, для новых соединений типично затруднено по вышеописанным причинам: из-за малого количества и сложности синтеза протяженных модифицированных олигомеров.

Альтернативой этому, в определенной степени, выступают методы компьютерного моделирования, и в частности метод молекулярной динамики. Нами решено провести исследование структуры и конформационной подвижности тандемных комплексов морфолиновых олигомеров на примере экспериментально исследованных комплексов $(gMA_5)_4/(dT_{20})$, $(gMA_5)_4/(rU_{20})$ и их природных аналогов $(dA_5)_4/(dT_{20})$, $(dA_5)_4/(rU_{20})$ методом молекулярной динамики в явной водной оболочке. Выбор таких комплексов обусловлен с одной стороны их термической стабильностью при комнатной температуре, а с другой стороны минимизацией размера моделируемой системы в совокупности с минимизацией вкладов краевых эффектов в таких протяженных дуплексных структурах.

Первым шагом компьютерных исследований является создание пространственных молекулярных структур элементов модифицированного

олигомера. На основании известной химической формулы глицин-морфолинового производного аденина были созданы молекулярные модели внутренних и концевых модифицированных нуклеотидов с учетом возможных изомеров и конформеров и введена номенклатура атомов (Рисунок 16А).

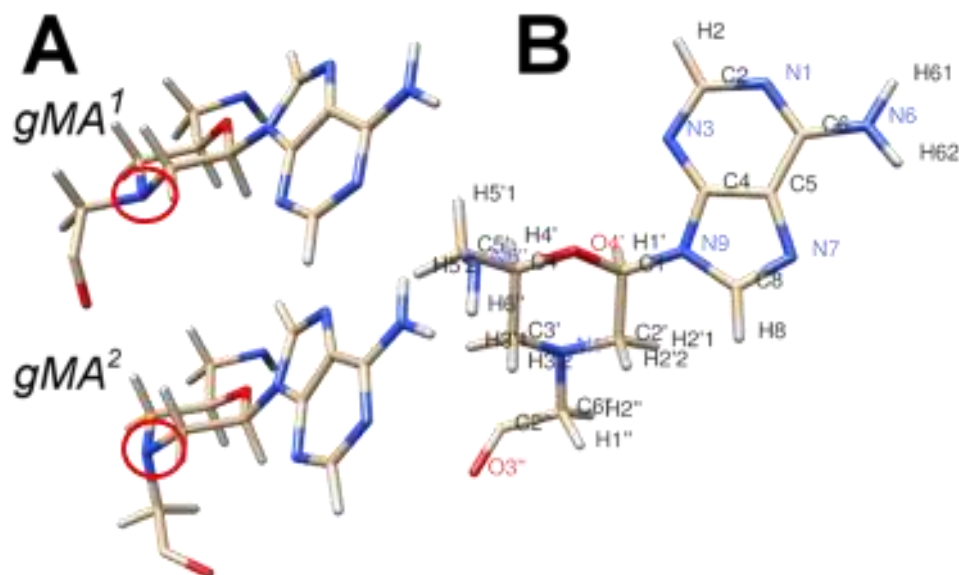


Рисунок 16. Различные стереоизмеры морфолинового производного (А), gMA^1 - экваториальный, gMA^2 - аксиальный. Красным выделен атом, относительно которого возможны различные стереомеры. Номенклатура атомов у gMA (В).

Анализ литературных данных позволил разрешить ряд вопросов, связанных с изомерией. Так было установлено, что относительное положение гетероциклического основания относительно плоскости кольца остова сохраняется в модифицированном мономере, таким же, как и для его предшественника - нативного аденозина, у которого он находится в β -положении [132]. Для определения типа конформации морфолинового кольца (ванна или кресло) была проведена оптимизация структуры путем минимизации энергии модифицированного мононуклеотида методом *ab initio*. Было установлено, что наиболее выгодной является конформацией кресло, что находится в полном соответствии с литературными данными [120]. При этом реализуется $O4'$ -эндо конформация морфолинового кольца. Атом $N1'$ в структуре морфолинового кольца имеет sp^3 гибридизацию, что приводит к возможности реализации двух конформеров для расположения $C6''$ атома относительно морфолинового кольца

(Рисунок 16): gMA^1 - экваториальное, gMA^2 – аксиальное расположение связи. Поскольку энергетический барьер для перехода из одного состояние в другое достаточно высок, было подготовлено по два различных изомера включенных в МД-библиотеки мономеров для внутренних и N-концевого, и один для C-концевого мономера. В соответствии с экспериментальными данными полученными в диссертации и по данным литературных источников [136] концевые мономеры глицин-морфолина должны быть протонированы при $pH=7.2$. Что было учтено при построении мономерных звеньев.

Были созданы библиотеки мономерных звеньев (5 шт.), содержащие информацию о структуре и частичных зарядах атомов. После этого, были созданы структуры тандемных комплексов ДНК глицин-морфолиновых пентаденинов $(gMA_5)_4/(dT_{20})$ и РНК $(gMA_5)_4/(rU_{20})$ трех типов конформеров: полностью gMA^1 или gMA^2 или их смеси $gMA^{1,2}$, в котором два изомера чередуются. Всего 6 модифицированных комплексов. В качестве контрольной модельной системы, позволяющей судить об адекватности проводимых молекулярно-динамических исследований были использованы нативные тандемные комплексы $(dA_5)_4/(dT_{20})$ и $(dA_5)_4/(rU_{20})$. Для комплексов с ДНК была выбрана стартовая форма спирали в виде В-формы, а для комплексов с РНК – А-формы. В первом случае такое предположение о форме спирали является гипотетическим, а во втором случае подтверждается данными КД спектроскопии.

Следующий этап включал в себя непосредственно моделирование методом молекулярной динамики. Он состоял из нескольких шагов, включающих оптимизацию и уравнивание структуры комплекса сначала в неявной, а затем в явной водной оболочке (см. “Материалы и методы”). Основным, наиболее продолжительным этапом, являлось получение продолжительной (1 мкс) молекулярно-динамической траектории.

Предварительные МД моделирования тандемных комплексов глицин-морфолиновых олигомеров показало разрушение этих комплексов после 10-50 нс моделирования. Объяснением этому может быть, как неоптимизованная или вообще нефизичная стартовая структура комплексов и/или несогласованные

параметры силового поля для глицин-морфолиновых аналогов. Экспериментальные данные показывают образование устойчивых комплексов, поэтому при длительном моделировании был наложен дополнительный слабый потенциал на расстояние между атомами, участвующими в образовании водородных связей между гетероциклическими основаниями глицин-морфолиновых производных и нативного протяженного олигонуклеотида. Это было сделано для того, чтобы сохранялась структура межмолекулярного комплекса при неоптимизованной структуре глицин-морфолинового остова. Анализ 1мкс МД-траекторий показывает, что величины энергий, связанные с наложением гармонического потенциала на длину водородной связи малы (~ 5-10 ккал) по сравнению с энергией формирования комплекса (~150 ккал/моль). Таким образом, такие искусственные ограничения незначительно влияют на свойства комплекса при заданном расположении гетероциклических оснований.

Структуру тандемных комплексов характеризовали на основе данных, полученных методом кластерного анализа МД-траекторий. Анализ проводили для структур комплексов, наиболее представленных в МД-траектории по данным кластерного анализа.

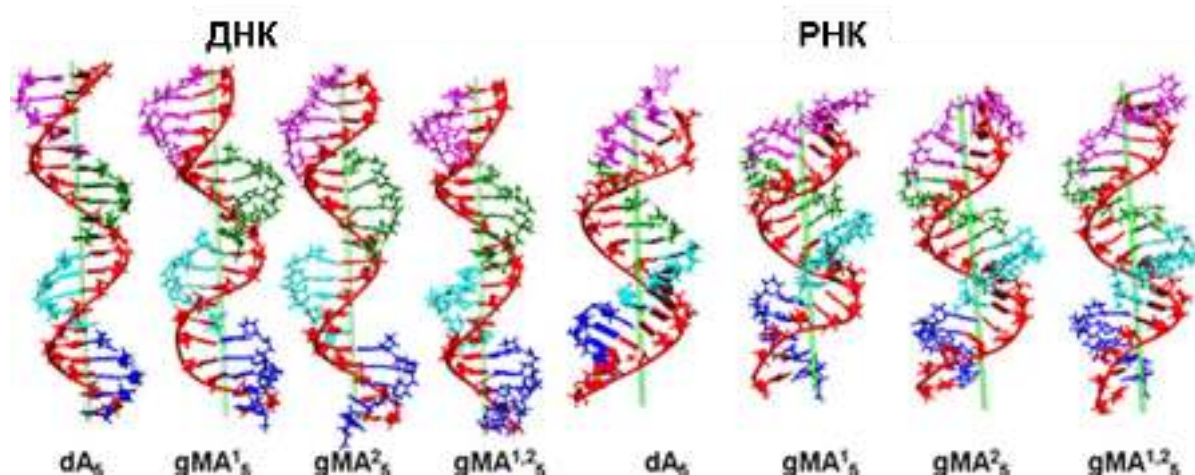


Рисунок 17. Наиболее представленные структуры в МД траекториях.

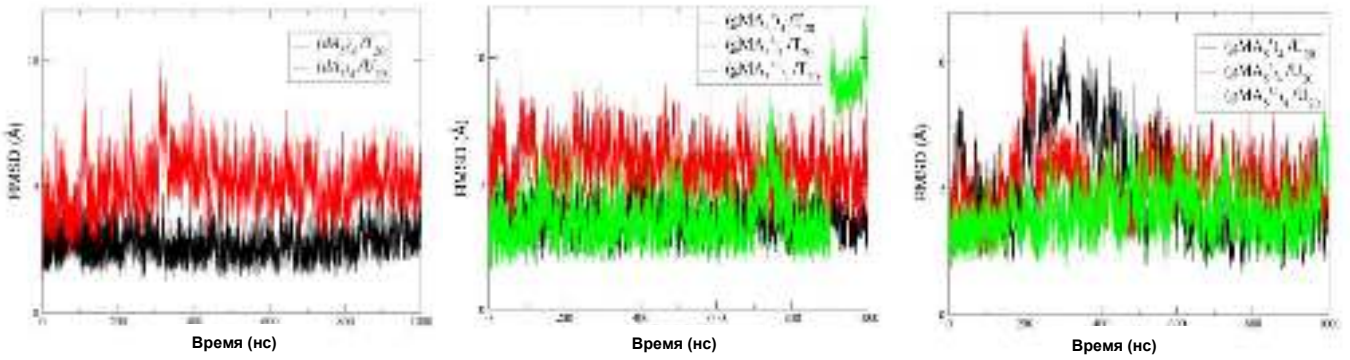


Рисунок 18. Среднеквадратичные отклонения (RMSD) рассчитанные для всех тяжелых атомов вдоль МД траектории.

Во всех исследуемых системах среднеквадратичные отклонения вдоль траектории не показали значимых перестроек (Рисунок 18, Таблица 8). Так, форма спирали у ДНК/РНК тандемного комплекса близка к А-форме двойной спирали с небольшими возмущениями в районе 5' конца РНК. В случае же ДНК/ДНК тандемного комплекса наблюдается структура, являющаяся промежуточной между структурой В-формы и А-трактом [139] в ДНК. В целом, тандемные комплексы глицин-морфолиновых аналогов оказываются более конформационно подвижными в среднем (Таблица 8), чем нативные комплексы.

Величины RMSD указывают на большую конформационную подвижность модифицированных комплексов, что с одной стороны связано с наличием дополнительной связи в остоле, а с другой – с отталкиванием положительных зарядов в местах одноцепочечного разрыва.

Таблица 8. Результаты анализа и разбиения по кластерам для всей МД траектории.

	H-bond restraint penalties ¹ , ккал/моль	Расстояние между концевыми атомами O3'-O5', Å	RMSF, Å	RMSF (gM), Å	RMSF (ДНК и РНК матричные цепи), Å	RMSD, Å	% наиболее представленного в траектории кластера	Средняя дистанция в кластере
$(gMA^1_5)_4/U_{20}$	6.9	54.8	3.66	3.80	3.54	5.1	57%	4.2
$(gMA^2_5)_4/U_{20}$	7	62.3	4.23	4.42	4.06	5.2	80%	4.7
$(gMA^{1.2}_5)_4/U_{20}$	6.3	61.3	3.03	3.15	2.92	4.0	72%	4.0
$(dA_5)_4/U_{20}$		58.2	2.93	2.83	3.04	5.1	93%	4.4
$(gMA^1_5)_4/T_{20}$	8.5	65.0	2.57	2.69	2.46	3.7	80%	3.7
$(gMA^2_5)_4/T_{20}$	6.4	66.9	2.71	2.83	2.60	5.7	74%	3.6
$(gMA^{1.2}_5)_4/T_{20}$	9.9	65.0	3.72	4.06	3.40	4.0	84%	4.1
$(dA_5)_4/T_{20}$		65.2	2.21	2.25	2.17	2.7	90%	3.1

¹Величина значения энергии ограничения на водородные связи

Сопоставление структуры $(dT)_{20}$ цепей в структуре комплексов показывает увеличение их длины для модифицированных тандемных структур за счет большего числа связей в глицин-морфолиновом остове (7 связей) относительно рибозофосфатного (6 связей) (Рисунок 10). Анализ параметров структуры двойных спиралей (Рисунок 17, Таблица 9) для модифицированных комплексов можно провести только для положения пар оснований друг относительно друга и немодифицированной цепи. Геометрии концевых пар (которые расположены на стыке дуплексных структур) для всех модифицированных комплексов отличаются от параметров мономерных звеньев внутри спирали, что может быть связано с тем, что в данных местах происходит “сброс” напряжений структуры, возникающих в данных комплексах за счет наличия дополнительной связи в остове.

Таблица 9. Параметры динуклеотидных пар, рассчитанные для наиболее представленных структур.

Комплекс	Shift, Å	Slide, Å	Rise, Å	Tilt, °	Roll, °	Twist, °	P-P, Å
Без учета концевых пар оснований							
$(dA_5)_4/T_{20}$	-0.3 ± 0.4	-0.8 ± 0.5	3.4 ± 0.3	-0.2 ± 4.4	1 ± 4.4	34.6 ± 3.2	6.9 ± 0.2
$(gMA^2_5)_4/T_{20}$	-0.2 ± 0.5	-0.6 ± 1	3.4 ± 0.4	0 ± 6.4	5.4 ± 6.5	34.6 ± 6.7	6.9 ± 0.4
$(gMA^1_5)_4/T_{20}$	-0.2 ± 0.9	-0.5 ± 0.6	3.3 ± 0.3	0.5 ± 4.3	2.5 ± 5.1	33 ± 5.3	6.9 ± 0.2
$(gMA^{1,2}_5)_4/T_{20}$	-0.3 ± 0.6	-0.5 ± 0.4	3.4 ± 0.3	-0.4 ± 5	0.7 ± 6	35.8 ± 6.8	7 ± 0.2
С учетом концевых пар оснований							
$(dA_5)_4/T_{20}$	0 ± 0.1	-1.1 ± 0.1	3.1 ± 0.5	-3.5 ± 3.8	-4.1 ± 3.9	31.2 ± 4	6.9 ± 0.2
$(gMA^2_5)_4/T_{20}$	-2.3 ± 0.6	-0.3 ± 1	3.5 ± 0.2	3 ± 11.9	-4 ± 7.9	7.2 ± 0.2	7.2 ± 0.2
$(gMA^1_5)_4/T_{20}$	-4.1 ± 0.5	0 ± 0.8	3.8 ± 0.3	-9.2 ± 8.6	3.7 ± 4.3	69.4 ± 0.7	7 ± 0.4
$(gMA^{1,2}_5)_4/T_{20}$	-0.9 ± 0.7	-0.4 ± 0.7	3.3 ± 0.2	-0.1 ± 3.1	2.3 ± 2.6	7 ± 0.1	7 ± 0.1
Без учета концевых пар оснований							
$(dA_5)_4/U_{20}$	0.1 ± 0.5	-1.6 ± 0.5	3.2 ± 0.5	-2.7 ± 9.1	9.9 ± 7.5	31.7 ± 10.8	6.1 ± 0.2
$(gMA^2_5)_4/U_{20}$	-0.3 ± 0.6	-1.1 ± 0.9	3.4 ± 0.6	-0.1 ± 6.6	14.3 ± 8.2	31.2 ± 7.5	6 ± 0.5
$(gMA^1_5)_4/U_{20}$	-0.6 ± 0.9	-1.2 ± 0.7	3.4 ± 0.5	-3.2 ± 3.5	11.8 ± 5.4	30.1 ± 9.1	6.1 ± 0.6
$(gMA^{1,2}_5)_4/U_{20}$	-0.3 ± 0.6	-0.8 ± 1	3.4 ± 0.5	-1.9 ± 7.6	12.1 ± 8.4	32.4 ± 7.9	6.1 ± 0.4
С учетом концевых пар оснований							
$(dA_5)_4/U_{20}$	1.8 ± 1	-2.5 ± 0.8	3.5 ± 0.5	-5.6 ± 10.2	7.3 ± 10.1	-3.8 ± 11.7	6.3 ± 0.2
$(gMA^2_5)_4/U_{20}$	0.2 ± 0.7	-1.3 ± 0.3	3.8 ± 0	0.8 ± 10	11.4 ± 14.3	26.7 ± 16	6.6 ± 0.4
$(gMA^1_5)_4/U_{20}$	-0.1 ± 0.4	-1.4 ± 0.5	3.2 ± 0.2	-4.1 ± 2.8	8.7 ± 3.1	29.6 ± 1.8	6.4 ± 0.3
$(gMA^{1,2}_5)_4/U_{20}$	-0.5 ± 0.9	-1.8 ± 1.1	3.2 ± 0.3	4.4 ± 4.9	1.9 ± 6.2	30.2 ± 7.1	6.6 ± 0.6
Для сопоставления							
А-тракт	0.0	-0.9	3.1	-1.3	-0.8	36.7	6.8
В форма	0.0	-0.2	3.4	0.0	-2.8	35.9	6.5
А форма	0.0	-1.8	3.4	-0.1	8.9	31.5	5.7

Значения расстояний между атомами фосфора (P-P) для цепи $(dT)_{20}$ близки к таковому для А-тракта ДНК во всех комплексах, том числе и образованных с участием морфолиновых производных, а в случае (rU_{20}) к значениям для А-формы. Длины ДНК цепи в нативном и модифицированных комплексах, рассчитанная как расстояние между O3' и O5' атомами в концевых нуклеотидах, были близки между собой. В случае же РНК цепи прослеживается некая разница, так в $(gMA^1_5)_4/U_{20}$ - это значение на 3.4 Å короче, чем в нативном тандемном комплексе, а в случае двух других – примерно на 5% длиннее.

Одновременно с этим, геометрия концевых пар в комплексах глицин-морфолиновых олигомеров значительно отличается от внутренних. Их рассмотрение является в значительной степени не целесообразным за счет высокой конформационной подвижности, поэтому в таблице структурных параметров приведены средние значения с учетом и без учета концевых пар.

Анализ структуры комплексов в местах одноцепочечного разрыва показывал значительное снижение перекрывания гетероциклических оснований. Такое разрушение стэкинга на стыке дуплексных структур связано, главным образом, с расталкиванием двух положительно заряженных концов морфолиновых олигомеров и притяжением положительно заряженных первичной и вторичной аминогрупп к отрицательно заряженным остаткам фосфорной кислоты в малой бороздке (причем это более выражено в комплексах с ДНК, нежели с РНК).

В комплексах глицин-морфолинов с ДНК это приводит к значительному снижению стэкинга в местах одноцепочечного разрыва по сравнению с ДНК/ДНК и gMO/РНК. Эти отличия коррелирует со значениями энтальпии кооперативного контакта, определенными экспериментально.

Таким образом, структурные особенности модифицированных комплексов относительно нативных отличаются незначительно в случае внутренних пар оснований, а в случае концевых эти отклонения более значимы на стыке дуплексных структур. Геометрии нативных цепей практически не изменяются в модифицированных комплексах. В то же самое время наличие напряжений в остоле глицин-морфолиновых производных приводит к наращению регулярной

структуры, что более заметно в комплексах с ДНК, в то время, как в комплексах с РНК это выражено в меньшей степени.

3.2.4.2. Сольватационные особенности тандемных комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК

Особенности сольватации новых производных НК являются важной характеристикой и должны учитываться при их рациональном дизайне. Так, термическая стабильность двойной спирали включает в себя значительный вклад от сольватации НК. Для всех исследованных комплексов были проанализированы особенности гидратации и взаимодействия с катионами, построены карты плотности распределения молекул воды и ионов вокруг них (Рисунки 19 и 20). Анализ карт плотности распределения водного окружения для всех четырех комплексов выявил более выраженную водную оболочку у нативных комплексов, по сравнению с модифицированными, что скорее всего вызвано меньшей напряженностью электрического поля в малой бороздке модифицированных комплексов.

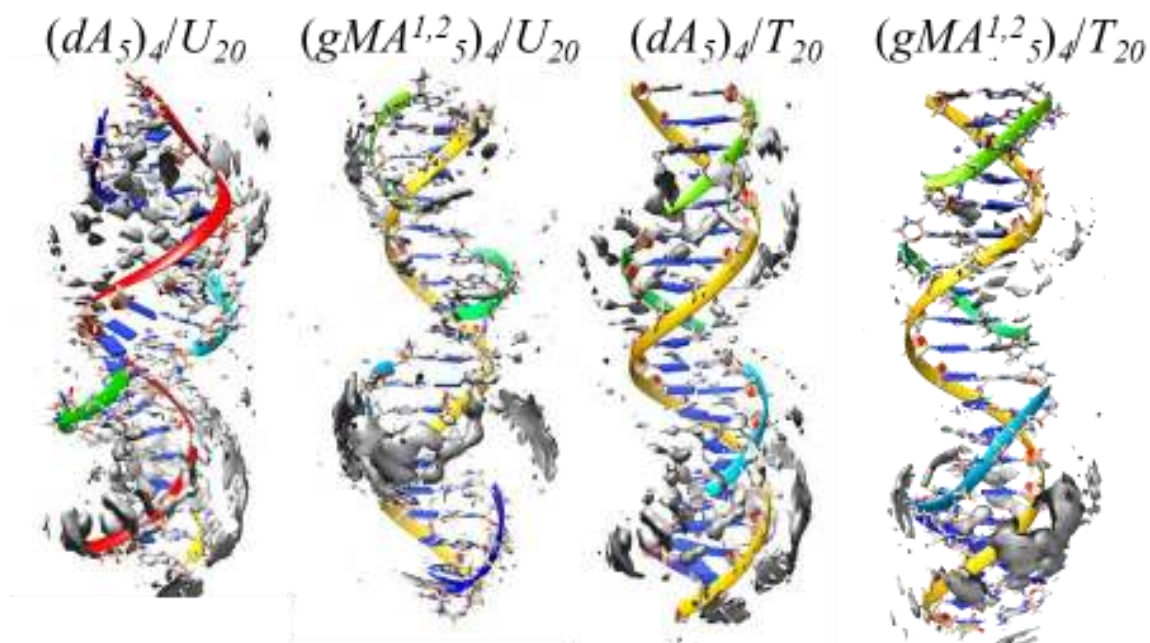


Рисунок 19. Карты плотности воды (атомов кислорода в молекуле воды) относительно средней структуры комплекса усреднённые по 1 мкс траектории.

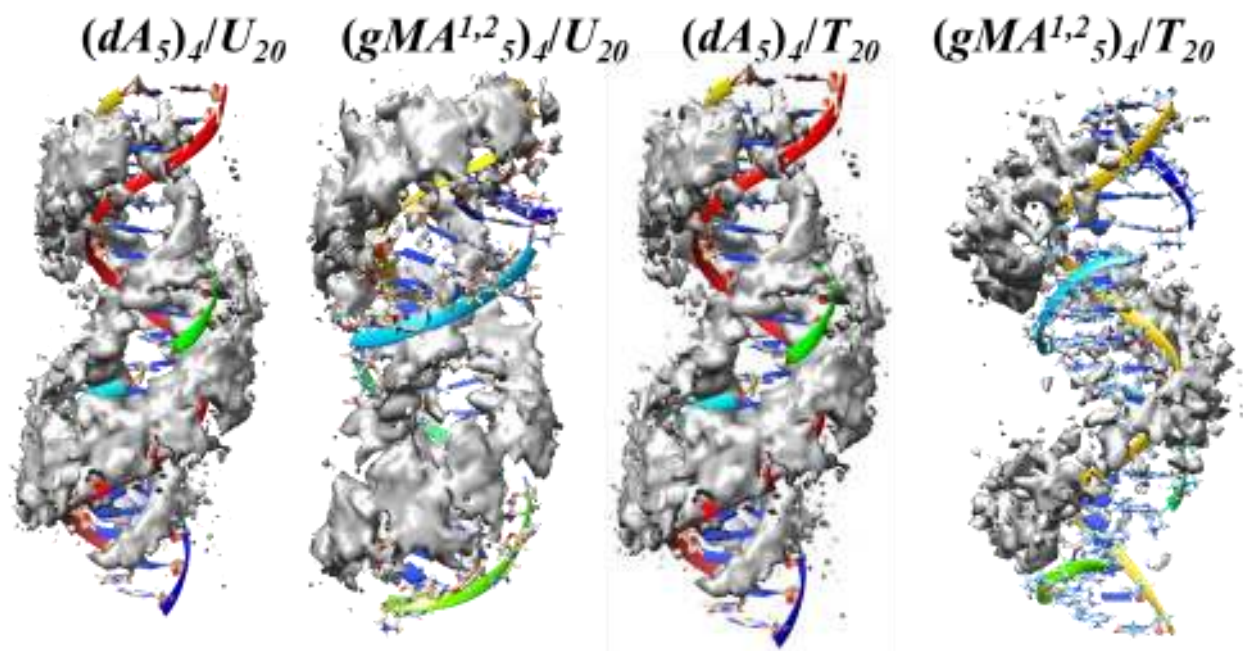


Рисунок 20. Карты плотности ионов натрия относительно средней структуры комплекса усреднённые по 1 мкс траектории.

Гидратных “хребет” в случае комплексов с РНК более выражен, чем в случае с ДНК. Анализ показал, что количество сильно связанных молекул воды в большой и малой бороздке значительно снижено в случае модифицированных комплексов.

3.2.5. Изучение физико-химических свойств комплексов гетеронуклеотидных глицин-морфолиновых олигомеров с ДНК и РНК

Для дальнейшего изучения физико-химических свойств глицин-морфолиновых олигомеров и их комплексов было решено перейти от «гомонуклеотидных» последовательностей к олигомерам, содержащие различные гетероциклические основания. Это, во-первых, позволит перейти от модельных систем, к системам, которые могут иметь практическое значение, а во-вторых предположительно позволит избежать дополнительных экспериментальных сложностей при проведении физико-химических исследований.

На первом этапе в качестве логичного продолжения для исследования был выбран пентамер глицин-морфолина со следующей последовательностью $gM(AAACA)$ и его тандемный комплекс с ДНК

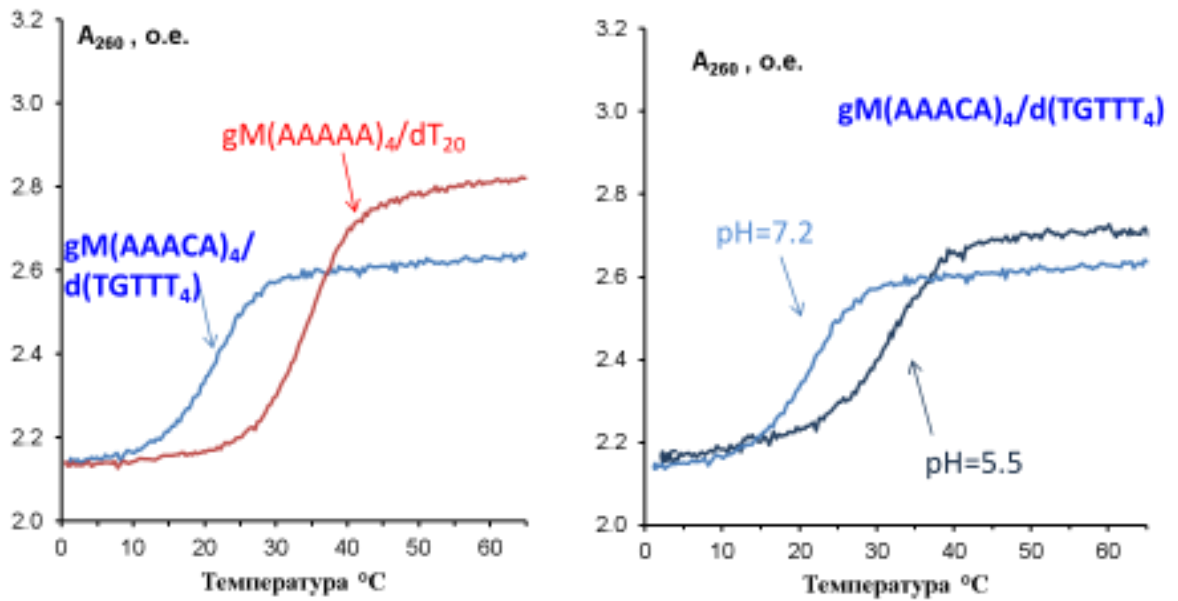


Рисунок 21. Кривые термической денатурации для $gM(AAACA)_4/d(TGTTT)_{20}$ в сравнении с $(gMA_5)_4/d(T_{20})$ (слева) и при различных значениях pH (справа).

$gM(AAACA)_4/d(TGTTT)_{20}$. Температура плавления такого тандемного комплекса при нейтральном значении pH=7.2 и 1M NaCl была на 13 °C ниже температуры плавления для комплекса $(gMA_5)_4/d(T_{20})$ (Рисунок 21). Снижение pH раствора до 5.5, которое должно привести к увеличению заряда глицин-морфолинового олигомера приводит к увеличению термической стабильности.

В развитие этого, в качестве модельной системы был выбран десятизвенный глицин-морфолиновый олигомер $gM(CAGCGGCGTG)$ и его комплексы с комплементарными ДНК $d(CACGCCGCTG)$ и РНК $r(CACGCCGCUG)$ (теоретически образующие антипараллельный дуплекс) и с ДНК $d(GTCGCCGCAC)$ (теоретически образующий параллельный комплекс). При помощи метода термической денатурации с оптической регистрацией, спектроскопии кругового дихроизма и флуоресцентной спектроскопии с интеркаляцией бромистого этидия было показано, что данный декамер глицин-морфолина не образует ни параллельный ни антипараллельный комплекс с комплементарными ДНК и РНК.

Поэтому было выбрано 7-ми звенный олигомер $gM(CCAACA)$. Для него при помощи метода термической денатурации и при помощи флуоресцентной

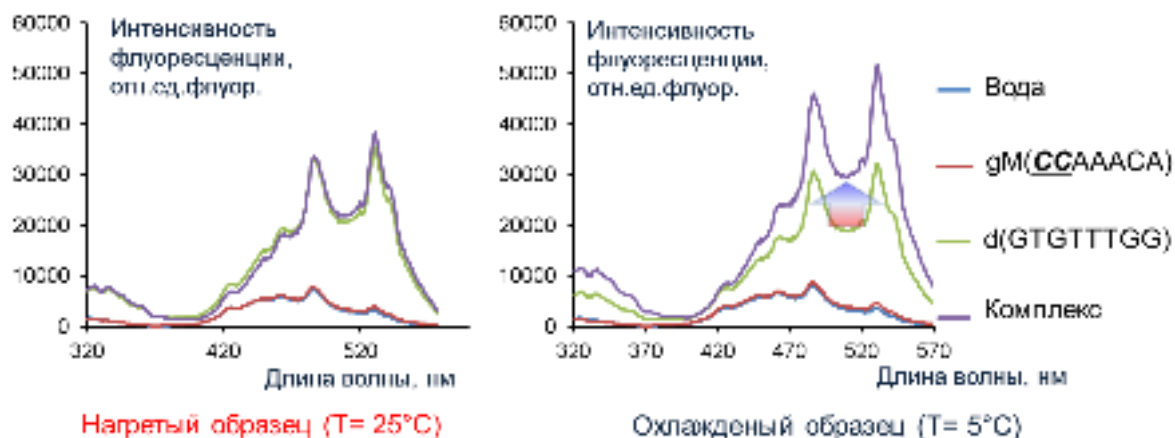


Рисунок 22. Спектры флуоресценции для одиночных олигомеров и для их смеси при низкой и комнатной температуре в присутствии бромистого этидия.

спектроскопии (Рисунок 22) было показано, что он может образовывать комплекс с комплементарной ДНК цепью с одиночным нависанием (такая структура комплекса была выбрана для увеличения термостабильности данного комплекса). Отсутствие низкотемпературной базовой линии у кривой термической денатурации не позволило определить термодинамические параметры комплексообразования, температура плавления данного комплекса составляет ~ 15 °С.

Как было показано ранее, термостабильность комплексов глицин-морфолиновых олигомеров с РНК выше, нежели с ДНК. Таким образом, для дальнейших исследований выбраны: дуплекс $gM(CCAAACA)$ с РНК олигонуклеотидом $r(UGUUUGG)$ и тандемный комплекс $gM(CCAAACA)$ с РНК олигонуклеотидом $r(UGUUUGGUGUUUGG)$. Температура плавления для дуплекса была ниже 5 °С, чем для тандемного, для при концентрации на нуклеотид 1×10^{-4} она составляла ~ 20 °С при условиях 1 М NaCl и 10 mM NaCac, pH 7.2. Снижение ионной силы до 10 mM приводит к незначительному повышению температуры плавления у тандемного комплекса до ~ 25 °С. Установлено, что при формировании комплекса в концентрации 100 мкМ он выпадает в осадок и проведение исследований при концентрациях, требуемых в структурном ЯМР ($\sim 10^{-3}$ М) невозможно. Кроме того, было установлено, что замена какодилатного буфера на фосфатный приводит к выпадению олигомера в

нерастворимый осадок. Варьирование значений рН (от кислых до щелочных), при которых РНК цепь не деградирует, а также изменение ионной силы раствора и добавление спиртов не влияют на факт выпадения осадка.

Таким образом, дальнейшее исследование, а также использование данных глицин-морфолиновых аналогов при решении практических задач представляется не перспективным для приложений, в которых необходимо использовать протяженные олигомеры.

3.3. Изучение физико-химических свойств фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с ДНК

3.3.1. Модельные системы ФГО

Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) - незаряженные производные нуклеиновых кислот, показывают себя как перспективные соединения для различных приложений [22,23,140]. В данных соединениях один из немостиговых атомов кислорода в остатке фосфорной кислоты нуклеотида замещен на гуанидиновое производное, в данной работе на 1,3-диметилимидазолидин-2-имин (Рисунок 23).

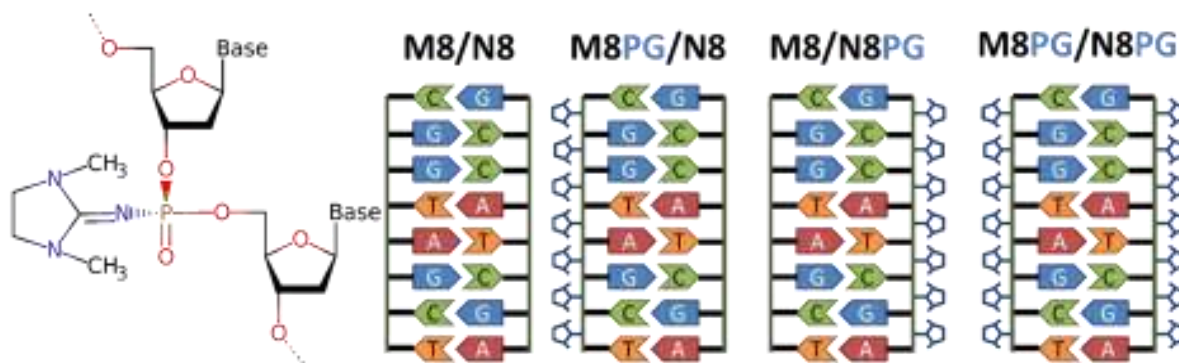


Рисунок 23. Структура Rp- диастереомера модифицированного фрагмента ДНК, содержащего 1,3-диметилимидазолидин-2-иминный заместитель (слева). Пример набора нативного и ФГ-содержащих комплексов восьмизвенных олигонуклеотидов, использованных в исследовании (справа).

Детальное исследование физико-химических свойств ФГ-содержащих олигонуклеотидов и их комплексов позволит понять структурно-функциональные свойства данных соединений и разработать подходы для прогностического расчета их свойств. На момент начала проведения данного исследования детального изучения физико-химических свойств ФГО не было проведено.

Были выбраны последовательности олигодезоксирибонуклеотидов и их полностью модифицированных аналогов для проведения сравнительных исследований структуры и гибридизационных свойств ФГО. Полностью модифицированные аналоги были выбраны ввиду того, что для таких олигомеров

в максимальной степени должны проявляться эффекты, связанные с замещением одного из немостиковых кислородов фосфатных остатков на ФГ группу (DMI). В качестве базовой модели выбраны ДНК-дуплексы, состоящих из 8, 10 или 12 пар оснований с различными последовательностями и GC-составом. Размер комплексов обусловлен тем, что процесс формирования таких ДНК/ДНК, ДНК/РНК и РНК/РНК дуплексов практически всегда может быть описан в рамках модели двух состояний [63,117]. Это позволяет достоверно определить значения термодинамических параметров формирования комплексов экспериментальными методами и на основании этих данных разработать модели прогностического расчета гибридизационных свойств олигонуклеотидов, в том числе, модифицированных [например, [70,76,77]]. Для достоверного определения термодинамических параметров методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала при различных ионных силах раствора такие комплексы должны обладать достаточно высокой термической стабильностью, чтобы даже при низкой ионной силе можно было анализировать кривые термической денатурации и получать достоверные значения термодинамических параметров комплексообразования. С другой стороны, олигонуклеотиды не должны формировать дополнительных вторичных структур (шпилечных, самокомплементарных структур, комплексов с выпетливаниями, с одноцепочечными нависаниями и т.д.). Наличие таких комплексов существенно затрудняет или делает невозможным получение величин термодинамических параметров образования НК-дуплексов [129].

При дизайне модельных комплексов прогностический расчет гибридизационных свойств ДНК/ДНК дуплексов проводили с использованием данных из модели ближайших соседей для ДНК дуплексов [73]. Анализ образования внутри- и межмолекулярных комплексов самими олигомерами осуществляли, используя специализированные онлайн ресурсы для проверки существования у выбираемых олигонуклеотидов нежелательных вторичных структур Mfold [141] и Oligocalc [142]. Предполагается, что для предсказания гибридизационных свойств ФГО, как и для ряда модифицированных олигомеров,

таких как замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA), петирил нуклеиновые кислоты (PNA), дезоксиинозин, мостиковые олигонуклеотиды, применима модель ближайших соседей, предполагающая аддитивный вклад в энергию комплексообразования вкладов от отдельных динуклеотидных шагов [31,32,73,149]. Поэтому при создании набора олигонуклеотидов учитывали встречаемость всех 16 возможных динуклеотидных пар во всех возможных формируемых ФГО/ДНК комплексах. Нуклеотидные последовательности выбранных олигодезоксирибонуклеотидов представлены в Таблице 10. ФГО с теми же нуклеотидными последовательностями содержали 1,3-диметилимидазолидин-2-иминные (DMI) заместители во всех межнуклеозидных фосфатных остатках.

Таблица 10. Нуклеотидные последовательности олигомеров, выбранных для проведения исследований

№ПП	Последовательность 5' -> 3'	№ПП	Комплементарная последовательность 5' -> 3'
1	TCCAGCTA	2	TAGCTGGA
3	TAACGGAG	4	CTCCGTTA
5	TGGCAAGA	6	TCTTGCCA
7	CGAACTTATG	8	CATAAGTTCG
9	CGGTAGCT	10	AGCTACCG
11	GCAAGTTATC	12	GATAACTTGC
13	CTAAGCATGG	14	CCATGCTTAG
15	TAGCTTTGAATC	16	GATTCAAAGCTA
17	AGCCATTCTG	18	CAGAATGGCT
19	TACGTTTCAATG	20	CATTGAAACGTA
21	AGTTCATGCC	22	GGCATGAACT
23	TGAATCCACG	24	CGTGGATTCA
25	GCTTAGTCAAGA	26	TCTTGACTAAGC
27	ACGGTAGCTT	28	AAGCTACCGT
29	ACCTGGCG	30	CGCCAGGT
31	TCCACGGTAG	32	CTACCGTGGA
33	ATCCGACTGG	34	CCAGTCGGAT
35	GCAATGACTTGT	36	ACAAGTCATTGC
37	ATCCAGGCGT	38	ACGCCTGGAT
39	GATCGGGTAAGC	40	GCTTACCCGATC
41	CGATCCCAGGCT	42	AGCCTGGGATCG

Представленность каждого динуклеотидного ФГ/ДНК шага для возможных ДНК/ФГО и ФГО/ДНК дуплексов была не менее 19 раз. Это должно обеспечить высокую статистическую представленность динуклеотидов при применении модели ближайших соседей при анализе физико-химических свойств ФГО и их комплексов.

Выбранные 42 нативных олигодезоксирибонуклеотида и их 42 полностью модифицированных ФГ аналога были синтезированы методом твердофазного фосфитамидного синтеза, выделены методом обращено-фазовой ВЭЖХ и их чистота охарактеризована методами гель-электрофореза для всех нативных олигомеров и методом масс-спектрометрии для ряда модифицированных.

Далее будут использованы следующие обозначения для наборов одноцепочечных олигонуклеотидов, для которых наиболее детально изучены свойства: для нативных олигмеров № 9 и 10 (Таблица 10) - M8 и N8, и M8PG и N8PG для их ФГ-аналогов; № 15 и 16 - M10 и N10, M10PG и N10PG; № 35 и 36 - M12 и N12, M12PG и N12PG.

3.3.2. Определение влияния ФГ групп на спектры поглощения в УФ

При проведении достоверного анализа физико-химических свойств ФГО важно знать и уметь определять точную концентрацию олигонуклеотидов. Обычно, для рутинного определения концентрации олигонуклеотидов используют спектрофотометрический метод, который является быстрым и достаточно достоверным.

Были изучены спектральные свойства всех синтезированных олигонуклеотидов в УФ-области спектра. Спектры поглощения записывали в диапазоне длин волн 200-330 нм при комнатной (25 °С) и высокой (90 °С) температурах в водном растворе (деионизованная MilliQ вода). Высокая температура была выбрана, потому что как для ДНК, так и для ФГО можно ожидать, что при 90 °С будет полностью нарушен одноцепочечный стэкинг или какое-либо дополнительное структурирование. Следовательно, концентрацию

можно определять, используя закон Бугера-Ламбарта-Бера измеряя оптическое поглощение водного раствора олигонуклеотидов при 90 °С и используя коэффициенты экстинкции на длине волны 260 нм для ДНК [143].

Проведенный спектральный анализ для всех олигомеров показал, 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 [144] (Рисунки 24 и 25). Эти наблюдения согласуются с ранее установленными закономерностями для частично модифицированных олигонуклеотидов [19].

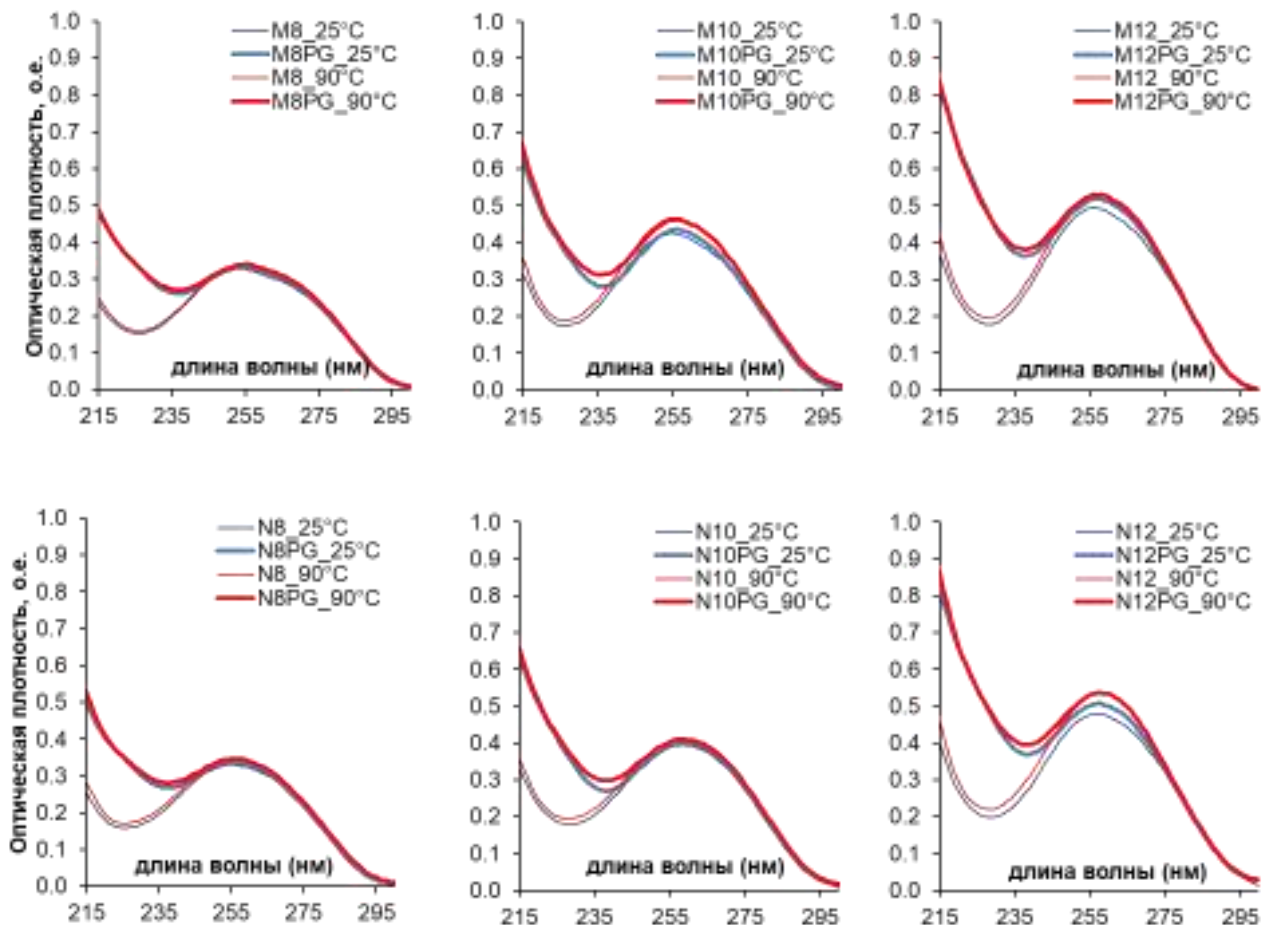


Рисунок 24. Типичные УФ спектры нативных (тонкие линии) и ФГ (жирные линии) олигонуклеотидов при высокой (90 °С, обозначены красным цветом) и комнатной температурах (25 °С, обозначены синим цветом). Кривые нормализованы на концентрацию 1 мМ и длину оптического пути 1 см.

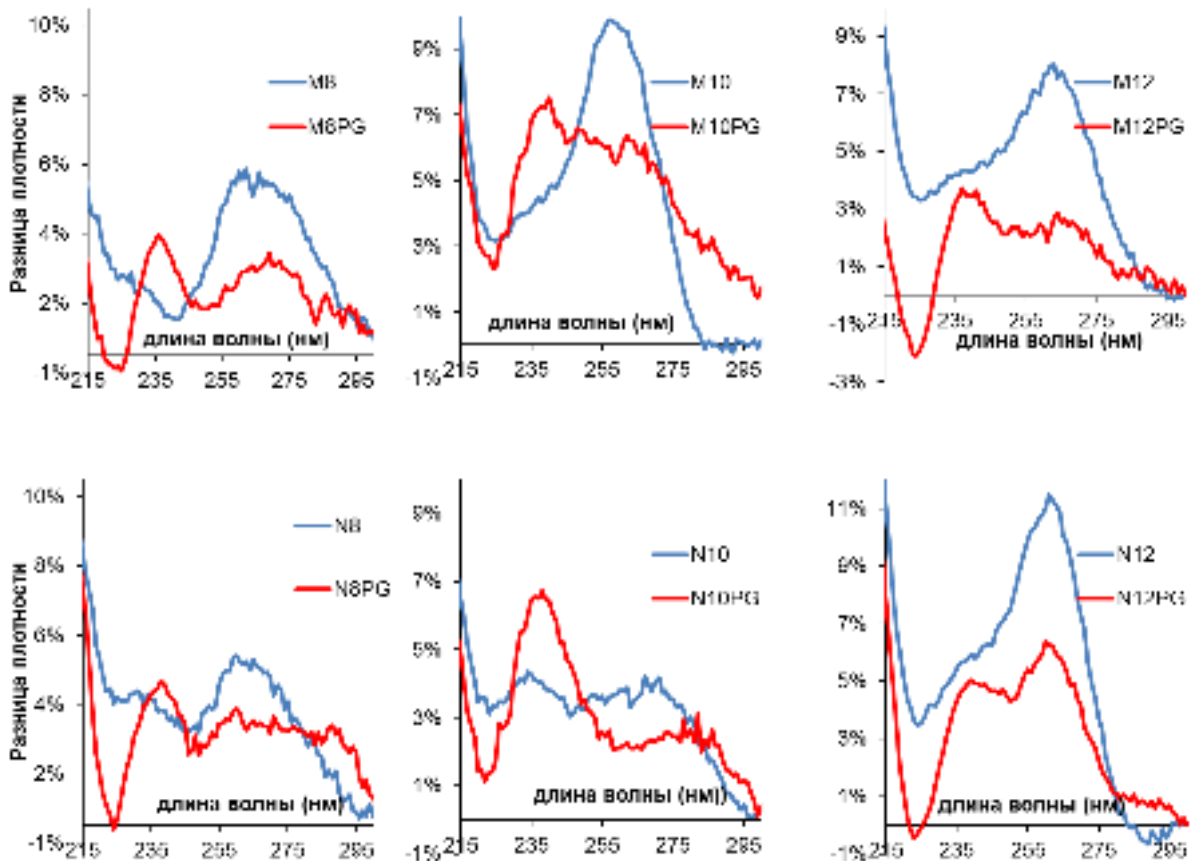


Рисунок 25. Примеры разницы УФ спектров, записанных при высокой (90 °С) и комнатной (25 °С) температурах для нативных (обозначены синим цветом) и модифицированных (обозначены красным цветом) олигонуклеотидов.

Более детальный анализ показывает, что разница в спектрах поглощения полученных при 25 и 90 °С в среднем составляет около 4% на длине волны 260 нм для ФГ олигомеров. Данная разница для нативных олигонуклеотидов выше примерно в два раза и составляет ~8% (Рисунок 25). Данное наблюдение, вероятно, связано с большим структурированием одноцепочечного состояния нативных олигомеров, нежели модифицированных.

Учет расширения воды при нагреве от 25 до 90 °С, которое составляет примерно 3.4 % [145], приводит к увеличению значения гиперхромного эффекта для исследованных систем (Рисунок 26).

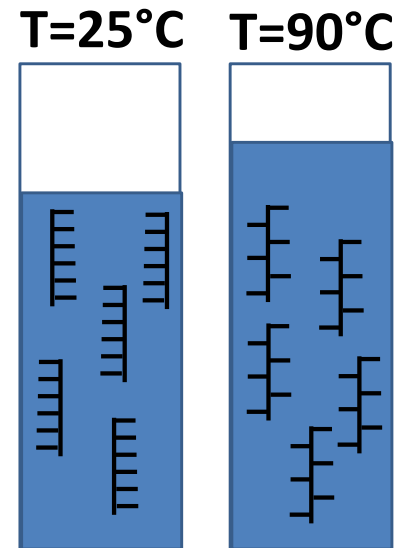


Рисунок 26. Схематичное изображение одноцепочечных олигонуклеотидов в кювете при высокой и низкой температуре с учетом теплового расширения воды и разрушения одноцепочечного стэкинга.

Такой учет дает одинаковые концентрации нативных олигонуклеотидов при использовании коэффициентов экстинкции для низких и высоких температур. В связи с разной величиной гипохромного эффекта наибольшую точность должно давать использование коэффициентов молярной экстинкции и измерение оптического поглощения при 90 °С (дополнительно см. раздел 3.3.3.1).

3.3.3. Изучение модельной системы окта-, дека- и додекамерных дуплексов

3.3.3.1. Исследование структуры ФГО и их комплексов методом кругового дихроизма

Детальные исследования структуры и гибридизационных свойств проведены с использованием модельных комплексов длиной 8, 10 и 12 пар оснований. Модельные комплексы олигонуклеотидов (ДНК/ДНК, ДНК/ФГО, ФГО/ДНК и ФГО/ФГО) длиной 8 пар оснований M8/N8, M8/N8PG, M8PG/N8, M8PG/N8PG (Рисунок 23) с долей G/C пар оснований 62.5 %, комплексы олигонуклеотидов длиной 10 пар оснований M10/N10, M10/N10PG, M10PG/N10, M10PG/N10PG с долей G/C пар - 50 % и длиной 12 пар оснований M12/N12, M12/N12PG, M12PG/N12, M12PG/N12PG и долей G/C пар - 41.7 %.

Структура выбранного набора одноцепочечных окта-, дека- и додекануклеотидов и их комплексов охарактеризована методом кругового дихроизма в диапазоне температур 5 – 90 °С (Рисунок 27).

Стоит отметить, что амплитуда сигнала КД при низкой температуре выше в случае нативных одноцепочечных олигонуклеотидов (за исключением олигонуклеотида M8). Это свидетельствует о меньшей структурированности ФГО, а, следовательно, и меньшей эффективности формирования внутримолекулярных структур. Совпадение спектров нативных и модифицированных олигонуклеотидов при высокой температуре в диапазоне от 260 до 330 свидетельствует об одинаковой разупорядоченности одноцепочечных состояний и является еще

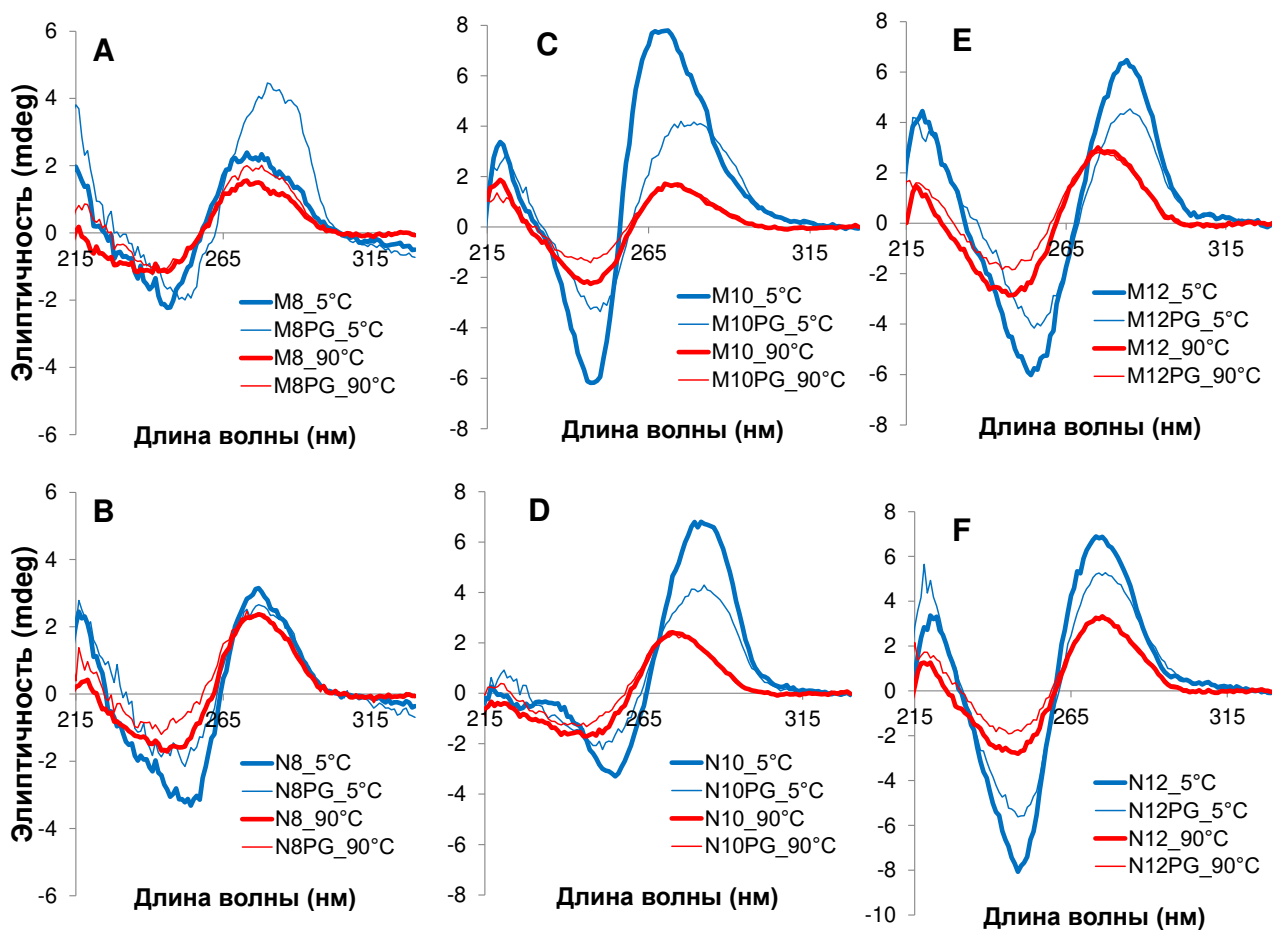


Рисунок 27. Сравнение спектров кругового дихроизма одноцепочечных нативных олигонуклеотидов (тонкие линии) и ФГО (толстые линии) при 5 °С (синие линии) и 90 °С (красные линии). Спектры записывали в буфере, содержащем 10 мМ какодилат натрия и 1 М NaCl (рН 7.2), концентрация олигонуклеотидов 5 мкМ.

одним подтверждением выбранной стратегии для расчета концентраций олигонуклеотидов.

Сопоставление спектров смеси олигонуклеотидов и суммы спектров отдельных олигонуклеотидов показывает, что при 90 °С они совпадают, а при 5 °С - амплитуды сигналов на длинах волн 250 и 270 нм в случае смеси значительно выше, чем в случае суммы спектров (данные не приведены). Это свидетельствует о формировании межмолекулярных комплексов олигонуклеотидов [146]. Сопоставление спектров смеси олигонуклеотидов 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 (Рисунок 28). Они типичны для В-формы двойной спирали ДНК [146].

Было показано снижение амплитуд сигнала КД основных максимумов полос на 250 и 270 нм для всех комплексов исследованной серии при увеличении температуры (например, для декануклеотидных комплексов, Рисунок 29). Температуры плавления, определенные в температурных сериях КД, совпадают с

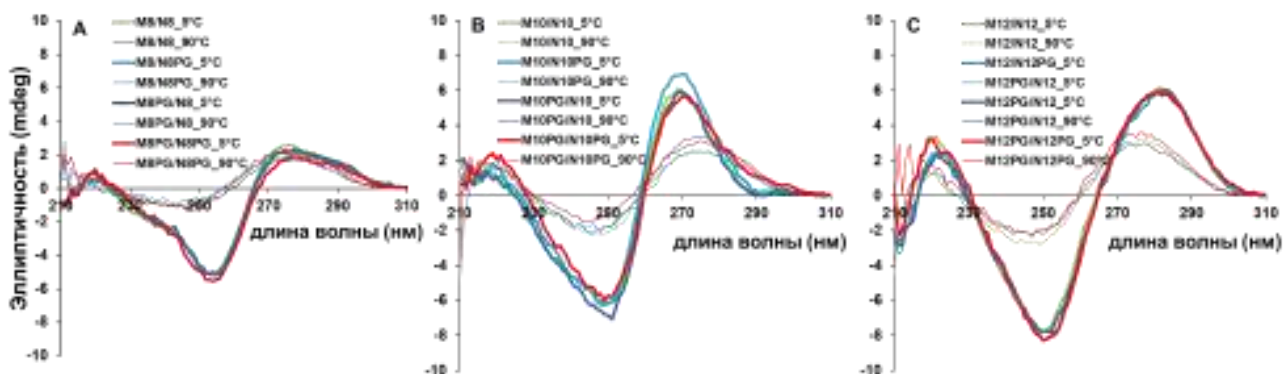


Рисунок 28. Спектры КД окта- (А), дека- (В) и (С) додекамерных комплексов различных типов (ДНК/ДНК, ФГО/ДНК, ДНК/ФГО и ФГО/ФГО) при низкой (5 °С) и высокой (90 °С) температурах. Концентрация олигонуклеотидов 10 мкМ, буфер - 1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия рН 7.2.

температурами плавления, определенными при помощи метода термической денатурации с оптической регистрацией сигнала (см. ниже). В стандартных буферных условиях (1 М NaCl, 10 мМ какодилат натрия рН 7.2)

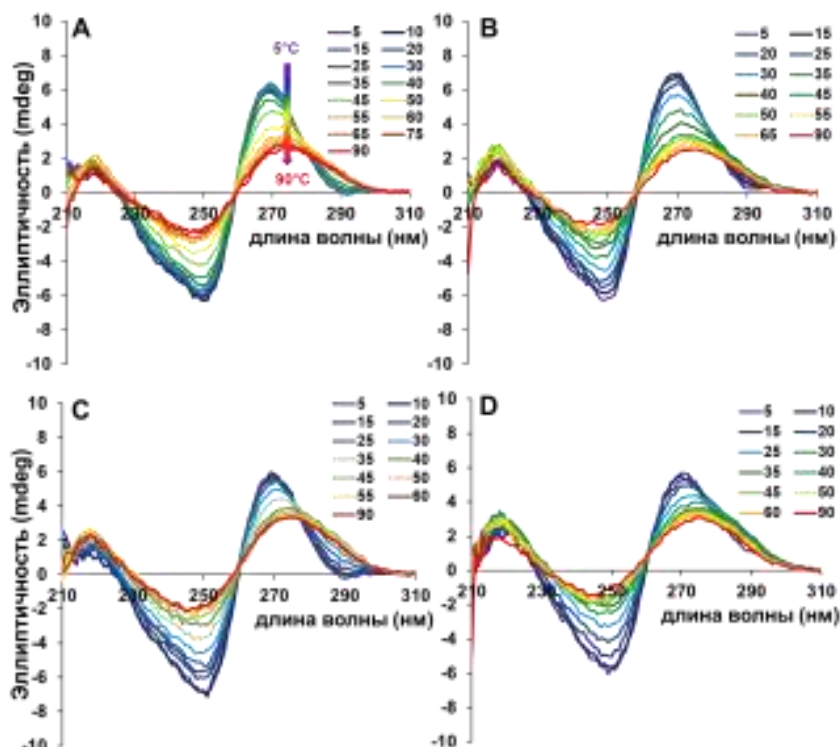


Рисунок 29. Температурная зависимость КД спектров декамерных комплексов: (А) ДНК/ДНК, (В) ДНК/ФГО, (С) ФГО/ДНК и (D) ФГО/ФГО) в интервале 5–90 °С.

термостабильность различных комплексов может быть выстроена в порядке: ДНК/ДНК > ДНК/ФГО \approx ФГО/ДНК > ФГО/ФГО. Наличие точек изоэллиптичности для всех комплексов свидетельствует о формировании комплексов в приближении модели двух состояний («все-или-ничего»), предполагающей наличие только дуплекса и одноцепочечного состояния [147].

3.3.3.2. Исследование гибридизационных свойств ФГО на примере модельных окта-, дека- и додекамерных дуплексов

Для определения применимости модели двух состояний к описанию образования комплексов ФГО и выяснения влияния ионной силы на их гибридизационные свойства проведено исследование методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала для набора окта-, дека- и додекамерных дуплексов. Подробный анализ гибридизационных свойств олигомеров фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов проводили в стандартных условиях. Типичные кривые термической денатурации дуплексов приведены на Рисунке 30.

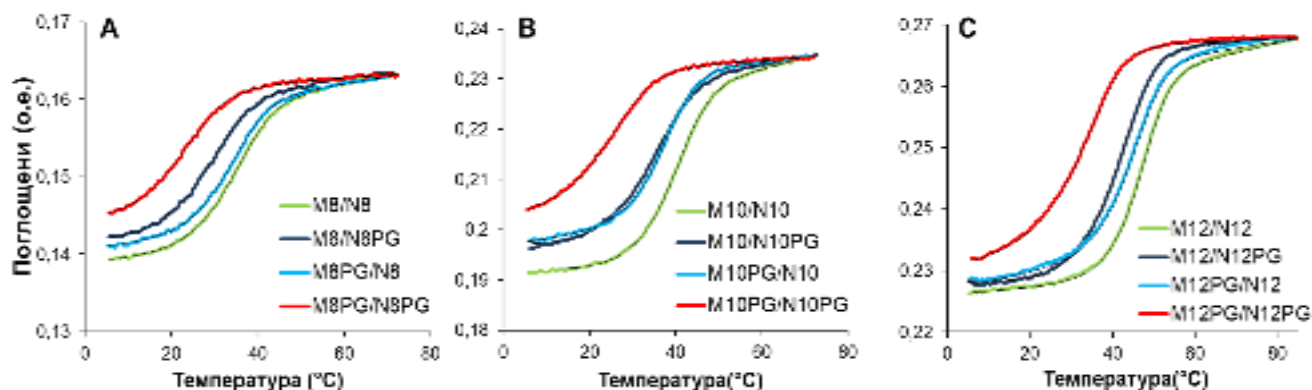


Рисунок 30. Экспериментальные кривые термической денатурации в УФ области спектра (толстые цветные линии) и теоретические кривые (тонкие линии черного цвета), рассчитанные в соответствии с моделью с двух состояний для дуплексов (А) окта-, (В) дека- и (С) додекамеров. Длина волны 260 нм, буферные условия 1 М NaCl и 10 мМ NaCac, pH 7.2. Полная концентрация олигонуклеотидов 10 мкМ.

Все комплексы (ДНК/ДНК, ФГО/ДНК, ДНК/ФГО и ФГО/ФГО) имеют профили денатурации сигмоидальной формы с одним переходом, что типично для коротких ДНК дуплексов, образование и денатурация которых может быть описана в рамках модели двух состояний. Из представленных на (Рисунок 30) данных видно, что значения величин гипохромного эффекта снижаются в

следующем порядке: ДНК/ДНК > ДНК/ФГО \approx ФГО/ДНК > ФГО/ФГО. Разница между дуплексами ДНК/ДНК и ФГО/ФГО составляет до 30%. Похожие эффекты снижения величины гипохромного эффекта при замещении немостиного кислорода наблюдаются в случае его замены на серу или борановую группу [148]. Отсутствие оптического поглощения ФГ групп при 260 нм [144] и сходство оптического поглощения нативных и модифицированных олигомеров указывают на различия, связанные с взаимодействием азотистых оснований в комплексах. Напротив, данные КД-спектроскопии показали очень близкие между собой вторичные структуры нативных и модифицированных дуплексов. Это означает, что наблюдаемая разница в гипохромном эффекте не связана напрямую со структурными изменениями в двойной спирали. Аналогичное наблюдение было обнаружено ранее: изменения в химической структуре рибозофосфатного остова могут изменять вторичную структуру дуплекса и величину гипохромного эффекта, например, для нейлоновых (nylon) нуклеиновых кислот [64], гликолиевых (glycol) нуклеиновых кислот (GNA) [149] или в изученных нами ранее олигомерах с морфолин метилкарбоксамидным (глициновым) остовом [150] в комплексах с ДНК. Отметим, что не всегда изменение вторичной структуры, даже значимое, находит отражение в изменении оптического поглощения. Например, возможна ситуация, когда наблюдается термическая денатурация шпильчатых структур ДНК методом КД спектроскопии, но в то же время, изменений в оптическом поглощении не происходит [151]. Возможные причины наблюдаемого нами эффекта заключаются в увеличенной подвижности ФГО-содержащих дуплексов, взаимодействии ФГ-групп с азотистыми основаниями или в измененной сольватации азотистых оснований.

Для доказательства применимости модели двух состояний, при описании температурной денатурации комплексов ФГО проведено их исследование методом термической денатурации при различных концентрациях олигонуклеотидов в растворе. Совокупность выполнения следующих критериев подтверждает данное приближение. (i) Кривые термической денатурации и ренатурации совпадали. Это подтверждает термодинамическое равновесие между одно- и двухцепочечными

нуклеиновыми кислотами при каждой исследованной температуре. (ii) Кривые УФ-плавлений совпадали с переходами, наблюдаемым в температурных сериях КД спектров на длине волны 250 нм. (iii) Кривые термической денатурации всех типов комплексов (ДНК/ДНК, ФГО/ДНК, ДНК/ФГО и ФГО/ФГО) различной длины (8, 10 и 12 п.н.) хорошо описываются теоретическими, рассчитанными в соответствии с моделью двух состояний (Рисунок 30). Это справедливо при различных концентрациях в диапазоне суммарной концентрации олигонуклеотидов в диапазоне 1–20 мкМ. (iv) Термодинамические параметры, полученные с помощью процедуры подгонки, не зависели от концентрации олигонуклеотидов в пределах экспериментальной ошибки и (v) были одинаковыми для кривых плавления, полученных на длинах волн 260 и 270 нм. (vi) Наблюдается линейная зависимость обратной температуры плавления от логарифма концентрации олигонуклеотидов с коэффициентом корреляции (R^2) выше 0.98 (Рисунок 31). (vii) Термодинамические параметры, полученные методом подгонки (усредненные значения, полученные при всех исследованных концентрациях олигонуклеотидов) и концентрационным методом, совпадали в пределах экспериментальной ошибки. Различия в изменениях энтальпии (ΔH°), энтропии (ΔS°) и свободной энергии Гиббса (ΔG° (37)) не превышали 12%, 11% и 4%, соответственно. Единственным исключением был комплекс M8PG/N8PG, который имел самую низкую термодинамическую стабильность. Для этого комплекса невозможно было точно определить термодинамические параметры при низких концентрациях методом подгонки кривых плавления из-за отсутствия низкотемпературной базовой линии.

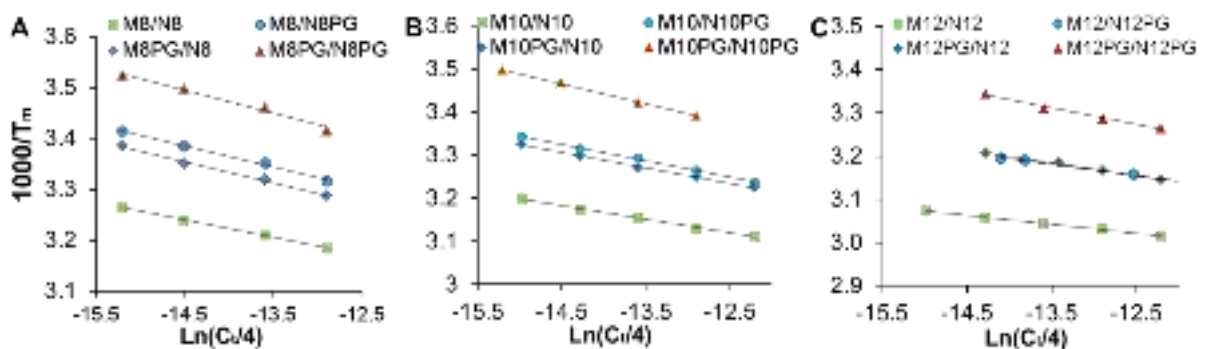


Рисунок 31. Линейная зависимость обратной температуры плавления от логарифма концентрации олигонуклеотидов для (А) окта-, (В) дека- и (С) додекамеров.

Таблица 11. Средние значения термодинамических параметров, полученные путем оптимизации кривых плавления и концентрационным методом в 1 М NaCl и 10 мМ какодилат натрия, pH 7.2. Температуры плавления рассчитаны при полной концентрации олигонуклеотидов 10 мкМ.

	ΔS° , кал/моль/К	ΔH° , ккал/моль	ΔG°_{37} , ккал/моль	T_m , °C
8-звенные олигонуклеотиды				
NN*	-151±9	-55.5±3.3	-8.7±0.3	41.1
M8/N8	-155±5	-56.6±1.2	-8.7±0.1	40.9
M8/N8PG	-128±3	-46.0±1.2	-6.5±0.1	27.4
M8PG/N8	-140±2	-50.5±1.0	-6.9±0.1	30.9
M8PG/N8PG	-120±6	-42.5±2.0	-5.3±0.2	19.1
10-звенные олигонуклеотиды				
NN	-193±12	-69.5±4.2	-9.8±0.4	45.3
M10/N10	-173±12	-63.3±3.4	-9.8±0.1	46.1
M10PG/N10	-158±16	-56.6±3.7	-7.5±0.1	34.6
M10/N10PG	-141±9	-51.1±2.3	-7.3±0.1	33.4
M10PG/N10PG	-106±18	-38.8±6.0	-6.0±0.4	22.2
12-звенные олигонуклеотиды				
NN	-246±15	-89.0±5.3	-12.7±0.5	54.3
M12/N12	-261±14	-94.7±4.8	-13.7±0.4	56.9
M12PG/N12	-207±17	-73.4±4.9	-9.3±0.2	43.0
M12/N12PG	-213±9	-75.5±2.1	-9.4±0.2	43.0
M12PG/N12PG	-181±11	-62.8±3.1	-6.8±0.2	31.3

* - NN - значения термодинамических параметров для ДНК/ДНК дуплексов, полученные с помощью модели ближайших соседей [29].

Средние значения термодинамических параметров, полученные методом оптимизации кривых плавления и концентрационным методом, являются наиболее точными значениями термодинамических параметров и приведены в Таблице 11. Значения термодинамических параметров для нативных дуплексов совпадают со значениями, рассчитанными с помощью модели ближайших соседей в пределах погрешности [73]. Это наблюдение дополнительно подтверждает применимость модели двух состояний к исследуемым нативным ДНК дуплексам. Введение модификации в одну цепь дуплекса дестабилизировало дуплекс при высокой ионной силе раствора (1 М NaCl, Таблица 11). Температура плавления в среднем ниже на 12.5 °C для комплексов с одной модифицированной цепью и на 23.8 °C для полностью модифицированных дуплексов.

Величина разницы значений термодинамических параметров ($\Delta G^\circ(37^\circ\text{C})$) между модифицированным и нативным комплексами, разделенная на количество ФГ групп в комплексе находится в диапазоне 0.26–0.40 ккал/моль на одну модификацию и зависит от длины и/или G/C состава. Наиболее выраженная разница в температуре плавления (3.5°C) между ФГО/ДНК и ДНК/ФГО комплексами наблюдалась для октамеров (Таблица 11). Этот эффект, зависящий от последовательности, можно легко увидеть на зависимости обратной температуры плавления от логарифма общей концентрации олигонуклеотидов – прямые существенно различаются (Рисунок 31). Термодинамический эффект в пересчете на одну модификацию в терминах $\Delta G^\circ(37)$ для ФГО/ФГО оказывается на $\sim 20\%$ меньше, чем аддитивное влияние дестабилизации ДНК/ДНК дуплекса при модификации только одной цепи.

Снижение термической стабильности ФГО-содержащих дуплексов связано как с энтальпийным, так и с энтропийным вкладом. Изменения энтальпии гибридизации (ΔH°), вызванные модификацией дуплексов, были на $\sim 30\%$ больше, чем изменения энтропии ($T \cdot \Delta S^\circ$) комплексообразования в стандартных буферных условиях.

Наблюдаемая сильная дестабилизация ДНК дуплексов, при введении в их структуру ФГ модификаций, в стандартных условиях может происходить из-за нейтрализации рибозофосфатного остова без изменения вторичной структуры дуплекса. Чтобы выяснить влияние электростатических эффектов на гибридизацию ФГО, были проанализированы их комплексообразующие свойства в различных буферных условиях: в деионизированной (MilliQ) воде, в 10 мМ какодилатном буфере (pH 7.2) без NaCl или с 100 мМ или 1 М NaCl или в буфере, имитирующем физиологические условия (10 мМ NaCac, 100 мМ NaCl и 5 мМ MgCl_2). Как и ожидалось, термическая стабильность ДНК/ДНК комплексов может быть ранжирована в следующем порядке: MilliQ < 0 мМ NaCl < 100 мМ NaCl < 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl_2 < 1 М NaCl (Рисунок 32) [152]. Данные в бессолевых условиях (MilliQ вода) не представлены из-за низкой термической стабильности нативных комплексов ($T_{\text{пл}} < 10^\circ\text{C}$) и невозможности

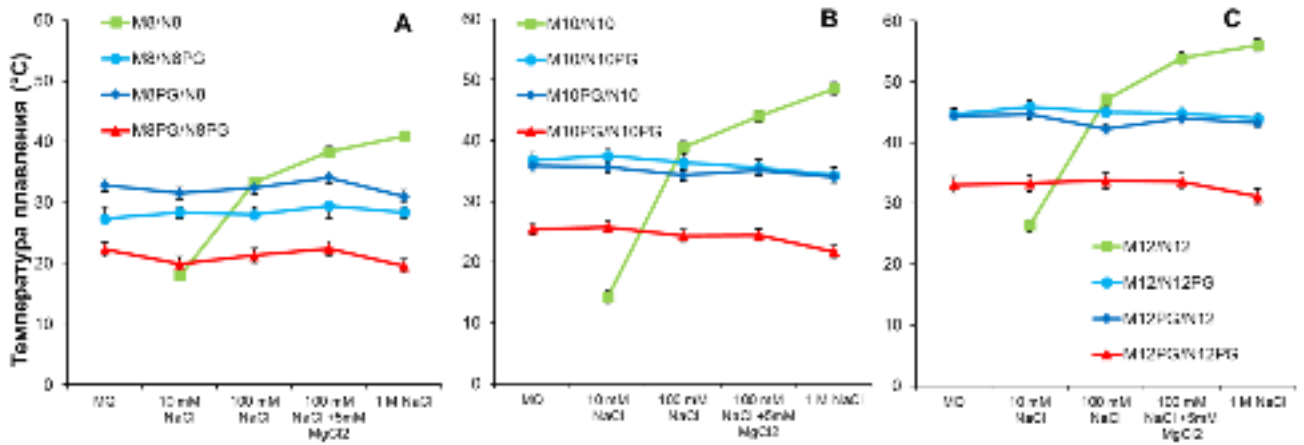


Рисунок 32. Сравнение зависимостей температуры плавления от буферных условий для (А) окта-, (В) дека- и (С) додекамерных комплексов различных типов (ДНК/ДНК: зеленый, ФГО/ДНК: темно-синий, ДНК/ФГО: голубой и ФГО/ФГО: красный).

достоверно определить термодинамические параметры из анализа кривых термической денатурации.

В отличие от нативных комплексов, термостабильность модифицированных дуплексов незначительно зависит от ионной силы раствора. Тенденции изменения температуры плавления были аналогичны для ФГО/ДНК, ДНК/ФГО и полностью незаряженного модифицированного ФГО/ФГО комплексов. Значения $T_{пл}$ модифицированных дуплексов при 1 М NaCl оказались на 0.7–3.2 °C ниже по сравнению с 100 мМ NaCl. Напротив, для нативных дуплексов существует хорошо известная сильная зависимость от ионной силы раствора [73,152], в результате чего значения $T_{пл}$ выше на 7.5–9.3 °C. Наблюдаемое снижение термической стабильности модифицированных комплексов может быть связано с изменениями активности воды при высокой ионной силе раствора [153]. Считается, что уменьшение активности воды снижает эффективность образования Уотсон–Криковских пар [154]. Это утверждение подтверждается в экспериментах по денатурации в присутствии ионов магния. Термодинамическая стабильность нативных дуплексов в этом буфере была близка к таковой в растворе с 1 М NaCl, для которого электростатический вклад в образование дуплекса очень высок. Напротив, для дуплексов незаряженных ФГО значения $T_{пл}$ в присутствии магния оказались ближе к значениям при 100 мМ Na⁺, где активность воды была примерно такой же, в отличие от 1 М NaCl.

Термостабильность нативных дуплексов и комплексов с одной модифицированной цепью близки при 100 мМ Na⁺. Изменения энтальпии для модифицированных дуплексов существенно не зависело от буферных условий. Напротив, дуплексы ДНК/ДНК имели на 17-30% более низкие значения энтальпии в 10 мМ какодилатном буфере по сравнению с более высокой ионной силой. При этом известно, что изменение энтальпии в основном не зависит от концентрации NaCl [73].

Полученные данные подтверждают электронейтральность модифицированных цепей, малый электростатический вклад, значительное влияние гидрофобных взаимодействий на термическую стабильность ФГО дуплексов, а также применимость модели двух состояний для процесса образования дуплексов, содержащих фосфорилгуанидиновые остатки.

3.3.3.3. Исследование гибридизационных свойств ФГО с РНК

Для расширения представлений о гибридизационных свойствах ФГО с использованием нуклеотидных последовательностей модельных системах длиной 8, 10 и 12 н.т. проведено исследование термической стабильности ФГО/РНК дуплексов в различных солевых условиях. Последовательности РНК были одинаковы с ДНК с точностью до замены dT на rU (Таблица 12). Показано, что с увеличением ионной силы раствора, температура плавления ФГО/РНК дуплексов незначительно возрастает, в то время как в случае ФГО/ДНК она уменьшается (Рисунок 33). Это может быть связано с различными сольватационными особенностями в процессе образования таких дуплексов. В то же время термостабильность ФГО/РНК дуплексов сопоставима с термостабильностью ФГО/ДНК с тем же контекстом и несколько ниже термостабильности ДНК/РНК дуплексов в присутствии 100 мМ хлорида натрия. Кроме того, для ФГО/РНК дуплексов наблюдаются более выраженные, нежели в случае ДНК/ФГО различия при модификации одной или второй цепи в дуплексе.

Таблица 12. Последовательности олигомеров для исследования термостабильности ФГО/РНК дуплексов

Код	Последовательность 5'-3'	Код	Последовательность 5'-3'
M8	d(CGGTAGCT)	N8	d(AGCTACCG)
RM8	r(CGGUAGCU)	RN8	d(AGCUACCG)
M8PG	d(C*G*G*T*A*G*C*T)	N8PG	d(A*G*C*T*A*C*C*G)
M10	d(CTAAGCATGG)	N10	d(CCATGCTTAG)
RM10	r(CUAAGCAUGG)	RN10	r(CCAUGC UUAG)
M10PG	d(C*T*A*A*G*C*A*T*G*G)	N10PG	d(C*C*A*T*G*C*T*T*A*G)
M12	d(GCAATGACTTGT)	N12	d(ACAAGTCATTGC)
RM12	r(GCAAUGACUUGU)	RN12	r(ACAAGUCAUUGC)
M12PG	d(G*C*A*A*T*G*A*C*T*T*G*T)	N12PG	d(A*C*A*A*G*T*C*A*T*T*G*C)

*- обозначает ФГ модифицированный фосфатный остов (1,3-диметилимидазолидин-2-иминным заместителем)

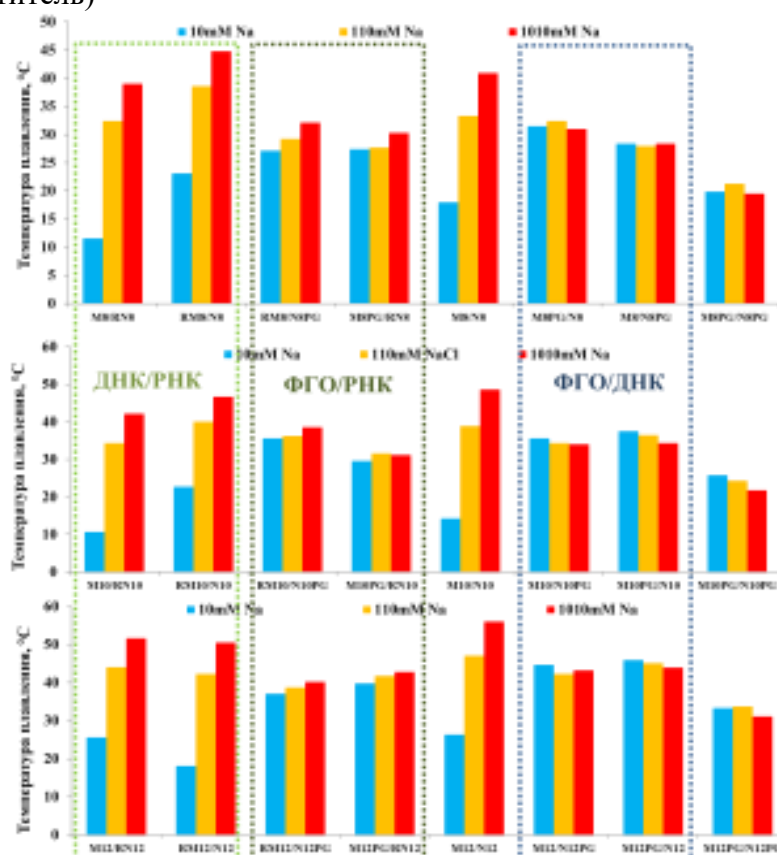


Рисунок 33. Сопоставление температур плавления для ДНК/РНК, ФГО/РНК, ДНК/ДНК, ФГО/ДНК и ФГО/ФГО дуплексов длины 8,10 и 12 пар оснований в 10, 100 и 1000 мМ NaCl.

Достаточно высокая термостабильность ФГО/РНК дуплексов делает ФГО перспективным кандидатом для различных применений, где важно взаимодействие с РНК цепями. В то же время, низкий уровень охарактеризованности физико-химических свойств комплексов РНК с ФГО ограничивает рациональное применение модифицированных олигомеров в приложениях, связанных с РНК. Таким образом, в дальнейшем будет необходимо провести более детальные исследования свойств ФГО/РНК комплексов.

3.3.4. Исследование кинетики формирования ФГО/ДНК дуплексов

Чтобы определить причину наблюдаемых термодинамических эффектов исследована кинетика формирования дуплексов методом остановленной струи для набора олигомеров (модельные системы M10(PG)/N10(PG) и M12(PG)/N12(PG)). Исследование проводили при различных температурах (10 – 37 °С) и в двух буферных условиях: стандартных (10 мМ NaCac, 1 М NaCl, pH 7.2) и с низкой ионной силой раствора (10 мМ NaCac, pH 7.2). Кинетические кривые формирования всех НК-дуплексов при различных буферных условиях типичны для формирования ДНК дуплексов и хорошо описываются в приближении модели двух состояний (Рисунок 34) [129].

Исследования при различных температурах показало не только изменение величин констант скоростей прямой и обратной реакции формирования комплекса, но изменение энергий активации ассоциации и диссоциации комплексов (Рисунок 34, Таблица 3). Константы скорости ассоциации находились в диапазоне от 10^5 до 10^7 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ во всех исследованных случаях, увеличиваясь с ростом температуры. В случае двенадцатизвенных олигонуклеотидов константы скорости ассоциации нативных олигонуклеотидов в несколько раз меньше, чем модифицированных. При этом константы скорости реакции образования полностью модифицированного дуплекса M12PG/N12PG при различных температурах оказывается выше, чем частично модифицированных M12PG/N12 и M12/N12PG за исключением точки при 25 °С, где наблюдается не полная ассоциация ФГО/ФГО дуплекса. Основное отличие между модифицированными и немодифицированными дуплексами наблюдалось в величине константы скорости диссоциации, которая отличается до 6 порядков между ДНК/ДНК и ФГО/ФГО дуплексами (Таблица 12).

Энергии активации (E_a) всех исследованных модельных комплексов, определенных из зависимостей констант скоростей реакции от температур в Аррениусовских координатах, являются отрицательными величинами. При этом энергия активации формирования комплексов значительно ниже по амплитуде, чем энергия активации диссоциации дуплексов. Энергия активации ассоциации для нативных дуплексов незначительно выше, нежели для ФГО/ДНК или

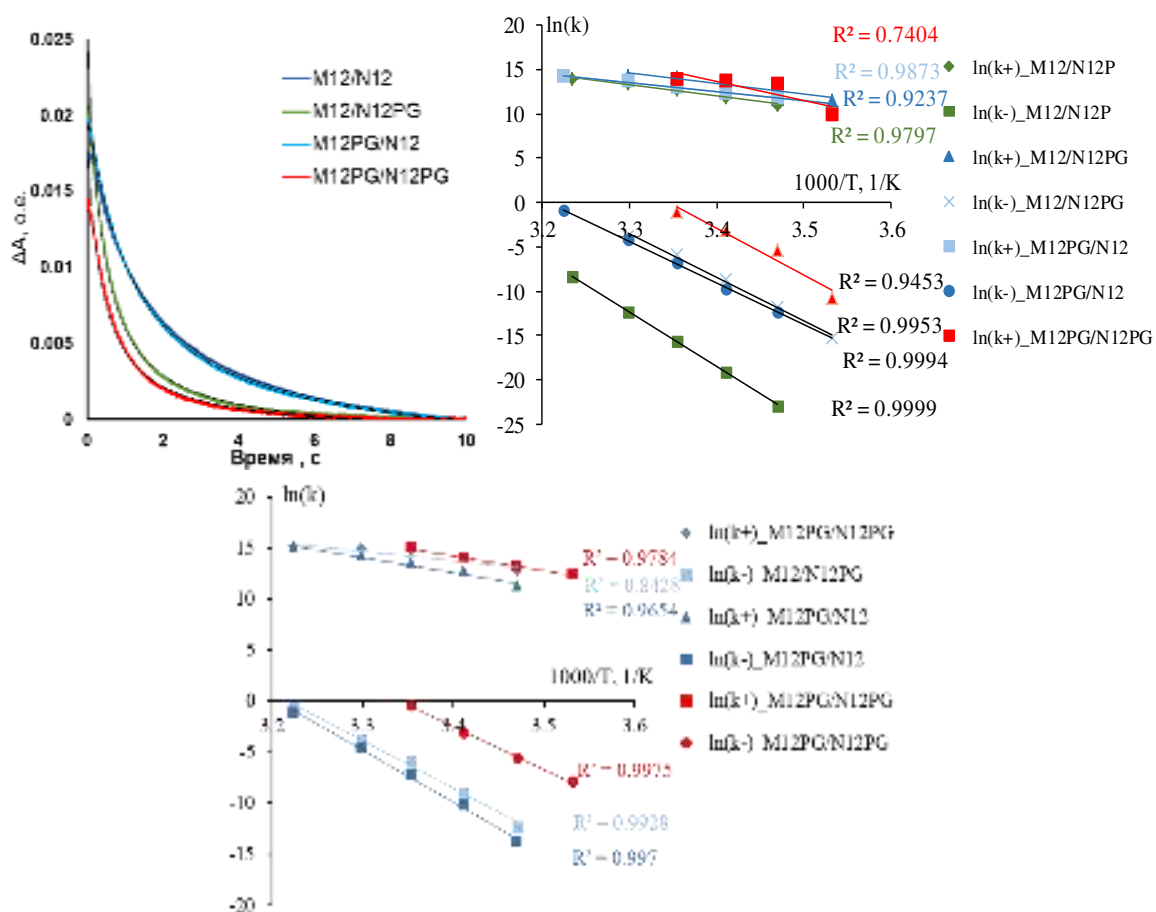


Рисунок 34. Характерные экспериментальные и расчетные кинетические кривые формирования двенадцатизвенных ДНК/ДНК: (зеленый), ДНК/ФГО (темно-синий), ФГО/ДНК (голубой) и ФГО/ФГО (красный) комплексов, полученные при 25° С в 1М NaCl. Черные линии- теоретические кривые. Температурные зависимости констант скоростей реакции в аррениусовских координатах в стандартных условиях (Б) и при низкой ионной силе раствора (В).

ФГО/ФГО комплексов в стандартных условиях (Таблица 12). При этом максимальные различия наблюдаются в энергиях активации диссоциации. Снижение ионной силы раствора с 1 М до 10 мМ Na^+ приводит к одинаковому уменьшению энергий активации ассоциации и диссоциации на -10 ккал/моль для всех модифицированных комплексов.

Таблица 12. Значение констант скоростей ассоциации (k_+ , $M^{-1}\cdot c^{-1}$) и диссоциации (k_- , c^{-1}) исследованных ДНК/ДНК, ДНК/ФГО, ФГО/ДНК и ФГО/ФГО комплексов дека- и додекамеров и энергии активации (E_a) формирования и диссоциации дуплексов в различных буферных условиях.

1M NaCl	M12/N12		M12/N12PG		M12PG/N12		M12PG/N12PG	
T, °C	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-
10			11	$2.2 \cdot 10^{-7}$			2	$2.0 \cdot 10^{-5}$
15	6	$1.1 \cdot 10^{-10}$	34	$7.1 \cdot 10^{-6}$	15	$4.3 \cdot 10^{-6}$	64	0.0045
20	15	$4.7 \cdot 10^{-9}$	90	$1.8 \cdot 10^{-4}$	22	$5.8 \cdot 10^{-5}$	98	0.0454
25	35	$1.6 \cdot 10^{-7}$	145	$2.5 \cdot 10^{-3}$	50	0.0011	121	0.3402
30	68	$4.6 \cdot 10^{-7}$	166	$2.4 \cdot 10^{-2}$	90	0.0152		
37	107	$2.5 \cdot 10^{-4}$			161	0.4280		
E_a, ккал/моль	-25	-123	-24	-99	-20	-94	-11	-74
1M NaCl	M10/N10		M10/N10PG		M10PG/N10		M10PG/N10PG	
T, °C	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-
10	38	$2.7 \cdot 10^{-6}$	49	0.0012	115	0.0009	378	0.5535
15	73	$3.7 \cdot 10^{-5}$	96	0.0112	187	0.0087	241	1.1687
20	136	$4.7 \cdot 10^{-4}$	205	0.1102	188	0.0472		
25	252	0.0054	564	1.3190	587	0.7505		
30	461	0.0572	81	0.7898	496	3.0653		
E_a, ккал/моль	-21	-85	-10	-61	-14	-70		
10 mM NaCac	M12/N12		M12/N12PG		M12PG/N12		M12PG/N12PG	
T, °C	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-	$k_+(\cdot 10^4)$	k_-
10							26	0.00036
15			34	$1.3 \cdot 10^{-4}$	8	$9.8 \cdot 10^{-7}$	49	0.00377
20			107	$4.5 \cdot 10^{-4}$	32	$3.5 \cdot 10^{-5}$	109	0.04380
25			243	0.0026	77	$6.7 \cdot 10^{-4}$	336	0.66665
30			292	0.0250	142	0.00916		
37					320	0.30666		
E_a, ккал/моль			-34	-108	-29	-101	-28	-84

Таким образом, дестабилизация ФГ-содержащих ДНК дуплексов происходит в результате значимого увеличения константы скорости диссоциации дуплекса, в то время, как скорости ассоциации отличаются не более чем на порядок. Прослеживается зависимость константы скорости ассоциации от

нуклеотидной последовательности олигомера, в которую введены ФГ группы, которая скорее всего сопряжена с долей пуриновых оснований в цепи.

3.3.5. Исследование ФГО и их дуплексов методами компьютерного моделирования

Чтобы определить причину наблюдаемых структурных и термодинамических эффектов ФГ модификации, мы провели моделирования методом МД модельных дуплексов и одноцепочечных олигонуклеотидов. Для моделирования мы выбрали силовое поле parmbsc1, поскольку оно дает наиболее надежные результаты, которые коррелируют со многими экспериментальными данными о структуре и конформационной подвижности ДНК дуплексов [86,88], свойства которых по данным экспериментальных исследований близки к ФГО. На основе данных КД спектроскопии построили исходные структуры окта-, дека- и додекамерных дуплексов в виде В-формы двойной спирали и использовали их для получения одноцепочечных олигонуклеотидов. Для каждого модифицированного фосфатного остатка существует два возможных диастереомера. Были сконструированы чередующиеся диастереомерные (Rp- и Sp-) олигонуклеотиды, поскольку это наиболее статистически репрезентативная конфигурация динуклеотидов, реализующаяся во время химического синтеза ФГО [17]. Для наиболее точного вычислительного анализа использовали модель явной водной оболочки TIP3P и периодические условия моделирования. Заряд периодической ячейки нейтрализовали добавлением ионов натрия или доведением до 1 М Na⁺ и добавлением необходимого количества ионов хлора для нейтрализации заряда периодической ячейки. Поскольку создание и точная параметризация силового поля для химически модифицированных нуклеотидов является очень сложной задачей (на данный момент есть силовые поля только для PNA [155] и LNA [156]), более детальная параметризация и оптимизация силового поля не была выполнена в рамках данной работы.

Анализ полученных результатов для нативных и ряда ФГ-содержащих комплексов показывает устойчивость структур при моделировании в течении 1000 нс (данные не приведены). Структуры модифицированных олигонуклеотидов и их

комплексов близки к нативным аналогам. Для всех комплексов проведено МД моделирование продолжительностью 100 нс. Структурные характеристики двойной спирали для нативных и модифицированных комплексов были характерны для В-формы ДНК и практически не различались между собой (Рисунок 35). Значения RMSD между идентичными тяжелыми атомами нативных и модифицированных олигомеров и их комплексов находились в диапазоне 1.2–2.5 Å.

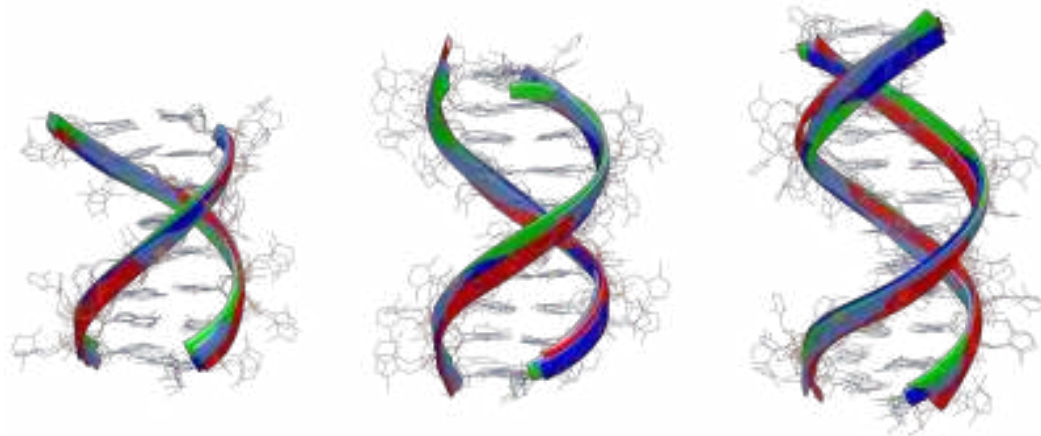


Рисунок 35. Структуры, наиболее представленные во время моделирования. Выровнены по тяжелыми атомам азотистых оснований (А) окта-, (В) дека- и (С) додекамерных комплексов ДНК/ДНК (зеленый), ДНК/ФГО (темно синий), ФГО/ДНК (светло синий) и ФГО/ФГО (красный).

Значимые различия были обнаружены при анализе подвижностей отдельно гетероциклических оснований и рибозофосфатного остова. Рибозофосфатный остов модифицированных комплексов имеет большую конформационную подвижность, в то время как пары гетероциклических оснований – меньшую (Рисунок 36).

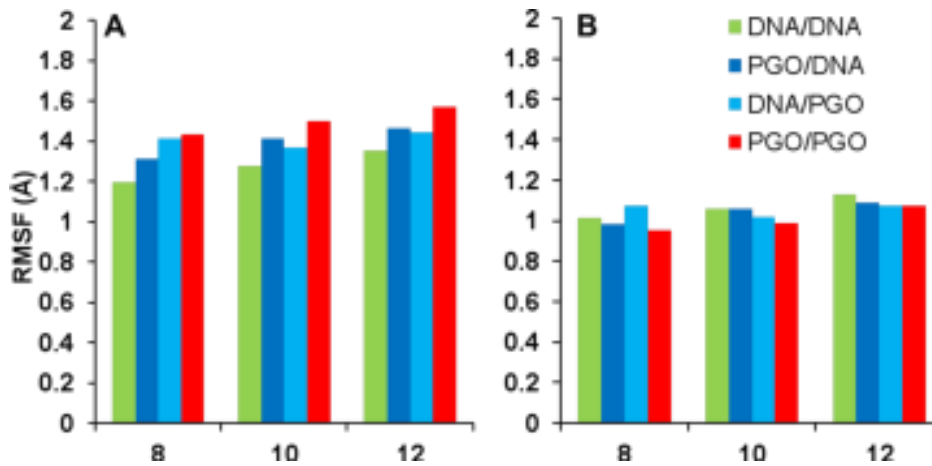


Рисунок 36. Среднеквадратичные флуктуации атомов (RMSF) для всех тяжелых атомов (А) рибозофосфатного остова (OP2, O3', C5', P и O5') и (В) азотистых оснований для комплексов ДНК/ДНК (зеленый), ДНК/ФГО (темно синий), ФГО/ДНК (светло синий) и ФГО/ФГО (красный) различной длины.

Анализ конформации остатка сахара ДНК/ДНК дуплексов показал, что 55–57% времени моделирования она соответствует С2'-эндо конформации (что типично для двойной спирали В-типа) [157], а 27–30% времени моделирования - в С1'-экзо конформации. Цепи ФГО показали более низкую долю времени моделирования для С2'-эндо (49–54%) и более высокий процент времени моделирования для С1'-экзо конформации сахара (37–43%). Ансамбль конформаций цепей ДНК в частично модифицированных комплексах существенно не изменился. Наблюдаемое изменение динамики комплексов приводит к небольшому увеличению расстояний между фосфатными остатками остова модифицированной цепи (на 1-2 Å для всей цепи). Полученные данные свидетельствуют о том, что введение ФГ модификации не изменяет конформацию дезоксирибозы в противоположной нити.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными спектроскопии кругового дихроизма относительно сходства вторичных структур комплексов ФГО. Незначительное снижение энтальпии гибридизации комплексов ФГО коррелирует с повышенной гибкостью модифицированных дуплексов. Тем не менее, эти данные не объясняют различия в термодинамической стабильности дуплексов ФГО и ДНК при высокой ионной силе раствора. Малый эффект ионной силы раствора, который наблюдается при экспериментальном гибридизационном

анализе, указывает на важность сольватации ФГО и незначительное влияние взаимодействий ФГО с катионами.

Были проанализированы особенности взаимодействия олигомеров и их комплексов с водным окружением. Для декамерных олигонуклеотидов и их комплексов были построены карты плотности водного окружения и радиальные распределения для отдельных атомов. Видно, что введение ФГ модификаций приводит к меньшей структурированности водного окружения (Рисунок 37).

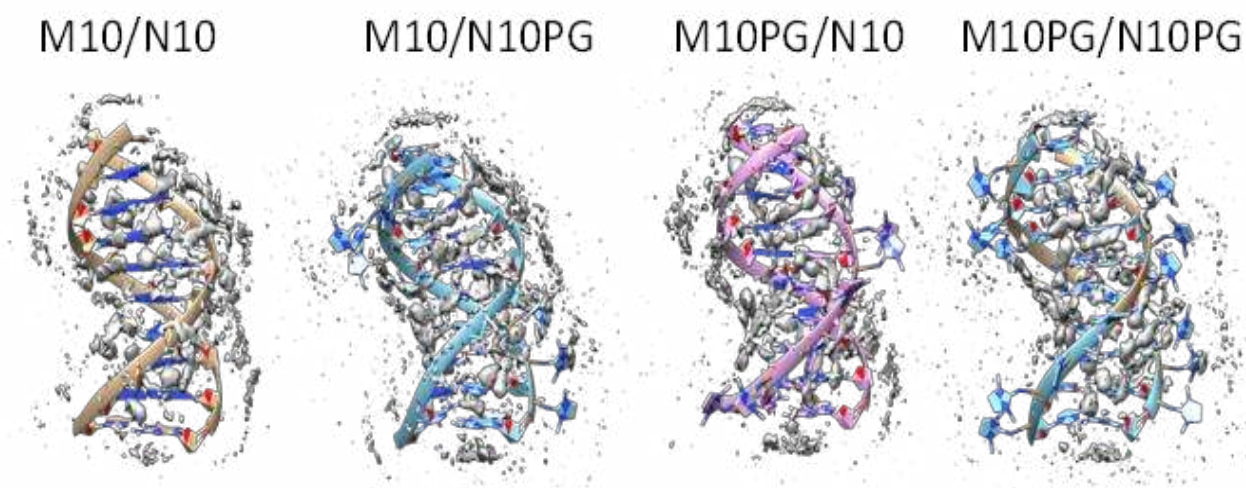


Рисунок 37. Карты плотности расположения атомов кислорода в молекуле воды вокруг исследованных декамерных дуплексов.

Для количественного подтверждения снижения упорядоченности воды вокруг дуплексов было рассчитано количество водородных связей между дуплексом и водой (Рисунок 38).

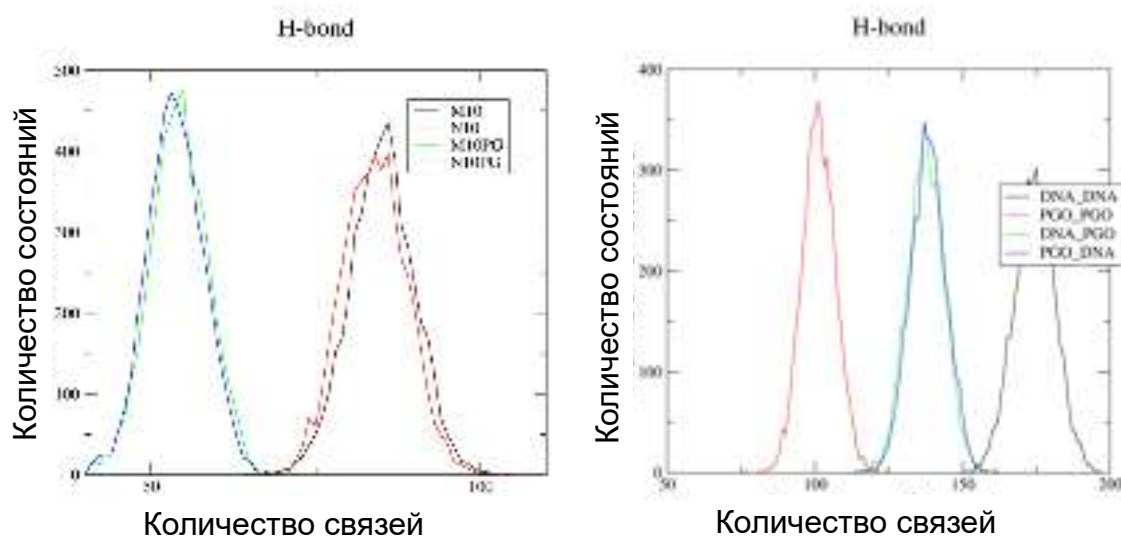


Рисунок 38. Распределение количества водородных связей вокруг одноцепочечных олигомеров(слева) и дуплексов(справа).

Так, количество водородных связей, сформированных двухцепочечными и одноцепочечными олигомерами значительно отличается в случае нативных и модифицированных структур. Это в первую очередь связано с влиянием замещения немостикового кислорода на ФГ группу в фосфатном остатке. В нативной цепи каждый из двух немостиковых кислорода образовывал в среднем 2.5 водородные связи, что коррелирует с экспериментальными данными [158]. В то же время, в модифицированной цепи немостиковый кислород образует в среднем 1.6 водородные связи. Это связано с уменьшением частичного заряда атома кислорода и стерическими затруднениями, вызванными объемным ФГ-заместителем.

В то же самое время, снижение числа водородных связей при образовании дуплекса очень близко как для нативных, так и для модифицированных олигонуклеотидов (Таблица 13). Это свидетельствует о том, что влияние активности воды на гибридизационные свойства как нативных, так и модифицированных дуплексов должно быть очень похоже.

Таблица 13. Сольватационные свойства дуплексов. Среднее количество и стандартное отклонение (в скобках) водородных связей между нитями (НВ [UU]), нитей с водой (НВ [UV]) водными мостиками (НВ [Bridge]), количество молекул воды в первой (WS_1st) и второй (WS_2nd) гидратных оболочках вокруг дуплексов и разница между количеством водородных связей (dНВ) и молекул воды в первой гидратной оболочке (dWS_1st) в двух- и одноцепочечном состояниях.

	НВ[UU]	НВ[UV]	НВ[Bridge]	WS_1st	WS_2nd	dНВ	dWS_1st
M8/N8	15.0(4.2)	116.0(20.8)	4.7(1.9)	265.1(7.5)	472.0	-4.0	-57.3
M8/N8PG	14.9(5.5)	92.7(19.2)	4.4(1.9)	320.8(10.0)	557.3	-3.3	-76.7
M8PG/N8	15.2(5.5)	92.5(20.1)	4.5(1.9)	318.3(9.6)	552.0	-3.5	-58.7
M8PG/N8PG	15.3(5.3)	68.0(13.3)	4.1(1.8)	410.4(12.1)	729.9	-3.8	-41.8
M10/N10	17.7(4.4)	145.4(32.0)	5.7(2.2)	326.3(9.1)	574.9	-4.1	-69.2
M10/N10PG	17.8(5.0)	114.8(21.9)	5.3(1.9)	395.9(10.4)	679.6	-4.6	-69.2
M10PG/N10	17.9(4.9)	114.4(18.9)	5.3(1.9)	395.2(9.7)	679.5	-4.5	-70.8
M10PG/N10PG	18.0(5.2)	83.8(17.4)	5.3(2.0)	464.7(13.2)	781.6	-4.7	-71.0
M12/N12	20.5(3.3)	174.3(29.2)	7.1(2.4)	383.2(11.7)	670.8	-4.2	-84.3
M12/N12PG	20.7(3.3)	137.5(27.6)	6.8(2.3)	467.7(13.6)	796.4	-5.1	-88.7
M12PG/N12	20.5(3.8)	138.3(24.7)	6.9(2.3)	470.5(13.7)	800.6	-3.8	-83.1
M12PG/N12PG	20.5(3.0)	101.3(11.5)	7.1(2.2)	551.5(12.5)	917.0	-4.7	-91.0

Для выяснения влияния ионов на исследуемые системы было проведено моделирование декамерных олигонуклеотидов и их комплексов в условиях, приближенных к 1М NaCl в явной водной оболочке. Во всех случаях количество ионов хлора было равно 100, ионы натрия полностью нейтрализовали систему, а количество молекул воды было ~5500 во всех случаях. Анализ структурных параметров дуплексов и особенностей гидратации не выявил каких-либо значимых различий для нативных и модифицированных дуплексов при переходе от нейтрализованной модели к случаю модели с высокой ионной силой раствора (Таблица 14).

Таблица 14. Средние значения числа молекул воды находящихся на расстоянии менее 3 Å от выделенных частей системы (малая бороздка, большая бороздка и одного из немостиковых кислородов) для 100 нс моделирования для всех исследованных дуплексов.

Обозначение системы	Большая бороздка	Малая Бороздка	Немостиковый кислород (1ая цепь)	Немостиковый кислород (2ая цепь)
M8/N8	22.1(2.3)	17.2(2.0)	40.6(2.9)	40.6(2.9)
M8/N8PG	22.5(2.3)	17.5(2.1)	40.7(2.8)	23.6(2.4)
M8PG/N8	22.3(2.2)	16.8(1.9)	24.1(2.3)	40.6(2.8)
M8PG/N8PG	22.4(2.2)	16.8(1.9)	24.0(2.3)	23.5(2.3)
M10/N10	25.7(2.4)	21.4(2.1)	50.7(3.1)	50.9(3.2)
M10/N10PG	26.2(2.3)	21.1(2.1)	50.4(3.2)	29.5(2.5)
M10PG/N10	25.9(2.3)	20.9(2.1)	28.9(2.6)	51.3(3.2)
M10PG/N10PG	26.4(2.2)	20.7(2.0)	28.7(2.5)	29.2(2.5)
M10/N10_1M ^a	25.3(2.4)	21.5(2.4)	49.2(3.4)	49.2(3.4)
M10/N10PG_1M ^a	25.7(2.3)	20.6(2.2)	50.3(3.4)	29.0(2.6)
M10PG/N10_1M ^a	25.5(2.4)	21.0(2.2)	28.5(2.7)	49.4(3.4)
M10PG/N10PG_1M ^a	25.7(2.5)	21.0(2.2)	28.4(2.7)	29.0(2.6)
M12/N12	32.8(2.7)	24.1(2.3)	61.0(3.5)	60.6(3.5)
M12/N12PG	32.7(2.6)	23.4(2.2)	61.1(3.4)	34.5(2.8)
M12PG/N12	32.6(2.6)	24.3(2.2)	35.2(2.8)	60.6(3.4)
M12PG/N12PG	33.2(2.6)	23.9(2.2)	34.9(2.8)	34.5(2.7)

^a Система с буферными условиями, подражающими 1М NaCl.

Таким образом, проведено детальное исследование структуры и гибридизационных свойств ФГО экспериментальными методами и методами компьютерного моделирования. ФГО содержат модифицированный фосфатный

остаток, в котором один атом кислорода замещен восемью тяжелыми атомами и 10 атомами водорода. Оказалось неожиданным, что в олигонуклеотидах и дуплексах наличие таких объемных гидрофобных остатков, делающих модифицированную цепь электронейтральной, существенно не изменяют структуру и конформационную подвижность дуплексов. Дуплексы ФГО, как и нативные, формируются в соответствии с моделью двух состояний. Их термическая стабильность несколько увеличивается с уменьшением ионной силы из-за изменений активности воды и высвобождения катионов во время образования дуплекса. Термическая стабильность ФГО/ДНК комплексов зависит от нуклеотидной последовательности, в которую введена модификация и близка к стабильности аналогов ДНК/ДНК при 100 мМ NaCl. Температуры плавления ФГО/ФГО дуплексов значительно ниже, чем у гибридов, и имеют такую же тенденцию при изменении ионной силы.

3.3.6. Влияние соразтворителей на термостабильно ФГО дуплексов с ДНК

Проведенный анализ методом молекулярной динамики показал изменение сольватации ФГО и их дуплексов относительно ДНК. Таким образом, активность молекул воды может оказывать влияние на гибридизационные свойства ФГО. Для дальнейшего изучения выявленного факта были проведены эксперименты по исследованию влияния органических соразтворителей (что приводит к изменению активности воды) на термическую стабильность ФГО комплексов. В качестве агентов, снижающих активность воды выбраны этанол, этиленгликоль (EG), и два вида полиэтиленгликолей со средним молекулярным весом 200 и 1000 (PEG200 и PEG1000). Для исследований выбраны модельные двенадцатизвенные дуплексы (Таблица 15). Для количественной оценки были использован подход, предложенный ранее Рознером [159].

Таблица 15. Последовательность олигонуклеотидов, которые были использованы для исследований влияния соразтворителей на термическую стабильность.

Код	Последовательность 5'-3'
M1	CGATCCCAGGCT
N1	AGCCTGGGATCG
M1PG	C*G*A*T*C*C*C*A*G*G*C*T
N1PG	A*G*C*C*T*G*G*G*A*T*C*G
M2	TAGCTTTGAATC
N2	GATTCAAAGCTA
M2PG	T*A*G*C*T*T*T*G*A*A*T*C
N2PG	G*A*T*T*C*A*A*A*G*C*T*A
M3	GCTTAGTCAAGA
N3	TCTTGACTAAGC
M3PG	G*C*T*T*A*G*T*C*A*A*G*A
N3PG	T*C*T*T*G*A*C*T*A*A*G*C

Во всех случаях использовали растворы двух комплементарных олигонуклеотидов в отношении 1:1 с суммарной концентрацией 10^{-5} М в буферных условиях, приближенных к физиологических 10 mM NaCac, 100 mM NaCl и 5 mM MgCl₂, pH 7.2.

Изменение в количестве связанных с НК молекул воды в одно и двуцепочечном состояниях (Δn_w) определяли по схеме, ранее описанной Спинком и Чайресом [160]:

$$\Delta n_w = -(\Delta H^\circ / R) [d(T_{пл}^{-1}) / d(\ln a_w)] \quad (32)$$

где $-\Delta H^\circ$ это энтальпия комплексообразования, R универсальная газовая постоянная (1.986 кал/моль/К). Значения величин активности воды ($\ln a_w$) при заданной концентрации соразтворителей было взято из литературных данных [153,161,162].

Влияние этанола на термическую стабильность додекамерных дуплексов в водных растворах изучали методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Видно, что увеличение доли этанола до 50 wt% приводит к линейному снижению температуры плавления всех исследованных комплексов (Рисунок 39). Полная модификация одной из цепей приводит к незначительному изменению наклона зависимостей температур плавления и свободной энергии Гиббса от доли этанола.

Дестабилизация дуплексов M1/N1, M1/N1PG, и M1PG/N1 в присутствии 50% этанола составляло ~ 5.3 ккал/М, в то время как для M3/N3, M3/N3PG, и M3PG/N3, ~ 4.4 ккал/М. Для комплекса M2/N2, увеличение значения ΔG_{37}° составило -6.7 ± 0.3 ккал/М, а для частично модифицированного дуплекса -5.2 ± 0.4 ккал/М. Такие различия между системами скорее всего вызваны различным ГЦ-составом систем.

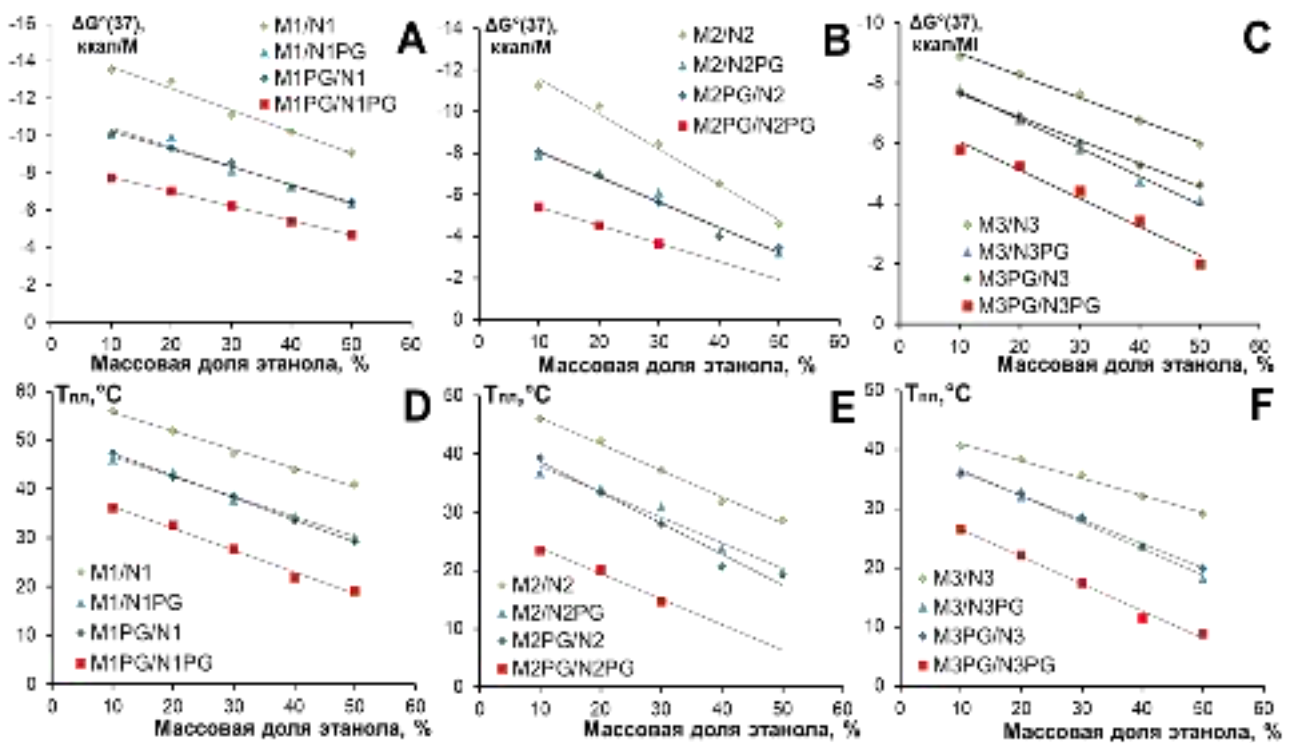


Рисунок 39. Зависимость изменения свободной энергии Гиббса (A,B,C) и температуры плавления (D,E,F) от доли этанола для исследованных комплексов.

Значения Δn_w при образовании дуплекса, определенные с помощью уравнения (32), были идентичными для нативных и модифицированных комплексов в пределах погрешности в рамках каждой из исследованных модельных систем (Таблица 16). Различия в Δn_w между модельными системами были значительными и варьировались от 3.7 до 5.2, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными о зависимости Δn_w от нуклеотидной последовательности [154].

Сходство термодинамических эффектов влияния этанола на гибридизационные свойства нативных и модифицированных дуплексов показало,

что только электростатические взаимодействия изменяются после введения ФГ модификаций, тогда как эффекты гидрофобных взаимодействий на термостабильность идентичны между нативными и модифицированными дуплексами.

Таблица 16. Изменение температуры плавления ($\Delta T_{пл}$) и свободной энергии Гиббса ($\Delta\Delta G_{37^\circ}$) для дуплексов между водным буфером и 50% раствором этанола и число присоединившихся молекул воды в процессе образования дуплекса, в расчете на одну пару оснований Δn_w .

	$\Delta\Delta G$, ккал/моль $^\circ$	$\Delta T_{пл}$, $^\circ\text{C}$	Δn_w , кол-во молекул воды на пару оснований
M1/N1	-5.4 ± 0.5	19.2 ± 0.7	4.5 ± 0.4
M1/N1PG	-5.2 ± 0.4	21.1 ± 0.6	4.2 ± 0.6
M1PG/N1	-5.3 ± 0.3	21.8 ± 0.6	4.2 ± 0.5
M1PG/N1PG	-4.2 ± 0.4	22.8 ± 1.1	3.6 ± 1.2
M2/N2	-6.7 ± 0.3	19.6 ± 0.5	5.9 ± 0.6
M2/N2PG	-5.1 ± 0.5	18.8 ± 0.5	4.7 ± 0.7
M2PG/N2	-5.3 ± 0.3	21.2 ± 0.5	5.1 ± 0.7
M2PG/N2PG	Н.о..	>15	Н.о.
M3/N3	-4.4 ± 0.3	17.9 ± 0.9	3.4 ± 0.5
M3/N3PG	-4.7 ± 0.4	22.2 ± 0.5	4.2 ± 0.8
M3PG/N3	-4.3 ± 0.3	20.9 ± 0.5	3.8 ± 0.9
M3PG/N3PG	-4.4 ± 0.2	19.5 ± 1.1	3.3 ± 1.7

Для исследования влияния этиленгликолей на свойства ФГО была выбрана модельная система M1/N1, M1/N1PG, M1PG/N1 и M1PG/N1PG. Эксперименты методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала проводили в растворах, содержащих 0, 5, 10, 15, 20 или 25 % (по массе) EG, PEG200 или PEG1000. Для всех образцов было показано, что значение обратной температуры плавления (T_m^{-1}) спадает линейно с понижением логарифма активности воды (Рисунок 40). Эффекты снижения температуры плавления и свободной энергии Гиббса от 20 % соразтворителей приведены в Таблице 17. Было показано, что дестабилизация дуплексов во всех случаях снижается по мере увеличения массы соразтворителя.

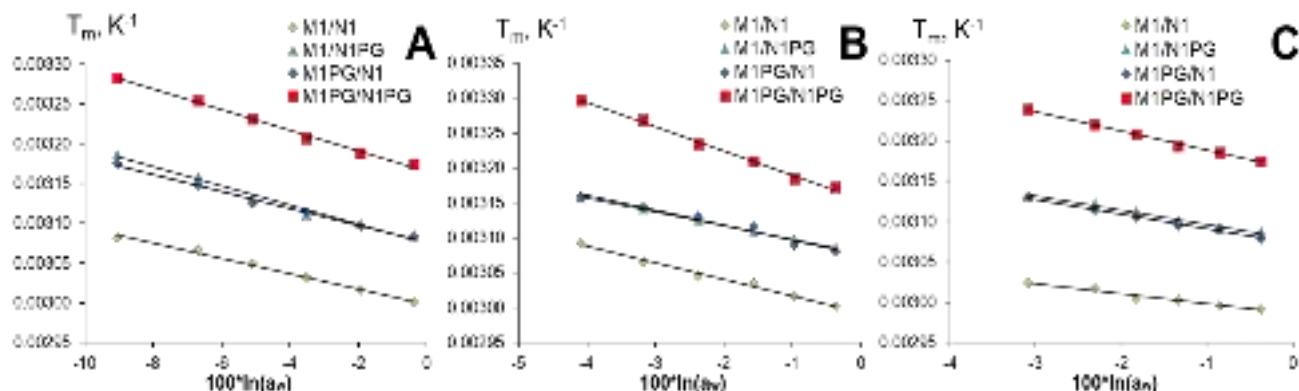


Рисунок 40. Зависимости обратных температур плавления дуплексов M1/N1, M1PG/N1, M1/N1PG и M1PG/N1PG в зависимости от логарифма активности воды в различных соразтворителях: этиленгликоль (А), Полиэтиленгликоль 200 (В) и Полиэтиленгликоль 1000 (С).

Таблица 17. Влияние от добавления 20% этанола (EtOH), этиленгликоля (EG), полиэтиленгликолей (PEG200 PEG1000), на свободную энергию Гиббса и температуру плавления дуплексов

	EtOH		EG		PEG200		PEG1000	
	$\Delta T_{пл}, C^{\circ}$	$\Delta\Delta G_{37^{\circ}},$ ккал/М	$\Delta T_{пл}, C^{\circ}$	$\Delta\Delta G_{37^{\circ}},$ ккал/М	$\Delta T_{пл}, C^{\circ}$	$\Delta\Delta G_{37^{\circ}},$ ккал/М	$\Delta T_{пл}, C^{\circ}$	$\Delta\Delta G_{37^{\circ}},$ ккал/М
M1/N1	8.2±0.2	-1.6±0.3	7.2±0.2	-1.8±0.1	7±0.5	-2.5±0.3	1.8±0.2	-1±0.1
M1/N1PG	7.7±0.2	-1.6±0.2	7.6±0.2	-2.1±0.3	5.8±0.3	-1.6±0.2	3.7±0.2	-1±0.2
M1PG/N1	8.6±0.4	-2.4±0.6	6.7±0.3	-1.8±0.2	6.4±0.3	-1.8±0.2	3.7±0.2	-0.9±0.2
M1PG/N1PG	9.4±0.3	-1.9±0.3	7.7±0.2	-1.6±0.2	9.3±1.1	-1.7±0.4	4.5±0.2	-0.9±0.3

Кроме того, при помощи спектроскопии КД было показано, что наличие соразтворителей не приводит к изменениям КД спектров, что свидетельствует о неизменности формы спирали ФГ-содержащих олигомеров и их комплексов (Рисунок 41).

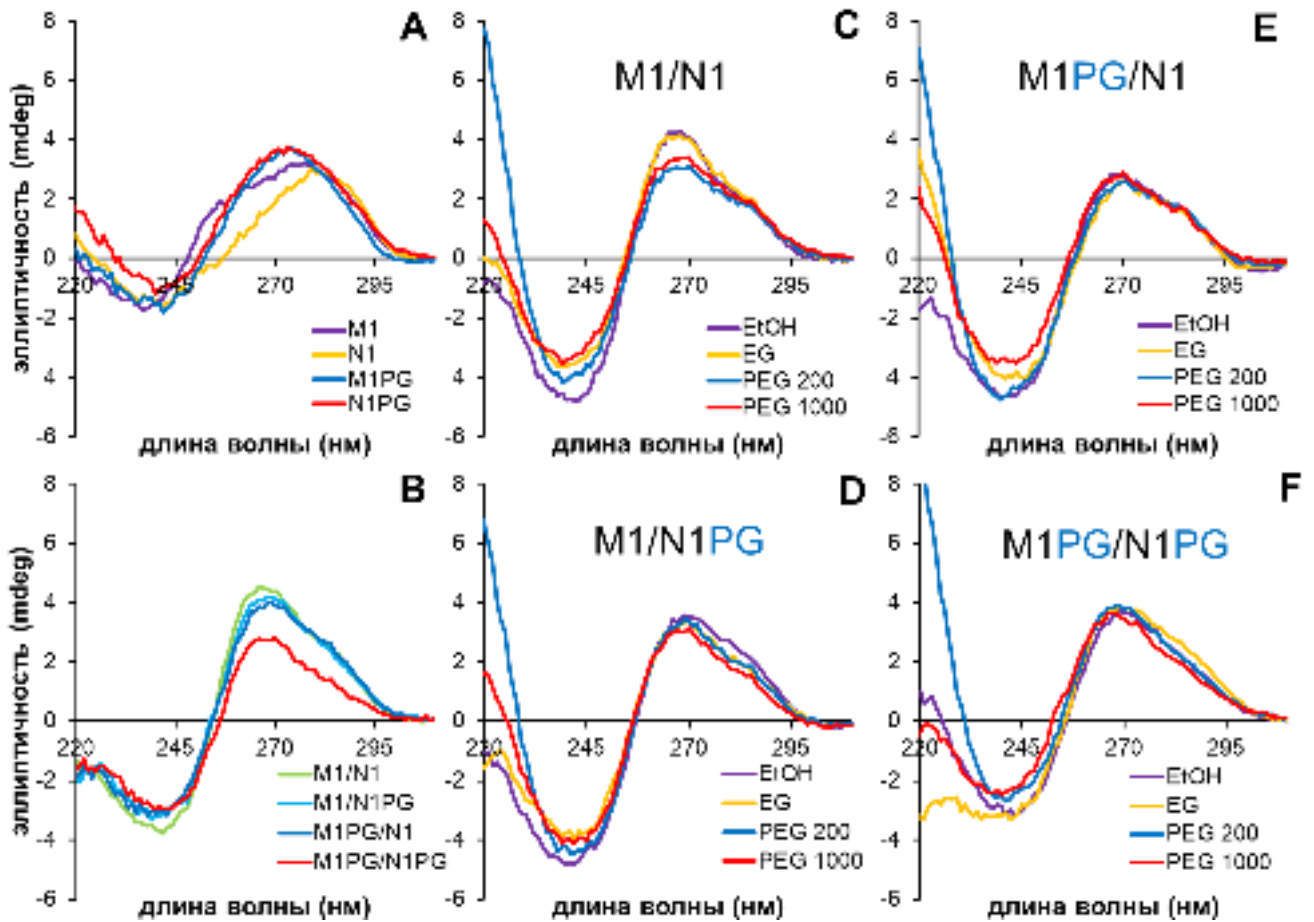


Рисунок 41. КД спектр одноцепочечных олигомеров (А) и их дуплексов (В) в следующем буфере 100 mM NaCl и 10 mM NaCac (pH 7.2) в отсутствии соразтворителей. КД спектры дуплексов M1/N1 (С), M1/N1PG (D), M1PG/N1 (E), и M1PG/N1PG (F) в буфере с 20 wt% соразтворителей.

Рассчитанные значения Δn_w на одну пару оснований составляли 4.5, 7.9, и 5.6 в EG, PEG200 и PEG1000, соответственно для нативного ДНК дуплекса M1/N1 что очень близко к литературным данным [60,154,160]. Три остальных дуплекса с ФГО (M1/N1PG, M1PG/N1, и M1PG/N1PG) показывают значения Δn_w очень близкие к Δn_w для нативного дуплекса (в присутствии всех соразтворителей). Следовательно, количество молекул воды, которые присоединяются в процессе образования дуплекса во всех случаях очень близки (при физиологических условиях 100 mM NaCl и 5 mM MgCl₂) (Рисунок 42).

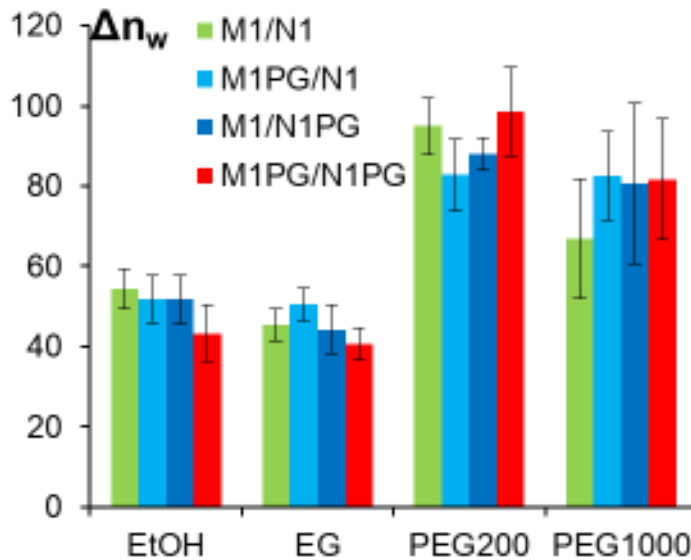


Рисунок 42. Количество молекул воды, присоединившихся в процессе образования дуплекса, в различных соразтворителях (этанол, EG, PEG200 и PEG1000).

Таким образом, нами было показано, что термодинамические эффекты при образовании ДНК и ФГО дуплексов в присутствии соразтворителей оказываются близки между собой. Это свидетельствует, что изменение в сольватации ДНК и ФГО при образовании дуплексов одинаково. Полученный результат согласуется с данными молекулярно-динамического моделирования об изменении сольватационной оболочки при комплексообразовании.

3.3.7. Исследование гибридизационных свойств набора ФГО дуплексов

На следующем этапе работы методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала были исследованы все возможные модельные дуплексы ДНК/ДНК (21 шт), ДНК/ФГО (42 шт) и ФГО/ФГО (21 шт) (Таблица 10) при различной концентрации ионов натрия в растворе (10, 110 и 1010 мМ Na⁺). Для части комплексов ФГО/ФГО температуры плавления были менее 20 °С, что не позволило достоверно определить термодинамические параметры комплексообразования для этих систем и они были исключены из рассмотрения.

Анализ кривых термической денатурации комплексов в 1М и 100 мМ NaCl показал, что нормированные кривые термической денатурации, определенные на длинах волн 260 и 270 нм, при нагревании и охлаждении образцов совпадали с

точностью не менее 0.5 градусов. Для комплексов в присутствии 10 мМ Na⁺ для некоторых нативных дуплексов наблюдался незначительный гистерезис менее 1.5 °С, что вероятно связано с более медленной кинетикой образования заряженных дуплексов [163]. В таких случаях для анализа использовали только кривые, полученные при нагревании, так как они являются более равновесными.

Величины термодинамических параметров (ΔG°_{37} , ΔH° , ΔS° , $T_{пл}$) полученные путем подгонки теоретических кривых к экспериментальным (на длинах волн 260 и 270 нм) при нагревании и охлаждении не отличались от среднего не более чем на 10%. Усредненные значения величин термодинамических параметров для каждого комплекса использовали в дальнейшем анализе. В случае нативных ДНК/ДНК дуплексов в присутствии 10мМ Na⁺ в шести из 21 случаев температура плавления оказалась менее 20 °С, что не позволило достоверно определить величины термодинамических параметров комплексообразования.

3.3.7.1. Анализ полученных результатов термодинамических параметров комплексообразования

Набор модельных ДНК дуплексов был сконструирован таким образом, чтобы образование таких комплексов протекало без промежуточных состояний и могло быть описано в рамках модели все-или-ничего (см. раздел 1.4.). Кроме того, ранее было показано, что процесс образования ФГО/ДНК дуплексов может быть описан таким же образом (раздел 3.3.3.). Даже полная модификация одной из цепей не приводит к нарушению формы спирали. Таким образом для исследований были выбраны дуплексы длины 8, 10 и 12 пар оснований (ср. значение 10.1 п.о.), средним ГЦ-составом - 0.5 (максимум 0.8 и минимум 0.3). Количество модифицированных динуклеотидных пар во всем наборе дуплексов в среднем составило 68, причем наименьшее количество вхождений было у 5'-А*С-3'/5'-GT-3' – 55, а наибольшее количество было у 5'-G*С-3'/5'-GC-3' – 86. Термодинамические параметры, полученные анализом профилей кривых плавления для ФГО/ДНК и ДНК/ДНК дуплексов в различных солевых условиях представлены в Таблице 18.

Таблица 18. Средние, максимальные и минимальные величины термодинамических параметров комплексообразования для ФГО/ДНК и ДНК/ДНК дуплексов во всех исследованных солевых условиях.

	ΔS° , кал· моль ⁻¹ К ¹	ΔH° , Ккал/мол ь	ΔG°_{37} , Ккал/мол ь	Тпл, С	ΔS° , кал· моль ⁻¹ К ¹	ΔH° , Ккал/мол ь	ΔG°_{37} , Ккал/мол ь	Тпл, С
	ФГО/ДНК				ДНК/ДНК			
	1М NaCl				1М NaCl			
Ср.знач	-170.1	-61.1	-8.3	37.7	-194.8	-71.2	-10.8	48.5
Макс	-113.0	-41.3	-6.2	53.7	-109.5	-41.0	-7.0	64.8
Мин	-255.5	-91.9	-12.6	24.8	-268.2	-99.3	-16.1	30.3
	100мМ NaCl				100мМ NaCl			
Ср.знач	-174.7	-62.6	-8.4	38.2	-186.1	-66.5	-8.8	39.9
Макс	-115.6	-41.7	-5.9	52.0	-118.8	-42.7	-5.8	54.6
Мин	-230.0	-83.1	-11.8	22.3	-250.9	-90.6	-12.8	22.0
	10мМ NaCl				10мМ NaCl			
Ср.знач	-177.6	-63.7	-8.6	39.1	-168.4	-57.6	-5.3	22.5
Макс	-109.7	-40.6	-6.3	52.6	-102.1	-36.7	-3.0	40.6
Мин	-248.8	-88.4	-12.2	25.8	-266.6	-91.7	-9.0	9.5

Как видно из представленных данных снижение концентрации ионов Na^+ в случае нативных ДНК/ДНК дуплексов приводит к значительному снижению термостабильности таких комплексов, что согласуется с литературными данными [152]. Так, уменьшение концентрации Na^+ с 1010 мМ до 110 мМ приводит в среднем к уменьшению свободной энергии Гиббса на 2 ккал/моль, а температуры плавления на 8.4 °С, а снижение с 110 мМ до 10 мМ приводит в среднем к уменьшению свободной энергии Гиббса на 2.5 ккал/моль, а температуры плавления на 17.4 °С. Сопоставление полученных данных для нативных ДНК/ДНК дуплексов в 1010 мМ и 110 мМ Na^+ с данными, рассчитанными при помощи модели ближайших соседей [73,78] дает среднее значение величины ошибки предсказания температуры плавления близкое к нулю, а среднее значение абсолютной величины ошибки 2.0 и 1.9 °С соответственно. Среднее значение абсолютной разности экспериментально полученных и рассчитанных величин энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса комплексообразования составили 5 ккал/моль, 15 ккал/моль/К и 0.43 ккал/моль, соответственно. Эти величины близки как к погрешности экспериментальных исследований (~10% для

энтальпии и энтропии, ~3% для свободной энергии Гиббса [30]), так и к точности предсказательной модели ближайших соседей (~11-13 % для энтальпии и энтропии, ~3% для свободной энергии Гиббса [70,82]). Более низкое значение ошибки в определении свободной энергии Гиббса связано с корреляцией значений энтальпии и энтропии комплексообразования [164].

Высокая прогностическая способность модели ближайших соседей для исследованной выборки ДНК/ДНК дуплексов дополнительно подтверждает применимость модели все-или-ничего (двух состояний) для описания процесса их термической денатурации.

В случае ФГО/ДНК дуплексов наблюдается незначительное повышение термической стабильности с уменьшением ионной силы раствора, как и в случае модельных комплексов, размером 8, 10 и 12 п.о. (раздел 3.1.3.). Усредненные значения по всей выборке близки для ФГО/ДНК и ДНК/ДНК дуплексов условиях в 100 мМ NaCl. Так же наблюдается энтальпийно-энтропийная корреляция как для нативных, так и для ФГО/ДНК дуплексов со значением R^2 более 0.99.

3.3.7.2. Предсказательные модели для расчетов термодинамических параметров комплексообразования ФГО/ДНК дуплексов

Полученные результаты указывают на возможность построения прогностических моделей для расчета энергии формирования и температуры плавления ФГО/ДНК комплексов. Мы ожидаем, что будет возможно применение модели ближайших соседей для ФГ-содержащих олигомеров. В рамках этого проанализированы два подхода. В первом случае, анализировали разницу в величинах термодинамических параметров ФГО/ДНК комплексов с величинами для ДНК/ДНК дуплексов той же нуклеотидной последовательности, определенных в стандартных условиях (1М NaCl, нейтральные значения pH). Последние были взяты ввиду того, что модель ближайших соседей для предсказания гибридизационных свойств, в большинстве случаев, как нативных, так и модифицированных НК-комплексов, создана именно для таких буферных условий [73,76,77]. Второй подход предполагает анализ величин термодинамических параметров комплексообразования полностью

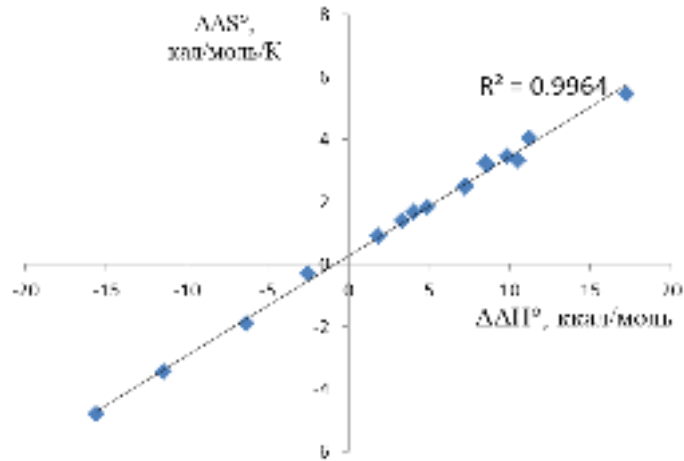


Рисунок 43. Энтальпийно-энтропийная компенсация для инкрементов БС для ФГ модифицированных динуклеотидных шагов .

модифицированных ФГО с ДНК в рамках приближения ближайших соседей. В рамках обоих подходов использовали метод множественной линейной регрессии для определения величин термодинамических инкрементов [82].

В рамках первого подхода анализировали разностные величины:

$$\Delta\Delta H^\circ = \Delta H^\circ(\text{ФГО/ДНК}) - \Delta H^\circ(\text{ДНК/ДНК}, 1\text{M NaCl})$$

$$\Delta\Delta S^\circ = \Delta S^\circ(\text{ФГО/ДНК}) - \Delta S^\circ(\text{ДНК/ДНК}, 1\text{M NaCl})$$

$$\Delta\Delta G^\circ_{37} = \Delta G^\circ(\text{ФГО/ДНК}) - \Delta G^\circ(\text{ДНК/ДНК}, 1\text{M NaCl})$$

В рамках такого анализа полученные вклады от динуклеотидных шагов для $\Delta\Delta H^\circ$ и $\Delta\Delta S^\circ$ только в 5 и 6 из 16 шагов получились статистически достоверными (Р-значение < 0.05). Но для них так же наблюдается энтальпийно-энтропийная корреляция (Рисунок 43), и тогда можно записать соотношение для $\Delta\Delta H^\circ$ и $\Delta\Delta S^\circ$:

$$\Delta\Delta S^\circ = \Delta\Delta H^\circ / 324 (\text{K}) - 0.76 (\text{кал/моль/К})$$

Это значит, что энтальпийный вклад в дестабилизацию будет практически полностью компенсирован энтальпийным вкладом. Такие энтальпийно-энтропийные компенсации так же были показаны для дитиоатных (PS2) производных ($\Delta\Delta S^\circ = \Delta\Delta H^\circ / 347 (\text{K}) - 1.03 (\text{кал/моль/К})$) и для однонуклеотидных несоответствий (мисматчей) ($\Delta\Delta S^\circ = \Delta\Delta H^\circ / 360 (\text{K}) - 0.67 (\text{кал/моль/К})$) [165].

Наиболее статистически достоверными параметрами, определенными путем множественной линейной регрессии, были величины $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$ (Рисунок 44). Для них только для четыре динуклеотидных шагов полученные значения являлись статистически недостоверными. Наибольший дестабилизирующий эффект оказывает введение модификации в фосфатный остаток в динуклеотидный шаг С*С. В целом введение такой модификации в Пиримидин-Пиримидиновый шаг наибольшим образом снижает стабильность такого дуплекса, в то время как введение модификации в Пиримидин-Пуриновую пару оказывает наименьший эффект. Полученные данные показывают, что термодинамический эффект от введения модификации в значительной степени зависит от модифицируемого

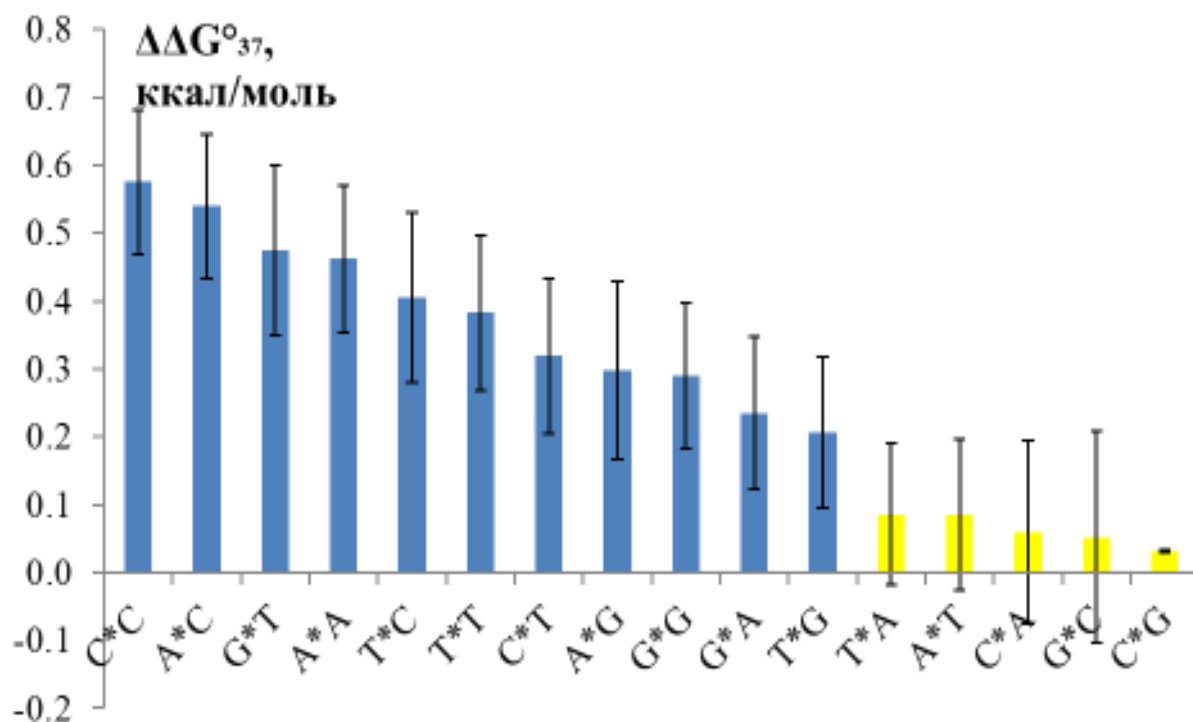


Рисунок 44. Графическое представление средних значений разностных инкрементов для свободной энергии Гиббса для всех динуклеотидных шагов. Желтым выделены инкременты, для которых P-значение > 0.05.

динуклеотидного шага.

Использование полученных параметров на обучающей выборке дает следующие значения ошибок для энтальпии, энтропии, свободной энергии Гиббса комплексообразования и температуры плавления: 4.2 ккал/моль, 13 ккал/моль/К, 0.5 ккал/моль и 1.4 °С, соответственно.

Во втором подходе для возможного использования полученных параметров для частично-модифицированных дуплексов в различных солевых условиях были использованы значения концевых поправок модели БС, определенных ранее для ДНК/ДНК дуплексов [166]. Кроме того, для учета солевой зависимости термодинамических параметров комплексообразования была введена поправка на активность воды, которая пропорциональна логарифму концентрации ионов натрия, умноженному на количество модифицированных фосфатов ($\ln([Na^+] * N_p)$).

Все полученные инкременты термодинамических параметров ΔH° и ΔG°_{37} для динуклеотидных шагов кроме 5'-A*T-3'/5'-AT-3' и поправки на модифицированные фосфатные остатки были статистически значимыми (Р-значение <0.05), а в случае ΔS° - 5 инкрементов были статистически незначимыми. Сопоставление расчетных величин с экспериментальными данными не показали корреляции ни с длиной, ни с долей GC-пар в дуплексе. Поправка, связанная с солевыми условиями, не является чисто энтропийной (как в случае нативных НК). При уменьшении ионной силы термическая стабильность дуплекса с ФГ модификациями возрастает, что согласуется с выше описанными результатами для олигонуклеотидов длиной 8, 10 и 12 п.о. (см. раздел 3.1.3).

Использование полученных параметров на обучающей выборке дает следующие значения ошибок для энтальпии, энтропии, свободной энергии Гиббса комплексообразования и температуры плавления: 4.2 ккал/моль, 13 кал/моль/К, 0.3 ккал/моль и 1.4 °С, соответственно. По сравнению с первым подходом несколько лучше предсказывается свободная энергия Гиббса, в то время как точность определения остальных величин сопоставима (Рисунок 45).

Для валидации полученных параметров, проведен расчет термодинамических параметров комплексообразования двух полностью модифицированных ($d(AAGAGAGAGG)/d(CCTCTCTCTT)$) комплексов при различных ионных силах раствора (всего 12 различных наборов термодинамических параметров) и для комплекса ($d(GCGCCAAACA)/d(TGTTTGGCGC)$), содержащего частично

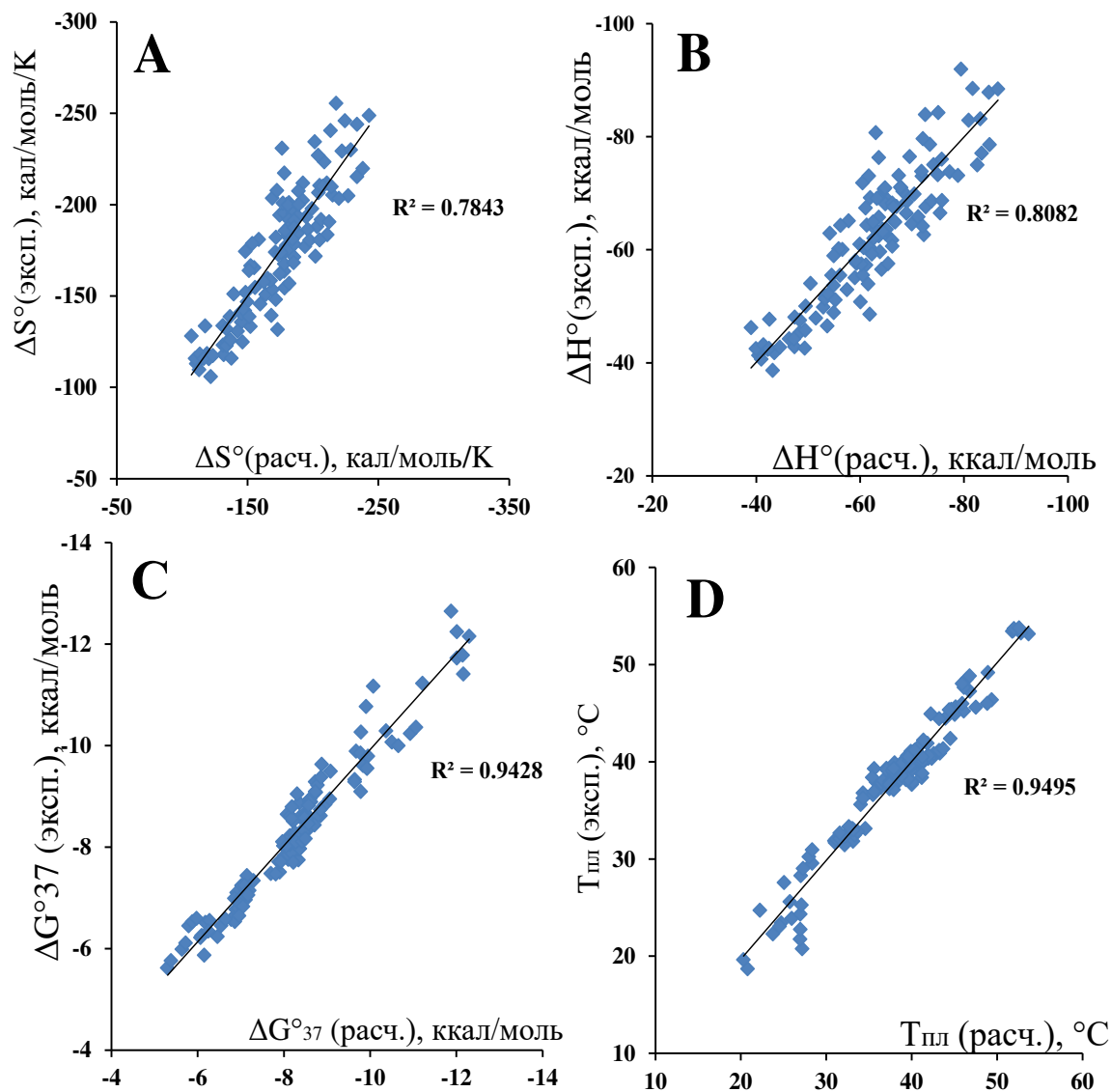


Рисунок 45. Сравнение экспериментальных и предсказанных на основе модели БС энтропии (А), энтальпии (В), свободной энергии Гиббса (С) комплексообразования и температур плавления (D).

модифицированный рибозо-фосфатный остов с разными паттернами модификации (от трех до 6 модифицированных фосфатных остатков) в различных солевых условиях (10, 110 и 1010 мМ $[\text{Na}^+]$, всего 24 набора термодинамических параметров) [19]. Параметры для модели БС для нативных ДНК/ДНК дуплексов в различных буферных условиях взяты из [166,167].

Для данной тестовой выборки (не включенной в обучающую выборку, использованную для получения значений термодинамических инкрементов) средние значения отклонений расчетных величин термодинамических параметров комплексообразования от экспериментально определенных величин составили для

энтальпии, энтропии, свободной энергии Гиббса комплексообразования и температуры плавления: 6.2 ккал/моль, 17.5 кал/моль/К, 0.5 ккал/моль и 1.8 °С соответственно. Данная точность сопоставима с таковой для нативных дуплексных структур (ДНК/ДНК, РНК/ДНК и РНК/РНК) для модели, построенной только в стандартных буферных условиях.

Таким образом, разработаны модели для расчета термодинамических параметров формирования дуплексов ДНК, содержащих как полностью, так частично ФГ–модифицированный олигомер при различной ионной силе раствора.

3.4. Расчет гибридизационных параметров на основе МД моделирования

3.4.1. МД моделирование ДНК/РНК и РНК/РНК комплексов

Для проверки прогностической способности методов компьютерного моделирования проведено исследование ДНК/РНК и РНК/РНК комплексов. В рамках этого проведено МД моделирование наборов комплексов и при помощи MMPBSA [168] и MMGBSA [91] рассчитаны энтальпия, а методами Q-Harm [91] и NMA [99] – энтропия комплексообразования для представительных выборок НК-дуплексов. Полученные значения сравнивали с экспериментальными. Характеристики наборов данных приведены в разделе “Материалы и методы”.

На первом этапе исследований были созданы молекулярные структуры и проведен расчет методом молекулярной динамики в явной водной оболочке в течении 100 нс для набора 65 ДНК/РНК [76] и 75 РНК/РНК [77] дуплексов, а также одноцепочечных (оц-) олигонуклеотидов, входящих в их состав. В случае самокомплементарных олигонуклеотидов расчеты проводили с двумя различными начальными скоростями атомов олигомеров. Полученные МД-траектории анализировали.

Анализ результатов моделирования РНК/РНК дуплексов показывает, что структура А-формы двойной спирали сохраняется вдоль всей траектории для всех комплексов. Отклонение геометрии спирали от исходной неуравновешенной

структуры при моделировании не превышает 2.5 Å (величина среднеквадратичного отклонения (СКО) между атомами). Среднее значение СКО вдоль МД траектории для всего набора комплексов составило 1.56 Å и не превышало 2.56 Å для каждого снимка траектории.

При моделировании ДНК/РНК дуплексов отклонение от стартовой структуры было значимо выше. Среднее значение СКО вдоль МД траектории для всего набора комплексов составило 2.26 Å и не превышало 3.86 Å для каждого снимка траектории.

Структуры ДНК/РНК и РНК/РНК дуплексов несколько отличаются. Анализ структуры комплексов проводили с помощью программного обеспечения X3DNA [169]. РНК/РНК комплексы имеют А-форму двойной спирали. ДНК/РНК дуплексы обладают промежуточной между А- и В-формами структурой. Такое различие конформаций известно и показано экспериментальными методами: ЯМР-спектроскопии [170,171], рентгеноструктурного анализа [123] и методом спектроскопии кругового дихроизма [172]. В связи с измененной структурой и термодинамикой формирования комплексов гомонуклеотидных последовательностей (например, комплексов A_n/U_n) в ДНК/РНК и РНК/РНК дуплексах наблюдаемыми экспериментально они были исключены из рассмотрения [173].

Анализ конформаций одноцепочечных олигонуклеотидов показал значительные структурные перестройки как в ДНК, так и в РНК цепях при моделировании. В большинстве случаев наблюдается разрушение одноцепочечного стэкинга между прилегающими основаниями в отдельных динуклеотидных шагах, а в некоторых случаях – формирование внутримолекулярных шпилечных структур, которые могут быть достаточно устойчивыми на длине траектории в 100 нс. Это приводит к существенно большим значениям СКО, как усредненным вдоль траектории (5.3 Å для РНК и 5.7 Å для ДНК цепи, в среднем для всех исследованных олигонуклеотидов), так и их максимальным отклонениям от начальных структур (8.0 и 9.5 Å, для РНК и ДНК цепей соответственно). Такое поведение одноцепочечных форм типично для

нуклеиновых кислот, что подтверждается экспериментальными данными [111,174] и результатами компьютерного моделирования [175,176].

3.4.1.1. Энергия формирования РНК/РНК комплексов

Энергию формирования комплексов НК определяли, как разницу энергий двухцепочечного и одноцепочечного состояний. Основываясь на данных МД-моделирования рассчитывали изменение внутренней энергии комплексообразования, используя методы MMPBSA и MMGBSA. Для расчета вклада конфигурационной энтропии НК-цепей применяли методы NMA и Q-Harm. Определение вклада одноцепочечных состояний проводили, используя анализ МД траекторий двух отдельных олигонуклеотидов (трехтраекторный подход, 3tr). Альтернативно, из МД-траектории НК-дуплексов вычленяли отдельные олигонуклеотиды и использовали полученный набор конформаций для расчетов (однотраекторный подход, 1tr). Расчет энергии Гиббса комплексообразования проводили, используя комбинации полученных значений энтальпии и энтропии формирования комплексов в рамках одно- или трехтраекторного подходов.

Сопоставление экспериментально определенных величин термодинамических параметров и величин, полученных с использованием одно- и трехтраекторных подходов для РНК/РНК комплексов приведено на Рисунке 46 и в Таблице 19. Наилучшая корреляция величин экспериментальных и расчетных энтальпий комплексообразования наблюдается при использовании метода MMGBSA и трехтраекторного подхода. Коэффициент корреляции R^2 (где R коэффициент корреляции Пирсона) составляет 0.72. При этом наклон зависимости близок к единице (0.95), а свободный член линейной зависимости составляет всего 4.6 ккал/моль. Это результирует в средней абсолютной величине ошибки предсказания энтальпии комплексообразования 8.1 ккал/моль или 16.3%.

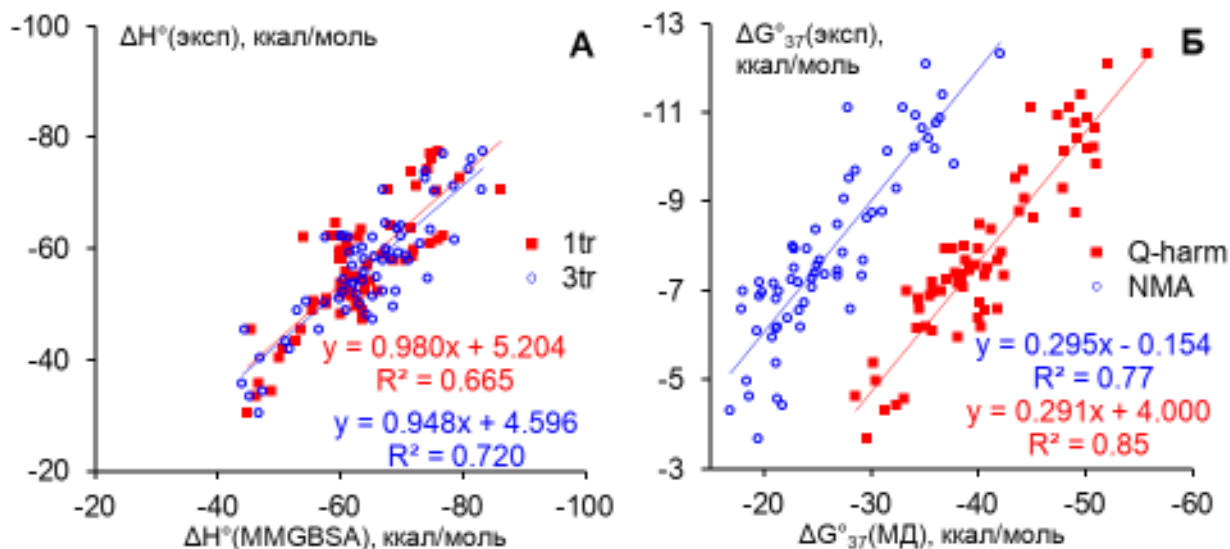


Рисунок 46. Корреляция значений энергий, определённых экспериментально и рассчитанных на основании МД анализа для РНК/РНК дуплексов. (А) Значения энтальпий, рассчитанные методами MMGBSA с использованием анализа одной и трех траекторий. (Б) Сопоставление энергий Гиббса (при 37 °С), определенной экспериментально и на основании анализа одной МД-траектории комбинацией методов MMGBSA и NMA или Q-Harm.

Использование метода MMPBSA показывает существенно худшую корреляцию экспериментальных и расчетных величин, чем MMGBSA с более высокой величиной средней абсолютной ошибки в случае однотоекторного подхода и существенно более низкой при трехтраекторном рассмотрении (Таблица 19).

Введение линейной эмпирической поправки к рассчитанным величинам энтальпии комплексообразования, полученной из корреляции расчетных и экспериментальных значений ($\Delta H^0(\text{эксп.}) = a \cdot \Delta H^0(\text{МД}) + b$) приводит к тому, что величина абсолютной ошибки снижается до уровня 3.7 ккал/моль, а относительной – до 8.1% при расчетах методом MMGBSA (3tr), что ниже типичной экспериментальной точности определения энтальпии комплексообразования (10%) [70].

Величины энтропии формирования комплексов рассчитывали методами Q-Harm и NMA при анализе одной или трех независимых траекторий. Сопоставление рассчитанных и экспериментальных значений показывает, что наилучшая корреляция ($R^2 = 0.67$) наблюдается при использовании квазигармонического приближения при анализе одной траектории (Таблица 19).

Таблица 19. Сопоставление величин термодинамических параметров, определённых экспериментально и полученных при анализе МД-траекторий для РНК/РНК дуплексов.

	Метод расчета	a	b	R ²	< ΔE > [#]	< ΔE / E >	< ΔE* > [#]	< ΔE* / E* >
ΔH°								
1tr	MMGBSA	0.98	5.20	0.66	7.2	14.5%	5.1	9.29%
	MMPBSA	0.68	-33.39	0.16	21.9	38.3%	7.9	14.61%
3tr	MMGBSA	0.95	4.60	0.72	8.1	16.3%	3.7	8.09%
	MMPBSA	1.06	5.78	0.68	5.0	10.1%	4.1	8.81%
ΔS°								
1tr	Q-Harm	2.40	13.64	0.67	83.4	54.0%	13.5	8.73%
	NMA	1.47	16.48	0.60	118.4	77.2%	14.6	9.47%
3tr	Q-Harm	1.68	-15.12	0.63	70.6	45.9%	12.3	9.16%
	NMA	1.13	-34.99	0.42	48.2	30.0%	14.8	11.93%
ΔG° ₃₇								
1tr	PB+Q-Harm	0.14	-6.22	0.18	5.5	79.3%	1.40	19.22%
	GB+Q-Harm	0.29	4.00	0.85	31.9	433.8%	0.68	8.63%
	PB+NMA	0.07	-8.08	0.07	10.6	145.5%	1.54	20.62%
	GB+NMA	0.30	-0.15	0.77	17.7	238.2%	0.74	10.92%
3tr	PB+Q-Harm	0.22	-0.48	0.50	22.9	331.2%	0.89	18.34%
	GB+Q-Harm	0.22	0.78	0.58	28.1	407.3%	0.84	18.05%
	PB+NMA	0.22	-2.26	0.52	16.1	226.9%	0.92	18.26%
	GB+NMA	0.26	0.15	0.71	20.9	297.5%	0.87	17.85%

Коэффициенты a и b – определены методом наименьших квадратов из корреляции расчетных и экспериментальных величин термодинамических параметров в рамках каждого метода расчета, например, для величин энтальпии $\Delta H^0(\text{экс.}) = a \cdot \Delta H^0(\text{МД}) + b$. R² – коэффициент корреляции этой зависимости.

<|ΔE|> и <|ΔE|/|E|>- среднее значение абсолютной и относительной ошибки расчета термодинамического параметра. Значения <|ΔE*|> и <|ΔE*|/|E*|> рассчитаны после линейной коррекции (коэффициенты a и b) величин термодинамических параметров, полученных методами компьютерного анализа.

- Размерность величины средней абсолютной ошибки расчета энтальпии и свободной энергии Гиббса комплексообразования – ккал/моль, энтропии – кал/моль/К.

Среднее значение величины относительной ошибки расчета энтропии в этом случае составляет 83.4 кал/моль/К или 54%. Это в процентном отношении значимо хуже, чем при оптимальном MMPGSA методе расчета энтальпии с использованием трехтраекторного анализа. При трехтраекторном анализе ошибки расчета энтропии комплексообразования в 1.2-2.5 раз ниже, однако, при этом наблюдаемые корреляции существенно хуже. Необходимо отметить, что в линейных зависимостях коэффициент пропорциональности между расчётными и экспериментальными величинами энтропий лежит в диапазоне 1.13 – 2.4, а свободный член линейной зависимости -34.99 – +16.48 кал/моль/К. Это

показывает, что конфигурационная энтропия в значительной степени коррелирует с энтропией комплексообразования, но не вносит в нее определяющий вклад. Использование линейной поправки для приближения расчетных величин энтропии комплексообразования к экспериментальным данным дает значимое снижение ошибки расчета до 8.7% при использовании квазигармонического приближения в рамках однотраекторного подхода (Таблица 19). Менее достоверная предсказательная способность энтропии при трехтраекторном подходе наиболее вероятно связана с неполным покрытием конфигурационного пространства одноцепочечных олигомеров при данной длине траектории в рамках метода классической молекулярной динамики. Кроме того, наблюдаемое значимое различие в энтропии также зависит от ионной силы раствора, которая при моделировании отличается от стандартных условий (1 М NaCl, нейтральные значения pH), в которых были проведены экспериментальные исследования. В одном из классических представлений влияние концентрации одновалентных ионов на термостабильность межмолекулярных НК-комплексов может быть представлено в виде энтропийной поправки, пропорциональной логарифму концентрации катионов в растворе и числу отрицательно заряженных фосфатных остатков в НК-цепи [70,152]. Такая зависимость соответствует наблюдаемому тренду - линейной зависимости экспериментальных и расчётных энтропии формирования дуплексов. Однако, в полной мере учесть данный вклад в термостабильность НК-дуплексов в рамках применения метода классической молекулярной динамики не представляется возможным.

Экспериментально наиболее значимым является определение свободной энергии Гиббса комплексообразования. При расчете энергии Гиббса формирования дуплексов при одно- и трехтраекторном подходах рассмотрена прогностическая способность комбинаций методов расчета энтропии и энтальпии. Результаты анализа корреляций расчётных и экспериментальных значений приведены на Рисунке 46 и в Таблице 19. Наилучшая корреляция с $R^2 = 0.85$ наблюдается при использовании однотраекторного анализа методами MMPGSA и Q-Harm при оценке энтальпии и энтропии комплексообразования, соответственно.

Наблюдается значительный наклон (0.29) и ненулевой свободный член (-4.0 ккал/моль) линейной зависимости (Рисунок 46.Б). Это приводит к большим значениям величины абсолютной ошибки. Как видно из данных для прогноза энтальпии и энтропии комплексообразования (Таблица 19) оба этих компонента вносят вклад в наклон, отличный от единицы, и пересечение с осью абсцисс не равное нулю. Учет линейной корреляции существенно снижает ошибку до 0.68 ккал/моль или 8.63%, что фактически совпадает со средней экспериментальной ошибкой для НК дуплексов (~7 %).

Проведенный анализ показывает достаточно близкие экспериментальные и расчётные значения (без учета линейных поправок) энергий комплексообразования только для изменения энтальпии, рассчитанного методом MMGBSA в рамках трехтраекторного анализа. Сопоставимые значения ошибок дает модель ближайших соседей (БС). Мы сравнили опубликованные ранее инкременты формирования динуклеотидных шагов спирали и инкременты, рассчитанные на основании собранной нами экспериментальной базы данных и соответствующих величин, полученных с помощью компьютерного анализа (Рисунок 47).

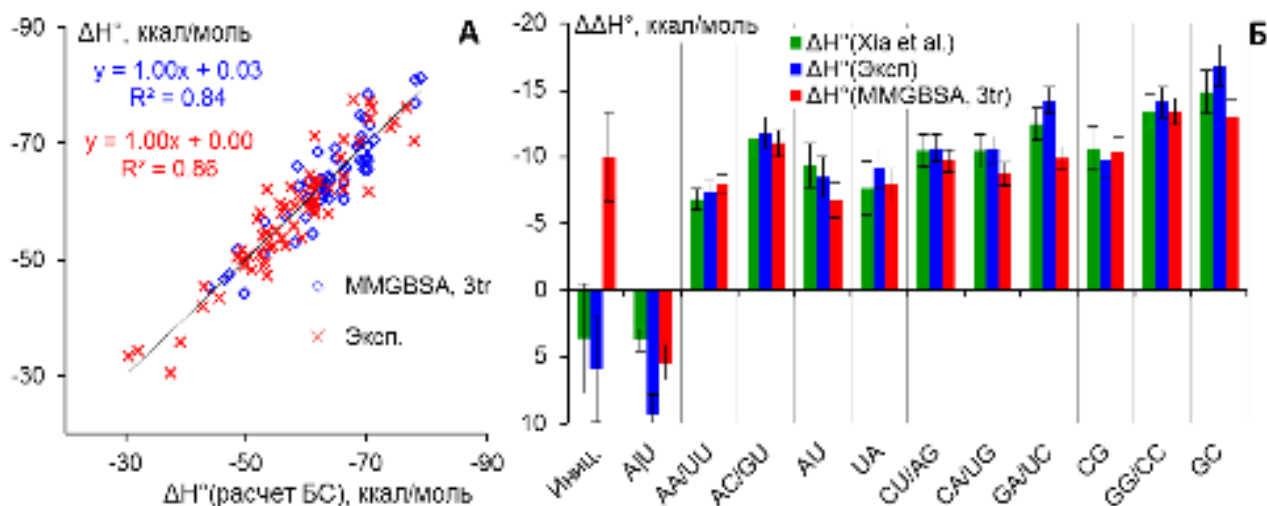


Рисунок 47. (А) Прогностическая способность метода ближайших соседей (5'-NN/NN-3') для расчета энтальпии образования РНК/РНК дуплексов, определенной экспериментально и с использованием метода MMGBSA при анализе трех траекторий. (Б) Сопоставление инкрементов модели ближайших соседей для РНК/РНК комплексов, опубликованных ранее (Xia et al., [37]), определенных на основании экспериментальных данных (Эксп) и рассчитанных с использованием метода MMPBSA при анализе трех траекторий (MMGBSA, 3tr).

Модель БС одинаково хорошо описывает экспериментальные данные и величины, рассчитанные методом MMPBSA с использованием трех траекторий (Рисунок 47.А). Все инкременты являются значимыми (Р-значения менее 4×10^{-6}), за исключением инкремента фактора инициации для экспериментальных данных (Р-значение равно 0.14).

Представленные в литературе и определенные нами на основании экспериментальных и расчетных данных величины формирования динуклеотидных пар близки между собой и одинаковы в рамках погрешностей, за исключением инкрементов для GA/UC и GC/CG, полученных из компьютерных расчетов методом MMPBSA (Рисунок 47.Б). Для них разница с экспериментально определенными величинами для исследованной базы данных составляет 4.3 и 3.8 ккал/моль соответственно. Наиболее значимое различие наблюдается для фактора инициации, величина которого составляет -9.9 ккал/моль при анализе МД-траекторий и +5.9 ккал/моль при анализе этой же базы данных экспериментальных значений, что, вероятно, связано с низкой значимостью инкремента, определенного на основании экспериментальных данных. Аналогично, более отрицательной оказывается поправка, связанная с наличием концевой A|U пары: +5.4 против +9.4 ккал/моль соответственно. Это может быть связано с не вполне корректным учетом взаимодействия концевых пар оснований, в том числе, недостаточно длинной МД траекторией, чтобы учесть эффект открывания концевых пар с высокой достоверностью. Вместе с тем совокупность полученных данных указывает на адекватность использованного подхода, включающего моделирование методом молекулярной динамики (силовое поле и способ моделирования) и расчет энергии методом MMPBSA для учета взаимодействий внутри дуплексной структуры РНК.

3.4.1.2. Энергия формирования ДНК/РНК комплексов

В случае гибридных ДНК/РНК дуплексов проведенные расчеты показывают существование линейной корреляции расчетных и экспериментальных величин энтальпий комплексообразования (Рисунок 48, Таблица 20). Для величин

изменения энтальпии хорошая корреляция наблюдается только при анализе одной траектории методом MMGBSA ($R^2 = 0.71$). Наклон такой зависимости относительно близок к единице и составляет 0.841, а свободный член линейной зависимости близок к нулю (-1.0 ккал/моль). Для данного способа расчета энтальпии относительная ошибка составляет 23%, а абсолютная – 12.0 ккал/моль. Во всех остальных случаях коэффициент корреляции R^2 не превышает 0.64. Вместе с тем при трехтраекторном анализе методом MMPBSA значение абсолютной ошибки расчета оказывается минимальным (16% и 11.4 ккал/моль) при отсутствующей корреляции ($R^2 = 0.13$), как и в случае РНК/РНК комплексов (Таблицы 19 и 20).

Введение линейной поправки приводит к снижению ошибки до уровня 8.2% (5.1 ккал/моль) в случае метода MMGBSA при анализе траектории только ДНК/РНК дуплексов, близкой к таковой для РНК/РНК комплексов.

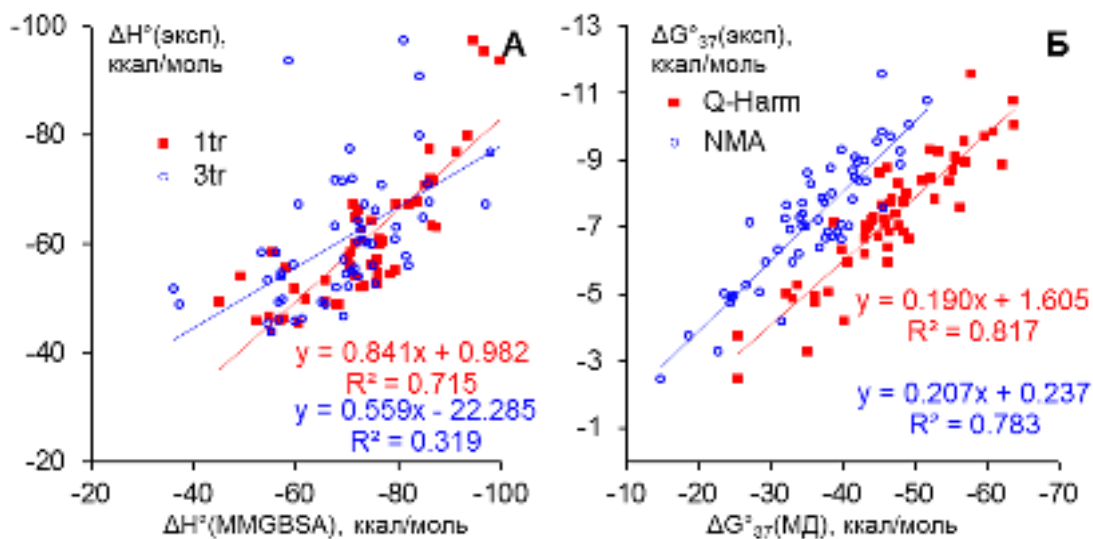


Рисунок 48. Корреляция значений энергий, определённых экспериментально и рассчитанных на основании МД анализа для ДНК/РНК дуплексов. (А) Значения энтальпий, рассчитанные методами MMGBSA с использованием анализа одной и трех траекторий. (Б) Сопоставление инкрементов модели ближайших соседей для ДНК/РНК комплексов, опубликованных ранее, определённых на основании экспериментальных данных [7] и с использованием метода MMPBSA при анализе одной траектории.

Таблица 20. Сопоставление величин термодинамических параметров, определённых экспериментально и полученных при анализе МД-траекторий для ДНК/РНК дуплексов. Обозначения даны в сносках к Таблице 19.

	Метод расчета	a	b	R ²	< ΔE > [#]	< ΔE / E >	< ΔE* > [#]	< ΔE* / E* >
ΔH°								
1tr	MMGBSA	0.84	1.0	0.71	12.0	22.9%	5.1	8.2%
	MMPBSA	0.49	-44.7	0.64	25.1	44.0%	8.9	10.8%
3tr	MMGBSA	0.56	-22.3	0.32	11.3	21.3%	7.9	12.6%
	MMPBSA	0.41	-36.9	0.13	11.4	16.0%	8.7	13.8%
ΔS°								
1tr	Q-Harm	1.81	-15.3	0.55	78.2	49.0%	19.0	14.3%
	NMA	1.77	41.1	0.74	47.5	29.2%	14.3	8.4%
3tr	Q-Harm	1.33	-31.8	0.66	60.9	38.3%	16.8	9.5%
	NMA	1.55	-3.0	0.53	57.6	35.5%	20.0	11.4%
ΔG° ₃₇								
1tr	PB+Q-Harm	0.05	-6.97	0.04	4.7	81.0%	1.94	23.4%
	GB+Q-Harm	0.19	1.60	0.82	35.8	561.1%	0.62	9.3%
	PB+NMA	0.02	-7.38	0.00	10.5	171.6%	2.01	24.2%
	GB+NMA	0.21	0.24	0.78	26.3	407.0%	0.69	9.6%
3tr	PB+Q-Harm	-0.04	-8.39	0.06	18.4	317.2%	1.46	24.7%
	GB+Q-Harm	0.00	-7.36	0.00	26.8	451.4%	1.43	24.3%
	PB+NMA	-0.01	-7.65	0.01	17.0	287.1%	1.45	24.6%
	GB+NMA	0.03	-6.13	0.03	25.5	423.0%	1.38	23.5%

Значения энтропии формирования ДНК/РНК комплексов рассчитанные методом NMA при анализе одной траектории показывают наилучшую корреляцию с экспериментальными величинами ($R^2 = 0.74$). При этом среднее значение абсолютной ошибки составляет 47.5 кал/моль/К или 29% (Таблица 20). В случае использования квазигармонического приближения в однотоакторном анализе величина коэффициента корреляции оказывается меньше ($R^2 = 0.55$), а среднее значение абсолютной ошибки составляет 78.2 ккал/моль/К (49%). Коэффициент пропорциональности между расчётными и экспериментальными величинами энтропий ДНК/РНК комплексов лежит в диапазоне 1.3 – 1.8, а свободный член линейной зависимости -3.0 – +41 кал/моль/К, что указывает на существенное различие энтропии формирования комплекса, определенной экспериментально и рассчитанной конфигурационной энтропией. Коэффициент корреляции и наклоны близки к таковым в случае РНК/РНК комплексов (Таблицы 19 и 20), что указывает на общую природу наблюдаемых закономерностей для разных типов комплексов.

Расчет энтропии формирования РНК-содержащих дуплексов в рамках квазигармонического приближения при анализе одной траектории дает хорошую линейную корреляцию с экспериментальными данными, однако наклон линейной аппроксимации существенно отличается от единицы, что делает затруднительным применение такого подхода для оценки полной энтропии комплексообразования. Стоит отметить, что расчет энтальпии в квазигармоническом приближении является на несколько порядков более быстрым, чем при анализе нормальных мод колебаний. Это делает оправданным применение Q-Harm приближения при оценке энергии Гиббса для большого набора ДНК/РНК и РНК/РНК комплексов.

Величины энергии Гиббса формирования гибридных комплексов, рассчитанные на основании метода MMGBSA и конфигурационных энтропий в высокой степени коррелируют с экспериментальными значениями (Рисунок 49). Коэффициенты корреляции R^2 составляют 0.82 и 0.78 при расчете энтропии методами Q-Harm и NMA соответственно. В остальных случаях значимой корреляции не наблюдается ($R^2 < 0.06$).

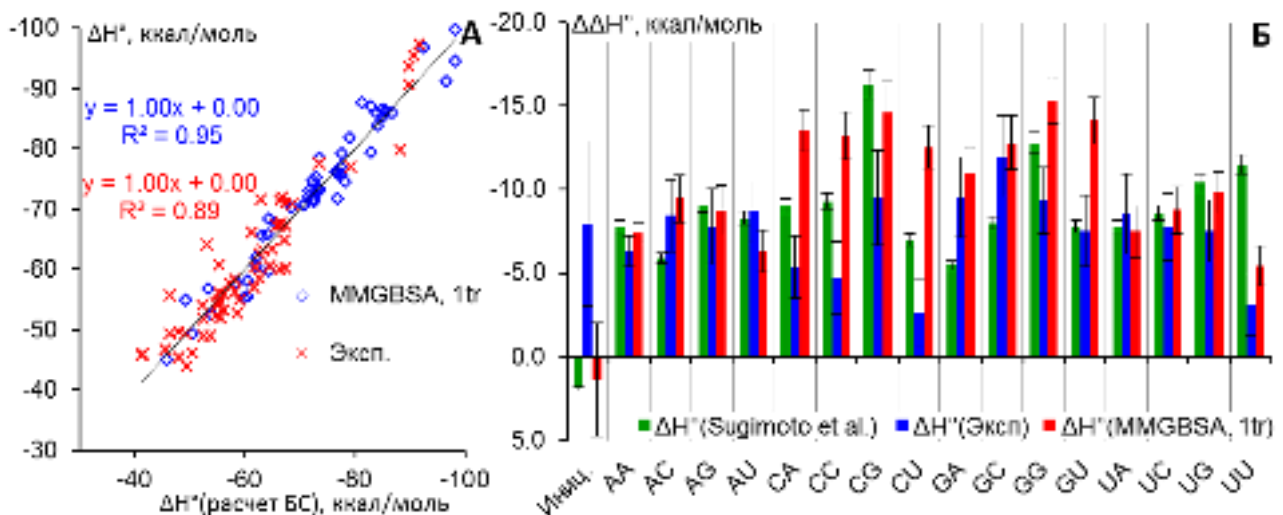


Рисунок 49. (А) Прогностическая способность метода ближайших соседей для расчета энтальпии образования ДНК/РНК дуплексов, определенной экспериментально и с использованием метода MMGBSA при анализе трех траекторий. (Б) Сопоставление инкрементов модели ближайших соседей для ДНК/РНК комплексов, опубликованных ранее, определенных на основании экспериментальных данных [7] и с использованием метода MMPBSA при анализе одной траектории.

Проведенный анализ применимости модели БС для описания величин энтальпии комплексообразования показывает высокую прогностическую

способность такой модели в применимости к данным, полученным экспериментально и методом MMPBSA (1tr) (Рисунок 49А). Инкременты модели БС описывающие фактор инициации формирования комплексов не являются статистически значимыми с Р-значениями 0.11 и 0.69 для экспериментальных и расчетных наборов данных. При анализе экспериментальной базы данных, низко значимыми являются значения энергетических инкрементов динуклеотидных пар CU/AG и UU/AA. Для величин энтальпий, рассчитанных при однотраекторном анализе методом MMGBSA, все инкременты, кроме фактора инициации, оказываются значимым с Р-значениями не более 4×10^{-5} . Опубликованные ранее и определенные нами величины инкрементов для экспериментальных данных существенно различаются для фактора инициации, динуклеотидных пар, у которых в РНК цепи с 5'-конца находится цитозин (rCX/dX'G, где X = A, C, U или G) или гуанин (rGX/dX'C), за исключением динуклеотидной пары rGU/dAC (Рисунок 25Б). Определенные нами инкременты rCX/dX'G имеют амплитуды ниже, а rGX/dX'C – выше, чем представленные в литературе. Также более низкий вклад в стабильность двойной спирали имеют инкременты UG и UU. Сопоставление инкрементов при анализе собранной нами базы данных показывает, что величины инкрементов rCX/dX'G, rGG/dCC и rGU/dAC экспериментальных энтальпий комплексообразования существенно ниже таковых при их определении методом MMGBSA из анализа одной МД траектории. Это может быть связано с несогласованностью силовых полей для ДНК и РНК при моделировании гибридных комплексов, которые были оптимизированы для ДНК/ДНК и РНК/РНК дуплексов. Кроме того, относительно малая выборка и низкое разнообразие длин и нуклеотидных композиций модельных комплексов приводит к достаточно высокому значению ошибок для отдельных инкрементов модели БС (Рисунок 49Б). Расширение выборки должно в перспективе дать более надежные результаты.

Значительные отрицательные значения факторов инициации и концевых пар, полученные при анализе МД данных с помощью модели БС, превышают

таковые для данных из экспериментального анализа для РНК/РНК, ДНК/РНК и ДНК/ДНК [30] комплексов. Это указывает на систематическую ошибку при моделировании методом МД или расчетах методом MMGBSA. Исследования методом ЯМР показали, что концевые пары оснований находятся в постоянном равновесии между открытым и закрытым состояниями [53]. В то же время, “открытие” концевых пар наблюдается не для всех комплексов, и такие события не являются множественными для достоверного учета при расчете энергий. Несмотря на это, метод MMGBSA показывает наилучшую корреляцию экспериментальных и расчетных величин для всех трех типов комплексов.

Для выяснения сходимости полученных величин были проведены дополнительные расчёты (Рисунок 50). В них как для одно-, так и для трехтраекторного расчета для нескольких как ДНК/РНК, так и РНК/РНК систем выбраны различные частоты учета МД снимков в расчете как энтальпий комплексообразования, так и энтропийного вклада. В случае расчета

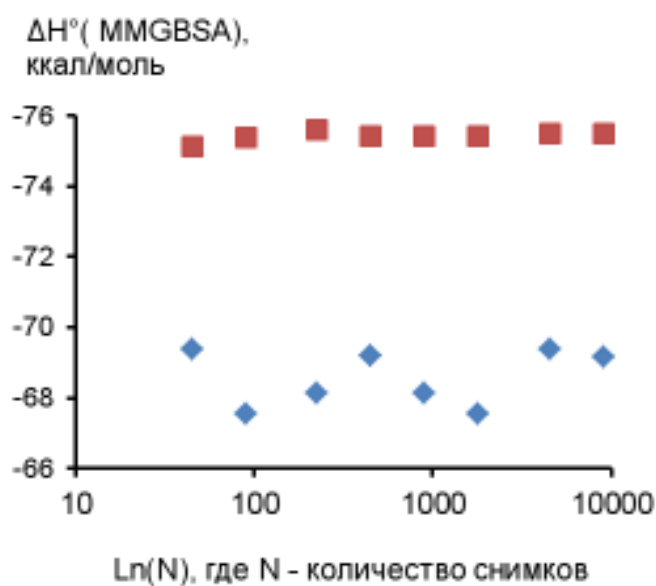


Рисунок 50. Сходимость расчетов. Значения рассчитанных методом MMGBSA энтальпии комплексообразования в одно- (красные квадраты) и трехтраекторном подходе (синие ромбы) для r(GACUAGGU)/d(ACCTAGTC).

энтропийного вклада при помощи метода нормальных мод сходилось к использованному в работе значению уже со 100 снимков. В квазигармоническом приближении количество использованных снимков очень влияло на результат, так, с понижением числа используемых снимков значительно увеличивался вклад от колебательной составляющей, что приводило к очень значимой переоценке.

В случае MMPBSA и MMGBSA сходимость получилась практически одинаковой (из-за практически полной корреляции данных величин). В однотраекторном подходе использование даже 100 снимков давало отклонение не более 1 ккал/моль, в то время как для

трехтраекторного подхода данные величины не сходились к какой-либо величине (Рисунок 50).

Проведенные нами исследования демонстрируют возможность расчета термодинамических параметров образования нативных комплексов нуклеиновых кислот с использованием подходов, основанных на методе классической молекулярной динамики.

3.4.2. Расчёт энергий формирования для комплексов с ФГО при помощи компьютерного моделирования

Предыдущие результаты указывают на возможность расчета энтальпии гибридизации и свободной энергии Гиббса на основании данных МД-моделирования и расчетов методами MMPB(GB)SA (molecular mechanics Poisson Boltzmann (Generalized Born) surface area calculations) [35]. В рамках проверки прогностической способности данных методов для производных нуклеиновых кислот проведен анализ набора комплексов ФГО. В случае успешности применения МД подходов для такого рода расчетов можно отрабатывать методики конструирования новых производных НК, еще химически не синтезированных, основываясь на предварительных данных *in silico* расчетов об гибридизационных свойствах.

Используя отработанные подходы для ДНК и РНК комплексов, проведен анализ комплексов ФГО с ДНК используя ранее полученные МД траекторий длиной 100 нс для окта-, дека- и додекамеров в силовом поле parmbsc1. Расчет проводили в рамках одно- и трехтраекторных подходов.

Энергии комплексообразования, вычисленные посредством анализа МД траекторий, находятся в том же диапазоне величин, что и экспериментальные для всех типов комплексов различной длины (Рисунок 51). Подход MMGBSA при анализе трех траекторий дает наиболее близкие к экспериментальным значения энергии гибридизации ДНК/ДНК дуплексов; эти значения отличались от энтальпий комплексообразования менее чем на 20%, что согласуется с результатами в силовом поле parmbsc0 [102]. Анализ только двухцепочечного

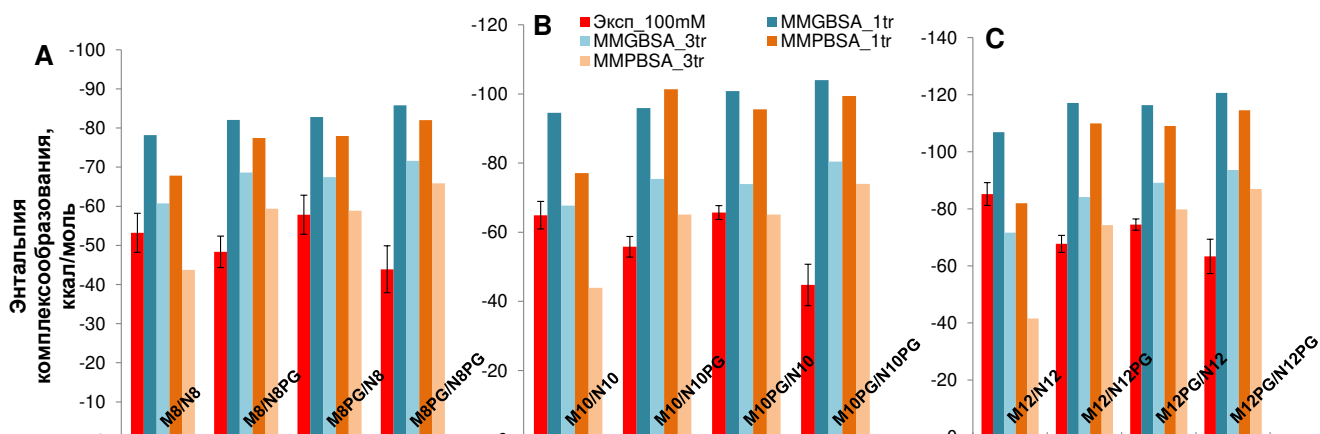


Рисунок 51. Сравнение энтальпий гибридизации при 100 мМ NaCl, определенных методом термической денатурации (Таблица 6), и энергий комплексообразования, рассчитанных с помощью подходов MMPB(GB)SA с использованием одной и трех траекторий для анализа модельных дуплесов длиной 8 п.о.(A), 10 п.о.(B) , 12 п.о. (C).

состояния дает большие значения ошибки энтальпии комплексообразования по сравнению с данными оптического плавления. Энергии гибридизации ДНК/ДНК дуплексов были меньше, чем у ФГО/ДНК комплексов, полученных во всех компьютерных расчетах, что противоречит экспериментальным данным, полученным методом термической денатурации. Есть много возможных причин. Первая - отсутствие отталкивания зарядов в модифицированных дуплексах, что невозможно полностью учесть с помощью силового поля, поскольку оно было разработано для нативных НК-дуплексов, а также в расчетах методами MMPB(GB)SA. Вторая причина - недостаточная прогностическая сила современных методов МД для расчета одноцепочечных состояний даже для нативных олигонуклеотидов. Третья - это неоптимизированные параметры силового поля для ФГ-модифицированного остова ДНК (например, углов, ковалентных связей и торсионных углов). Например, в случае LNA показано значительное улучшение предсказательной способности МД моделирования при расчете пространственной структуры их комплексов после оптимизации параметров силового поля [156]. Несмотря на это, результаты показали отличное качественное и количественное согласие в структуре, динамике ФГ-модифицированных олигонуклеотидов и их дуплексов, а также в гибридизационных свойствах ФГО, определенных экспериментальными методами и методом МД моделирования. Эти наблюдения подтверждают надежность

полученных данных и хорошее качество МД-моделирования и параметров силового поля parmbsc1.

Для более достоверного заключения о возможности применения предложенного *in silico* подхода расчета величин термодинамических параметров требуется анализ представительной выборки ФГ-содержащих комплексов (например, см. Таблица 5) что будет проведено нами в дальнейшем.

3.4.3. Расчёт энергий формирования комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК при помощи компьютерного моделирования

Расчёт энергий формирования для тандемных комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с комплементарными ДНК и РНК при помощи компьютерного моделирования проводили по модифицированной, относительно предыдущих расчетов для дуплексов с ФГО, процедуре. Такое отличие вызвано наличием не только вклада от прямого связывания олигомеров с протяжённой НК-цепью, но и дополнительно стабилизирующего кооперативного контакта.

Для расчёта энергий связывания и кооперативного взаимодействия были проанализированы траектории, полученные методом молекулярной динамики, с помощью методов MMGBSA и MMPBSA для оценки этих параметров была разработана процедура получения этих величин (Рисунок 52). Энергия связывания и кооперативного взаимодействия может быть рассчитана, если определить внутренние энергии формирования двух структур, представленных на Рисунке 52.

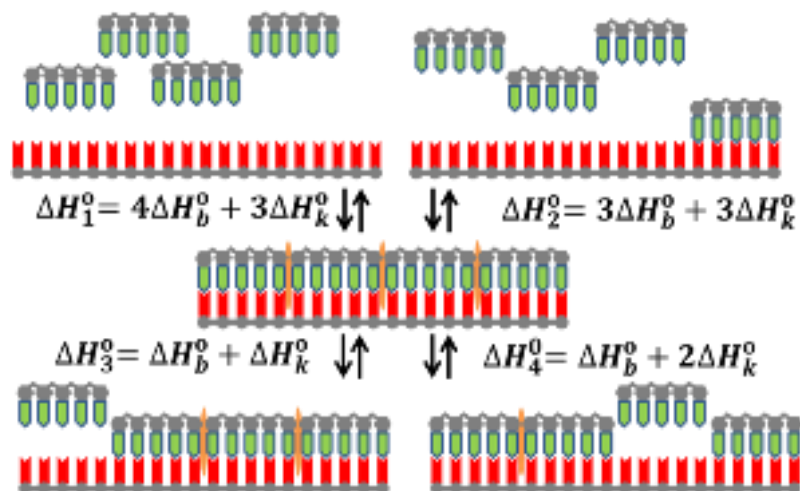


Рисунок 52. Схема определения энтальпий связывания и кооперативного контакта на основе методов MMPB(GB)SA. Оранжевым цветом показано кооперативное взаимодействие на стыке дуплексных структур.

На первом шаге требуется провести расчет энергии комплексообразования MMGB(PB)SA ΔH_n° ($n = 1-4$), соответствующие связыванию различного числа коротких олигомеров (четырёх, трех или одного из концевых или внутренних) к 20 звеной ДНК или РНК цепи и формирования полноразмерного комплекса.

Тогда, энтальпия связывания (ΔH_b°) или кооперативного контакта (ΔH_c°) могут быть получены, например, следующим образом:

$$\Delta H_b^\circ = \frac{2}{5} \Delta H_1^\circ - \frac{3}{5} \Delta H_4^\circ \quad (33)$$

$$\Delta H_c^\circ = \frac{4}{5} \Delta H_4^\circ - \frac{1}{5} \Delta H_1^\circ \quad (34)$$

$$\Delta H_b^\circ = \Delta H_1^\circ - 3\Delta H_3^\circ \quad (35)$$

$$\Delta H_c^\circ = 4\Delta H_3^\circ - \Delta H_1^\circ \quad (36)$$

Усредненные значения расчетных величин и экспериментально-определенных энтальпий связывания (ΔH_b°) или кооперативного контакта (ΔH_c°) приведены в Таблице 21.

Было получено, что энтальпии связывания для нативного и gM/РНК комплексов по абсолютному значению недооцениваются в MMGB(PB)SA расчетах. Компьютерные вычисления в среднем дают на 10 ккал/моль меньшие значения, чем определенные при помощи экспериментальной методики. Обратная ситуация замечена для $(gMA_5)_4/T_{20}$ для которого ΔH_b° на 13.6 ккал/моль по абсолютному значению превышала экспериментальную энтальпию связывания.

Таблица 21. Энтальпии связывания, кооперативного контакта и эффективные значения (ккал/моль) полученные при помощи компьютерных расчетов и экспериментально (exp).

	MMGBSA			MMPBSA		
	ΔH_b°	ΔH_c°	ΔH_{eff}°	ΔH_b°	ΔH_c°	ΔH_{eff}°
$(dA_5)_4/U_{20}$	-28.2	-10.0	-35.7	-23.5	-3.0	-25.8
$(dA_5)_4/U_{20} \text{ exp}$	-39.5	-10.8	-47.6	-39.5	-10.8	-47.6
$(gMA^1_5)_4/U_{20}$	-37.2	-2.0	-38.7	-44.0	2.2	-42.3
$(gMA^2_5)_4/U_{20}$	-37.5	-4.2	-40.6	-44.7	1.6	-43.5
$(gMA^{1,2}_5)_4/U_{20}$	-37.2	-3.6	-39.9	-44.8	2.4	-43.0
СРЕДНЕЕ $(gMA_5)_4/U_{20}$	-37.3	-3.3	-39.8	-44.5	2.1	-42.9
$(gMA_5)_4/U_{20} \text{ exp}$	-45.3	-19.1	-59.7	-45.3	-19.1	-59.7

$(dA_5)_4/T_{20}$	-35.9	-5.3	-39.8	-28.3	2.7	-26.2
$(dA_5)_4/T_{20} \text{ exp}$	-43.9	-16.2	-56.1	-43.9	-16.2	-56.1
$(gMA^1_5)_4/T_{20}$	-40.5	-4.0	-43.5	-45.9	0.9	-45.2
$(gMA^2_5)_4/T_{20}$	-49.8	-5.4	-53.9	-56.0	-0.4	-56.3
$(gMA^{1,2}_5)_4/T_{20}$	-41.1	-2.1	-42.6	-46.6	3.0	-44.4
СРЕДНЕЕ $(gMA_5)_4/T_{20}$	-43.8	-3.8	-46.7	-49.5	1.2	-48.6
$(gMA^{1,2}_5)_4/T_{20} \text{ exp}$	-30.2	-11.2	-38.6	-30.2	-11.2	-38.6

Значения величин кооперативного контакта рассчитанные при помощи MMGBSA для модифицированных комплексов значительно недооценивают эти значения, а для нативного комплекса $(dA_5)_4/T_{20}$ на 10.9 ккал/моль, в случае $(dA_5)_4/U_{20}$ расчетное и экспериментальные значения близки. В случае MMPBSA величины расхождений проявляются еще более значительно. Рассчитанные величины эффективных величин энтальпии комплексообразования были ниже по абсолютному значению для ДНК/ДНК, ДНК/РНК и gM/РНК тандемных комплексов и выше в случае gM/ДНК.

Энергии связывания всех конформеров gM с РНК были одинаковыми. Напротив, энергии кооперативного взаимодействия аксиального конформера и смешанных аксиально-экваториальных конформаций были немного ниже (на -1.6 и -2.2 ккал / моль), чем экваториальных. Это означает, что структура gMA^2 была более расслабленной, чем gMA^1 . Комплекс глицина морфолина в аксиальной конформации с ДНК имел наибольшие значения по абсолютному значению энтальпии связывания и кооперативную энтальпию, которые составили с использованием методов расчета MMGB (PB) SA. Таким образом, форма глицин-морфолинового звена должна быть преимущественно аксиальной, что приводит к уменьшению длины основной цепи gM олигомера.

На основе расчета MMPB(GB)SA мы проанализировали полярные и неполярные вклады в сольватационную энергию. Сольватационный неполярный вклад в энергию для комплексов и одноцепочечных олигомеров были очень близки как для нативных, так и модифицированных структур. Напротив, полярное воздействие значительно различается для всех комплексов и олигомеров.

Нативные комплексы обладают значительным отрицательным полярным сольватационным вкладом, возникающим из-за электростатического отталкивания антипараллельных цепей фосфатного остова. В модифицированных комплексах небольшое электростатическое притяжение отрицательно заряженного фосфатного остатка и положительно заряженных N- и C-концов gM олигомеров компенсируется отталкиванием N- и C-концов в местах одноцепочечного разрыва. Это приводит к четырехкратному снижению полярного члена энергии сольватации модифицированных комплексов (Рисунок 53). Полученные данные наглядно демонстрируют, что методы молекулярной динамики позволяют проводить расчет структуры и энергии формирования комплексов нативных олигонуклеотидов. В случае их производных, наблюдается некоторая несогласованность рассчитываемых величин термодинамических параметров с экспериментальными данными, полученными методом термической денатурации.

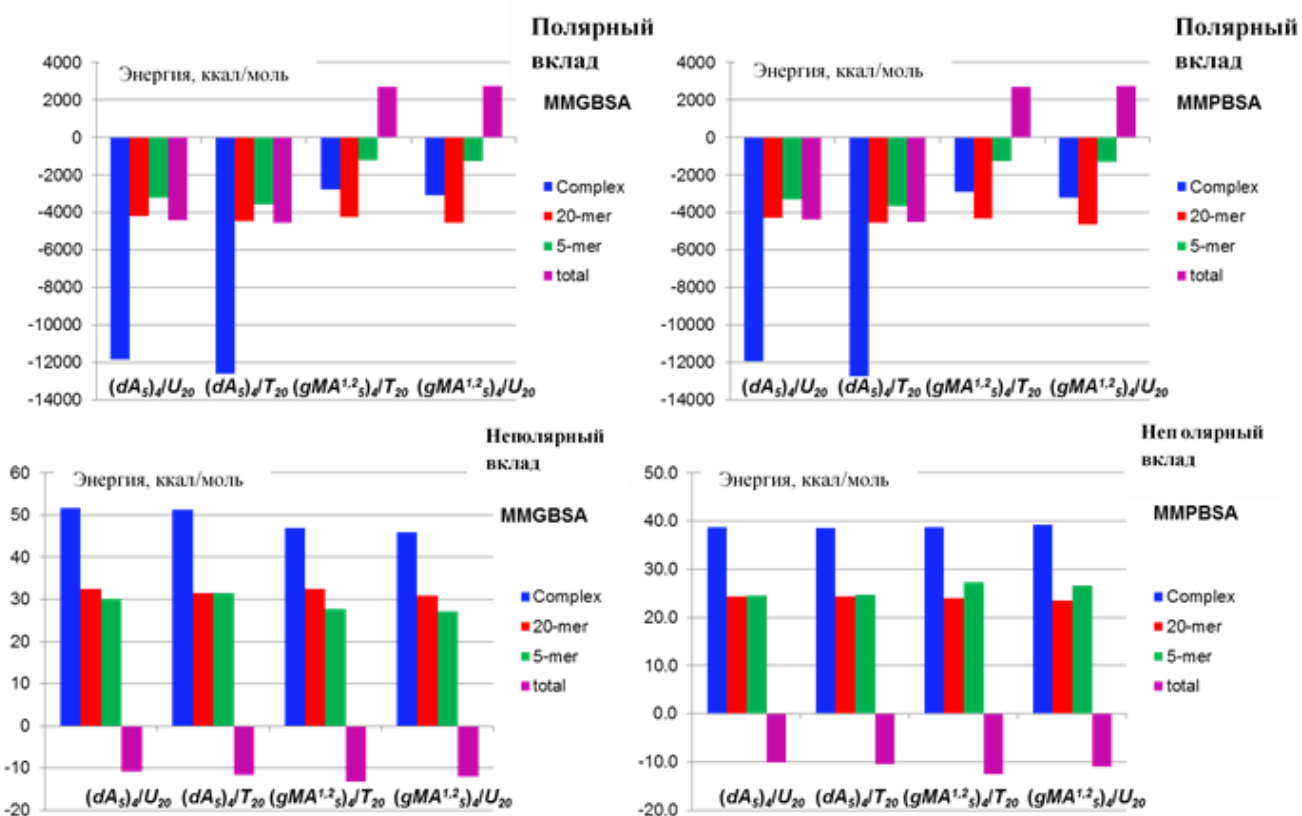


Рисунок 53. Значения полярных и неполярных вкладов в энергию сольватации, рассчитанные с использованием подходов MMPB(GV)SA для комплексов (синим цветом), одноцепочечных олигомеров (красным матрицы ДНК и РНК и зеленым для коротких олигомеров) и их разницы (фиолетовым).

Вместе с тем, в обоих случаях на фоне абсолютных значений энергий моделируемых систем ~ 80000 ккал/моль для НК-комплексов в явной водной оболочке, удастся достоверно определить энергии комплексов со значениями энергий -4000 ккал/моль, а также энергию комплексообразования $\sim 30 - 150$ ккал/моль и формирования кооперативного контакта на стыке дуплексных структур $\sim 5-10$ ккал/моль. Такая возможность, даваемая нам методом молекулярной динамики, является несомненным успехом данного подхода и позволяет надеяться на получение в ближайшем будущем инструмента для достоверного прогностического расчета энергии формирования комплексов производных нуклеиновых кислот с ДНК и РНК, точность и достоверность которого будет не ниже экспериментальных методов.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенная схема использования подгонки нескольких кривых термической денатурации для тандемных комплексов разной молекулярности должна быть опробована еще на нескольких модельных системах, но даже в таком виде может быть использована для оценки гибридизационных свойств для новых аналогов НК, для которых протяженный синтез затруднен. Это в значительной мере может сократить время для первичной оценки перспективности новых аналогов и производных НК.

Дальнейшим направлением исследования глицин-морфолиновых аналогов НК могут стать их использование в агрегированном виде [177]. Кроме того, полученный набор их физико-химических свойств может помочь в создании производных глицин-морфолиновых аналогов в заданном направлении. Можно попытаться уменьшить длину остова, чтобы снизить “напряженность” в цепи, либо промодифицировать концевые аминокислотные группы, чтобы убрать положительный заряд и уменьшить предельную концентрацию выпадения в осадок, но в то же время не снижать их растворимость.

Совокупность физико-химических свойств ФГО делает их отличным инструментом для систем диагностики. Возможность гибридизации ФГО с комплементарными ДНК и РНК даже в деионизованной воде вместе с возможностью предсказывать термостабильность таких комплексов должна подтолкнуть экспериментаторов к созданию биочипов и биосенсоров на их основе. Низкая себестоимость ФГО и удобство их синтеза вместе с проработанными физико-химическими свойствами должны заставить исследователей использовать их вместо РНА, РМО и метилфосфонатных аналогов.

Неизменность формы спирали даже при полной модификации одной из цепей в ДНК/ДНК дуплексах позволяет надеяться на успешное применение ФГ-

модифицированных дуплексов для изучения их взаимодействий с белком, так же, как и для картирования их мест контактов (что, например, уже делается с использованием фосфотиоатов). Вместе с тем, что сольватационные изменения в процессе образования дуплекса не зависят от ФГ-модификаций, это делает ФГО отличной модельной системой для изучения влияния заряда на различные процессы в ДНК.

Дальнейшим логичным направлением продолжения исследований физико-химических свойств ФГО и их комплексов с ДНК является исследование влияния однонуклеотидных замен на их термическую стабильность. Это позволит успешно их использовать для поиска аллель специфичных мутаций, а кроме того упростит их рациональное применение в качестве биосенсоров.

В данном исследовании была показана принципиальная возможность расчета гибридизационных свойств аналогов и производных НК при помощи обработки МД траекторий. Дальнейшее исследование причин значимых расхождений расчетных и экспериментально определенных величин термодинамических параметров, вместе с модификацией использованных очень простых подходов ММРВ(GB)SA может значительно улучшить предсказательную способность таких расчетов (что было продемонстрировано на примере нативных ДНК/РНК и РНК/РНК дуплексов).

5. 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 тандемных комплексов коротких низкостабильных комплексов НК и их производных.

2. Показано, что по данным КД-спектроскопии РНК в тандемных 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 тандемных 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 с 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 комплексообразования (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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НК – нуклеиновая кислота;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

МД – молекулярная динамика;

ММРBSA – Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area;

ММGBSA – Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area;

НМА – анализ нормальных мод колебаний;

Q-Harm – квазигармоническое приближение;

ФГО – фосфорилгуанидиновый олигонуклеотид;

ФГ – фосфорилгуанидиновый;

КД – круговой дихроизм;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс;

LNA – locked nucleic acids (замкнутые нуклеиновые кислоты);

PNA – peptide nucleic acids (пептидиловые нуклеиновые кислоты);

РМО – phosphorodiamidate morpholino oligomers (морфолиновые олигомеры);

П.о. – пар оснований;

gMO – глицин-морфолиновый олигомер;

БС – ближайшие соседи.

.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Goodchild. Therapeutic Oligonucleotides // *Methods in molecular biology*. 2011. – Vol. 764. P. 1-15.
2. Bell N. M. Chemical Modification of Oligonucleotides for Therapeutic, Bioanalytical and other Applications / N. M. Bell, J. Micklefield // *ChemBioChem*. – 2009. – Vol. 10. – № 17. – P. 2691-2703.
3. Eckstein F. Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides / F. Eckstein // *Nucleic Acid Therapeutics*. – 2014. – Vol. 24. – № 6. – P. 374-387.
4. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition / A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen [et al.] // *Tetrahedron*. – 1998. – Vol. 54. – № 14. – P. 3607-3630.
5. Peptide Nucleic Acids (PNA). Oligonucleotide Analogues with an Achiral Peptide Backbone. Vol. 114 / M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg. – American Chemical Society, 1992.
6. Summerton J. Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties / J. Summerton, D. Weller. – Text : electronic // *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. – 1997. – Vol. 7. – № 3. – P. 187-195.
7. Jäger A. Synthesis of deoxynucleoside methylphosphonates via a phosphoramidite approach / A. Jäger, J. Engels // *Tetrahedron Letters*. – 1984. – Vol. 25. – № 14. – P. 1437-1440.
8. Jager A. Oligonucleotide N-alkylphosphoramidates: synthesis and binding to polynucleotides / A. Jager, M. J. Levy, S. M. Hecht // *Biochemistry*. – 1988. – Vol. 27. – № 19. – P. 7237-7246.
9. Kumar P. DNA Analogues Modified at the Nonlinking Positions of Phosphorus / P. Kumar, M. H. Caruthers // *Accounts of Chemical Research*. – 2020. – Vol. 53. – № 10. – P. 2152-2166.
10. Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides Using Sulfurization Byproducts for in Situ Capping / J. Yang, J. A. Stolee, H. Jiang [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2018. – Vol. 83. – № 19. – P. 11577-11585.
11. Kumar R. Synthesis and excellent duplex stability of oligonucleotides containing 2'-amino-LNA functionalized with galactose units / R. Kumar, A. Ries, J. Wengel // *Molecules*. – 2017. –

Vol. 22. – № 5.

12. Moulton H. M. *Morpholino Oligomers : Methods in Molecular Biology*. Vol. 1565 / H. M. Moulton, J. D. Moulton; H. M. Moulton, J. D. Moulton eds. . – New York, NY : Springer New York, 2017.
13. Site-directed modification of DNA duplexes by chemical ligation / N. G. Dolinnaya, N. I. Sokolova, O. I. Gryaznova, Z. A. Shabarova // *Nucleic Acids Research*. – 1988. – Vol. 16. – № 9. – P. 3721-3738.
14. Froehler B. Phosphoramidate analogues of DNA: synthesis and thermal stability of heteroduplexes / B. Froehler, P. Ng, M. Matteucci // *Nucleic Acids Research*. – 1988. – Vol. 16. – № 11. – P. 4831-4839.
15. Stetsenko D. A. Modified oligonucleotides and methods for their synthesis, Patent no / D. A. Stetsenko, M. S. Kupryushkin, D. V Pyshnyi. – WO2016028187A1, 2014.
16. SDS-PAGE procedure: Application for characterization of new entirely uncharged nucleic acids analogs / A. S. Pavlova, E. S. Dyudeeva, M. S. Kupryushkin [et al.] // *Electrophoresis*. – 2018. – Vol. 39. – № 4. – P. 670-674.
17. Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: Isolation and properties / A. A. Lomzov, M. S. Kupryushkin, A. V. Shernyukov [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2019. – Vol. 513. – № 4. – P. 807-811.
18. A Comparative Study of the Hybridization of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides with DNA and RNA / A. A. Lomzov, M. S. Kupryushkin, E. S. Dyudeeva, D. V. Pyshnyi // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2021. – Vol. 47. – № 2. – P. 461-468.
19. Physicochemical Properties of the Phosphoryl Guanidine Oligodeoxyribonucleotide Analogs / E. S. Dyudeeva, M. S. Kupryushkin, A. A. Lomzov [et al.] // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2019. – Vol. 45. – № 6. – P. 709-718.
20. Neutral and Negatively Charged Phosphate Modifications Altering Thermal Stability, Kinetics of Formation and Monovalent Ion Dependence of DNA G-Quadruplexes / Y. Su, H. Fujii, E. A. Burakova [et al.] // *Chemistry – An Asian Journal*. – 2019. – Vol. 14. – № 8. – P. 1212-1220.
21. Design of a New Fluorescent Oligonucleotide-Based Assay for a Highly Specific Real-Time Detection of Apurinic/Apyrimidinic Site Cleavage by Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 / N. A. Lebedeva, R. O. Anarbaev, M. S. Kupryushkin [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2015. – Vol. 26. – № 10. – P. 2046-2053.
22. Prevention of DNA multimerization using phosphoryl guanidine primers during isothermal amplification with Bst exo- DNA polymerase / R. R. Garafutdinov, A. R. Sakhabutdinova, M. S. Kupryushkin, D. V. Pyshnyi // *Biochimie*. – 2020. – Vol. 168. – P. 259-267.
23. Allele-specific PCR for KRAS mutation detection using phosphoryl guanidine modified

primers / A. S. Chubarov, I. P. Oscorbin, M. L. Filipenko [et al.] // *Diagnostics*. – 2020. – Vol. 10. – P. 872.

24. Modified Oligonucleotides for Guiding RNA Cleavage Using Bacterial RNase P / D. S. Novopashina, A. S. Nazarov, M. A. Vorobjeva [et al.] // *Molecular Biology*. – 2018. – Vol. 52. – № 6. – P. 905-912.

25. Novel peptide conjugates of modified oligonucleotides for inhibition of bacterial RNase P / D. Novopashina, M. Vorobyeva, A. Nazarov [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2019. – Vol. 10. – № July. – P. 1-8.

26. Impact of delivery method on antiviral activity of phosphodiester, phosphorothioate, and phosphoryl guanidine oligonucleotides in MDCK cells infected with H5N1 bird flu virus / A. S. Levina, M. N. Repkova, B. P. Chelobanov [et al.] // *Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 51. – № 4. – P. 633-638.

27. Transport Oligonucleotides—A Novel System for Intracellular Delivery of Antisense Therapeutics / O. V Markov, A. V Filatov, M. S. Kupryushkin [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 16. – P. 3663.

28. Surface modification of SOI-FET sensors for label-free and specific detection of short RNA analyte / E. Dmitrienko, O. Naumova, B. Fomin [et al.] // *Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – № 16. – P. 2073-2082.

29. Griffin T. J. An approach to predicting the stabilities of peptide nucleic acid:DNA duplexes / T. J. Griffin, L. M. Smith // *Analytical Biochemistry*. – 1998. – Vol. 260. – № 1. – P. 56-63.

30. McTigue P. M. Sequence-Dependent Thermodynamic Parameters for Locked Nucleic Acid (LNA)–DNA Duplex Formation † / P. M. McTigue, R. J. Peterson, J. D. Kahn // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – № 18. – P. 5388-5405.

31. Effect of locked nucleic acid modifications on the thermal stability of noncanonical DNA structure / J. Bhattacharyya, S. Maiti, S. Muhuri [et al.] // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – № 34. – P. 7414-7425.

32. Stability and mismatch discrimination of locked nucleic acid-DNA duplexes / R. Owczarzy, Y. You, C. L. Groth, A. V. Tataurov // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – № 43. – P. 9352-9367.

33. Takahashi S. Stability prediction of canonical and non-canonical structures of nucleic acids in various molecular environments and cells / S. Takahashi, N. Sugimoto // *Chemical Society Reviews*. – 2020. – Vol. 49. – № 23. – P. 8439-8468.

34. Basílio Barbosa V. Nearest-neighbour parameters optimized for melting temperature prediction of DNA/RNA hybrids at high and low salt concentrations / V. Basílio Barbosa, E. de Oliveira Martins, G. Weber // *Biophysical Chemistry*. – 2019. – Vol. 251. – № May. – P. 106189.

35. Validation of the nearest-neighbor model for Watson-Crick self-complementary DNA duplexes in molecular crowding condition / S. Ghosh, S. Takahashi, T. Endoh [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – № 7. – P. 3284-3294.
36. Saenger W. *Principles of Nucleic Acid Structure* : Springer Advanced Texts in Chemistry / W. Saenger. – New York, NY : Springer New York, 1984.
37. Watson J. D. *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid* / J. D. Watson, F. H. C. Crick // *Nature*. – 1953. – Vol. 171. – № 4356. – P. 737-738.
38. Contributions of stacking, preorganization, and hydrogen bonding to the thermodynamic stability of duplexes between RNA and 2'-O-methyl RNA with locked nucleic acids / E. Kierzek, A. Pasternak, K. Pasternak [et al.] // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – № 20. – P. 4377-4387.
39. *Gene Therapy Based on Nucleic Acid Nanostructure*. Vol. 9 / X. Wu, T. Wu, J. Liu, B. Ding. – 2020.
40. Antisense technology: A review / S. T. Crooke, X.-H. Liang, B. F. Baker, R. M. Crooke // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 296. – P. 100416.
41. Briones C. Applications of peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs) in biosensor development / C. Briones, M. Moreno // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – Vol. 402. – № 10. – P. 3071-3089.
42. Karkare S. Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino / S. Karkare, D. Bhatnagar // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – Vol. 71. – № 5. – P. 575-586.
43. Soler-Bistué A. Bridged Nucleic Acids Reloaded / A. Soler-Bistué, A. Zorreguieta, M. E. Tolmasky // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 12. – P. 2297.
44. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications / S. Benizri, A. Gissot, A. Martin [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2019. – Vol. 30. – № 2. – P. 366-383.
45. Rahman M. M. An Overview on the Development of mRNA-Based Vaccines and Their Formulation Strategies for Improved Antigen Expression In Vivo / M. M. Rahman, N. Zhou, J. Huang // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9. – № 3. – P. 244.
46. El-Sagheer A. H. Combined nucleobase and backbone modifications enhance DNA duplex stability and preserve biocompatibility / A. H. El-Sagheer, T. Brown // *Chem. Sci*. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 253-259.
47. Pharmacokinetics of Antisense Oligonucleotides / S. Agrawal, J. Teamani, W. Galbraith, J. Tang // *Clinical Pharmacokinetics*. – 1995. – Vol. 28. – № 1. – P. 7-16.
48. CD, absorption and thermodynamic analysis of repeating dinucleotide DNA, RNA and

hybrid duplexes [d/r(AC)]₁₂[d/r(GT/U)]₁₂ and the influence of phosphorothioate substitution/ C. L. Clark, P. K. Cecil, D. Singh [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 1997. – Vol. 25. – № 20. – P. 4098-4105.

49. Novopashina D. S. Recent Advances in the Synthesis of High Boron-Loaded Nucleic Acids for BNCT / D. S. Novopashina, M. A. Vorobyeva, A. Venyaminova // *Frontiers in Chemistry*. – 2021. – Vol. 9. – № March. – P. 1-8.

50. Sequence dependent effects in methylphosphonate deoxyribonucleotide double and triple helical complexes / L. Kibler-Herzog, B. Kell, G. Zon [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 1990. – Vol. 18. – № 12. – P. 3545-3555.

51. A synthetic genetic polymer with an uncharged backbone chemistry based on alkyl phosphonate nucleic acids / S. Arangundy-Franklin, A. I. Taylor, B. T. Porebski [et al.] // *Nature Chemistry*. – 2019. – Vol. 11. – № 6. – P. 533-542.

52. Oligodeoxynucleoside phosphoramidates (P-NH₂): Synthesis and thermal stability of duplexes with DNA and RNA targets / S. Peyrottes, J. J. Vasseur, J. L. Imbach, B. Rayner // *Nucleic Acids Research*. – 1996. – Vol. 24. – № 10. – P. 1841-1848.

53. Bennett C. F. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age / C. F. Bennett // *Annual Review of Medicine*. – 2019. – Vol. 70. – P. 307-321.

54. Synthesis and properties of morpholino chimeric oligonucleotides / N. Zhang, C. Tan, P. Cai [et al.] // *Tetrahedron Letters*. – 2008. – Vol. 49. – № 22. – P. 3570-3573.

55. Schwarz F. Thermodynamic comparison of PNA/DNA and DNA/DNA hybridization reactions at ambient temperature / F. Schwarz // *Nucleic Acids Research*. – 1999. – Vol. 27. – № 24. – P. 4792-4800.

56. New oligonucleotide analogues based on morpholine subunits joined by oxalyl diamide tether / T. V. Abramova, M. F. Kassakin, A. A. Lomzov [et al.]. – Text: electronic // *Bioorganic Chemistry*. – 2007. – Vol. 35. – № 3. – P. 258-275.

57. Kupryushkin M. S. Phosphoryl guanidines: A new type of nucleic acid analogues / M. S. Kupryushkin, D. V. Pyshnyi, D. A. Stetsenko // *Acta Naturae*. – 2014. – Vol. 6. – № 23. – P. 116-118.

58. Non-covalent binding of nucleic acids with gold nanoparticles provides their stability and effective desorption in environment mimicking biological media / A. Epanchintseva, A. Dolodoev, A. Grigor'eva [et al.] // *Nanotechnology*. – 2018. – Vol. 29. – № 35. – P. 355601.

59. Hydration changes accompanying helix-to-coil DNA transitions / I. Son, Y. L. Shek, D. N. Dubins, T. V. Chalikian // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Vol. 136. – № 10. – P. 4040-4047.

60. Rozners E. Hydration of short DNA, RNA and 2'-OMe oligonucleotides determined by

osmotic stressing / E. Rozners // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – № 1. – P. 248-254.

61. Manning G. S. Electrostatic free energy of the DNA double helix in counterion condensation theory / G. S. Manning // *Biophysical Chemistry*. – 2002. – Vols. 101-102. – P. 461-473.

62. Understanding nucleic Acid-ion interactions. / J. Lipfert, S. Doniach, R. Das, D. Herschlag // *Annual review of biochemistry*. – 2014. – Vol. 83. – № February. – P. 813-41.

63. Marky L. A. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves / L. A. Marky, K. J. Breslauer // *Biopolymers*. – 1987. – Vol. 26. – № 9. – P. 1601-1620.

64. Thermodynamic analysis of nylon nucleic acids / Y. Liu, R. Wang, L. Ding [et al.] // *ChemBioChem*. – 2008. – Vol. 9. – № 10. – P. 1641-1648.

65. You Y. Measuring thermodynamic details of DNA hybridization using fluorescence / Y. You, A. V. Tatarsky, R. Owczarzy // *Biopolymers*. – 2011. – Vol. 95. – № 7. – P. 472-486.

66. Carvalho J. Forster resonance energy transfer for studying nucleic acids denaturation: A chemical and biological sciences laboratory experiment / J. Carvalho, C. Cruz // *Biochemistry and Molecular Biology Education*. – 2020. – Vol. 48. – № 4. – P. 329-336.

67. Enthalpy and heat capacity changes for formation of an oligomeric DNA duplex: Interpretation in terms of coupled processes of formation and association of single-stranded helices / J. A. Holbrook, M. W. Capp, R. M. Saecker, M. T. Record // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – № 26. – P. 8409-8422.

68. Lang B. E. Thermodynamic dependence of DNA/DNA and DNA/RNA hybridization reactions on temperature and ionic strength / B. E. Lang, F. P. Schwarz // *Biophysical Chemistry*. – 2007. – Vol. 131. – № 1-3. – P. 96-104.

69. Improved nearest-neighbor parameters for the stability of RNA/DNA hybrids under a physiological condition / D. Banerjee, H. Tateishi-Karimata, T. Ohshima [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2020. – P. 1-13.

70. SantaLucia J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics / J. SantaLucia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Vol. 95. – № 4. – P. 1460-1465.

71. Tatarsky A. V. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids / A. V. Tatarsky, Y. You, R. Owczarzy // *Biophysical Chemistry*. – 2008. – Vol. 133. – № 1-3. – P. 66-70.

72. Cantor C. R. Oligonucleotide interactions. III. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides / C. R. Cantor, M. M. Warshaw, H. Shapiro // *Biopolymers*. – 1970. – Vol. 9. – № 9. – P. 1059-1077.

73. SantaLucia J. The thermodynamics of DNA structural motifs. / J. SantaLucia, D. Hicks

// Annual review of biophysics and biomolecular structure. – 2004. – Vol. 33. – P. 415-40.

74. Gray D. M. Derivation of Nearest Neighbor Properties from Data on Nucleic Acid Oligomers. 1. Simple Sets of Independent Sequences and the Influence of Absent Nearest Neighbors / D. M. Gray // *Biopolymers - Nucleic Acid Sciences Section*. – 1997. – Vol. 42. – № 7. – P. 783-793.

75. Gray D. M. Derivation of nearest-neighbor properties from data on nucleic acid oligomers. ii. thermodynamic parameters of DNA RNA hybrids and DNA duplexes / D. M. Gray // *Biopolymers - Nucleic Acid Sciences Section*. – 1997. – Vol. 42. – № 7. – P. 795-810.

76. Thermodynamic Parameters To Predict Stability of RNA/DNA Hybrid Duplexes / N. Sugimoto, S. Nakano, M. Katoh [et al.]. – Text : electronic // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34. – № 35. – P. 11211-11216.

77. 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.

78. Nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability in diverse molecular crowding conditions / S. Ghosh, S. Takahashi, T. Ohshima [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117. – № 25. – P. 14194-14201.

79. Adams M. S. Thermodynamic characterization and nearest neighbor parameters for RNA duplexes under molecular crowding conditions / M. S. Adams, B. M. Znosko // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – № 7. – P. 3658-3666.

80. Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks / S. Hoshika, N. A. Leal, M.-J. Kim [et al.] // *Science*. – 2019. – Vol. 363. – № 6429. – P. 884-887.

81. Stability and Mismatch Discrimination of Locked Nucleic Acid–DNA Duplexes / R. Owczarzy, Y. You, C. L. Groth, A. V. Tataurov // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – № 43. – P. 9352-9367.

82. Thermodynamic parameters for calculating the stability of complexes of bridged oligonucleotides / A. A. Lomzov, I. A. Pyshnaya, E. M. Ivanova, D. V. Pyshnyi. – Text : electronic // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2006. – Vol. 409. – № 1. – P. 211-215.

83. A formula for thermal stability (T(m)) prediction of PNA/DNA duplexes / U. Giesen, W. Kleider, C. Berding [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 1998. – Vol. 26. – № 21. – P. 5004-5006.

84. Karplus M. Molecular dynamics simulations of biomolecules / M. Karplus, J. A. McCammon // *Nature Structural Biology*. – 2002. – Vol. 9. – № 9. – P. 646-652.

85. Xu D. Advancements in Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules on Graphical Processing Units / D. Xu, M. J. Williamson, R. C. Walker // *Annual Reports in Computational Chemistry*. – Elsevier B.V., 2010. – Vol. 6. – P. 2-19.

86. How accurate are accurate force-fields for B-DNA? / P. D. Dans, I. Ivani, A. Hospital

[et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45. – № 7. – P. 4217-4230.

87. Galindo-Murillo R. Convergence and reproducibility in molecular dynamics simulations of the DNA duplex d(GCACGAACGAACGAACGC) / R. Galindo-Murillo, D. R. Roe, T. E. Cheatham // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. – 2015. – Vol. 1850. – № 5. – P. 1041-1058.

88. Assessing the Current State of Amber Force Field Modifications for DNA / R. Galindo-Murillo, J. C. Robertson, M. Zgarbová [et al.]. // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2016. – Vol. 12. – № 8. – P. 4114-4127. – URL: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jctc.6b00186> (date accessed: 18.07.2019).

89. Galindo-Murillo R. Convergence and reproducibility in molecular dynamics simulations of the DNA duplex d(GCACGAACGAACGAACGC) / R. Galindo-Murillo, D. R. Roe, T. E. Cheatham // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. – 2015. – Vol. 1850. – № 5. – P. 1041-1058.

90. Recent Developments and Applications of the MMPBSA Method / C. Wang, D. Greene, L. Xiao [et al.] // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2018. – Vol. 4.

91. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices / J. Srinivasan, T. E. Cheatham, P. Cieplak [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 1998. – Vol. 120. – № 37. – P. 9401-9409.

92. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 7. Entropy effects on the performance of end-point binding free energy calculation approaches / H. Sun, L. Duan, F. Chen [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2018. – Vol. 20. – № 21. – P. 14450-14460.

93. THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method / S. Kumar, J. M. Rosenberg, D. Bouzida [et al.] // *Journal of Computational Chemistry*. – 1992. – Vol. 13. – № 8. – P. 1011-1021.

94. Roadmaps through Free Energy Landscapes Calculated Using the Multidimensional vFEP Approach / T.-S. Lee, B. K. Radak, M. Huang [et al.] // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2014. – Vol. 10. – № 1. – P. 24-34.

95. Williams-Noonan B. J. Free Energy Methods in Drug Design: Prospects of “Alchemical Perturbation” in Medicinal Chemistry / B. J. Williams-Noonan, E. Yuriev, D. K. Chalmers // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 61. – № 3. – P. 638-649.

96. Sakuraba S. Predicting RNA Duplex Dimerization Free-Energy Changes upon Mutations Using Molecular Dynamics Simulations / S. Sakuraba, K. Asai, T. Kameda // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2015. – Vol. 6. – № 21. – P. 4348-4351.

97. Using thermodynamic integration MD simulation to compute relative protein–ligand binding free energy of a GSK3 β kinase inhibitor and its analogs / H.-C. Lee, W.-C. Hsu, A.-L. Liu [et

al.] // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2014. – Vol. 51. – P. 37-49.

98. End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design / E. Wang, H. Sun, J. Wang [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2019. – Vol. 119. – № 16. – P. 9478-9508.

99. Brooks B. R. Harmonic analysis of large systems. I. Methodology / B. R. Brooks, D. Janežič, M. Karplus // *Journal of Computational Chemistry*. – 1995. – Vol. 16. – № 12. – P. 1522-1542.

100. In silico identification of potential inhibitors of key SARS-CoV-2 3CL hydrolase (Mpro) via molecular docking, MMGBSA predictive binding energy calculations, and molecular dynamics simulation / M. I. Choudhary, M. Shaikh, A.- Tul-Wahab, A.- Ur-Rahman // *PLOS ONE*. – 2020. – Vol. 15. – № 7. – P. e0235030.

101. Computing clinically relevant binding free energies of HIV-1 protease inhibitors / D. W. Wright, B. A. Hall, O. A. Kenway [et al.] // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2014. – Vol. 10. – № 3. – P. 1228-1241.

102. Lomzov A. A. Evaluation of the Gibbs Free Energy Changes and Melting Temperatures of DNA/DNA Duplexes Using Hybridization Enthalpy Calculated by Molecular Dynamics Simulation / A. A. Lomzov, Y. N. Vorobjev, D. V. Pyshnyi // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. – Vol. 119. – № 49. – P. 15221-15234.

103. Calculation of binding free energy of short double stranded oligonucleotides using MM/3D-RISM-KH approach / J. P. Yesudas, N. Blinov, S. K. Dew, A. Kovalenko // *Journal of Molecular Liquids*. – 2015. – Vol. 201. – P. 68-76.

104. Suresh G. Atomistic investigation of the effect of incremental modification of deoxyribose sugars by locked nucleic acid (β - D -LNA and α - L -LNA) moieties on the structures and thermodynamics of Dna-Rna hybrid duplexes / G. Suresh, U. D. Priyakumar // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 118. – № 22. – P. 5853-5863.

105. Insight into why pyrrolidinyI peptide nucleic acid binding to DNA is more stable than the DNA·DNA duplex / K. Siriwong, P. Chuichay, S. Saen-oon [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2008. – Vol. 372. – № 4. – P. 765-771.

106. Murphy J. H. Concentration and Extinction Coefficient Determination for Oligonucleotides and Analogs Using a General Phosphate Analysis / J. H. Murphy, T. L. Trapane // *Analytical Biochemistry*. – 1996. – Vol. 240. – № 2. – P. 273-282.

107. Kallansrud G. A Comparison of Measured and Calculated Single- and Double-Stranded Oligodeoxynucleotide Extinction Coefficients / G. Kallansrud, B. Ward // *Analytical Biochemistry*. – 1996. – Vol. 236. – № 1. – P. 134-138.

108. Cavaluzzi M. J. Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates

and unpaired DNA and RNA / M. J. Cavaluzzi, P. N. Borer // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – № 1. – P. e13-e13.

109. Accurate Quantification of Nucleic Acids Using Hypochromicity Measurements in Conjunction with UV Spectrophotometry / A. O. Nwokeoji, P. M. Kilby, D. E. Portwood, M. J. Dickman // *Analytical Chemistry*. – 2017. – Vol. 89. – № 24. – P. 13567-13574.

110. Ramprakash J. Thermodynamics of single strand DNA base stacking / J. Ramprakash, B. Lang, F. P. Schwarz // *Biopolymers*. – 2008. – Vol. 89. – № 11. – P. 969-979.

111. Conformational Changes in Single-Strand DNA as a Function of Temperature by SANS / J. Zhou, S. K. Gregurick, S. Krueger, F. P. Schwarz // *Biophysical Journal*. – 2006. – Vol. 90. – № 2. – P. 544-551.

112. Vesnaver G. The contribution of DNA single-stranded order to the thermodynamics of duplex formation. / G. Vesnaver, K. J. Breslauer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. 88. – № 9. – P. 3569-3573.

113. CD, absorption and thermodynamic analysis of repeating dinucleotide DNA, RNA and hybrid duplexes [d/r(AC)]₁₂·[d/r(GT/U)]₁₂ and the influence of phosphorothioate substitution / C. L. Clark, P. K. Cecil, D. Singh, D. M. Gray // *Nucleic Acids Research*. – 1997. – Vol. 25. – № 20. – P. 4098-4105.

114. Shimizu M. Solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates by the boranophosphotriester method / M. Shimizu, K. Saigo, T. Wada // *Journal of Organic Chemistry*. – 2006. – Vol. 71. – № 11. – P. 4262-4269.

115. Thermodynamic features of structural motifs formed by β -L-RNA / M. Szabat, D. Gudanis, W. Kotkowiak [et al.] // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 2. – P. 1-11.

116. Features of Determining Thermodynamic Parameters of Formation of Nucleic Acid Complexes Using Thermal Denaturation with Fluorimetric Signal Detection / G. Y. Shevelev, M. R. Kabilov, A. A. Lomzov [et al.] // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2019. – Vol. 45. – № 6. – P. 684-698.

117. Schroeder S. J. Optical melting measurements of nucleic acid thermodynamics. / S. J. Schroeder, D. H. Turner // *Methods in enzymology*. – 2009. – Vol. 468. – № 09. – P. 371-387.

118. Kinetics of DNA duplex formation: A-tracts versus AT-tracts / J. A. Wyer, M. B. Kristensen, N. C. Jones [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2014. – Vol. 16. – № 35. – P. 18827-18839.

119. Gaussian~09 {R}evision {E}.01 / M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel [et al.] Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.

120. Conformations of morpholine in liquid and adsorbed on gold nanoparticles explored by Raman spectroscopy and theoretical calculations / M. Xie, G. Zhu, Y. Hu, H. Gu. // *Journal of Physical*

Chemistry C. – 2011. – Vol. 115. – № 42. – P. 20596-20602.

121. Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations. / I. Ivani, P. D. Dans, A. Noy [et al.]. // *Nature methods*. – 2015. – Vol. 13. – № 1. – P. 55-58.

122. Development and testing of a general amber force field / J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell [et al.]. – Text : electronic // *Journal of Computational Chemistry*. – 2004. – Vol. 25. – № 9. – P. 1157-1174.

123. DNA-RNA hybrid secondary structures / S. Arnott, R. Chandrasekaran, R. P. Millane, H. S. Park // *Journal of Molecular Biology*. – 1986. – Vol. 188. – № 4. – P. 631-640.

124. D.A. Case J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M V. B. The Amber Molecular Dynamics Package / V. B. D.A. Case J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M // *Amber*. – 2014. – Vol. 14.

125. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang [et al.] // *Journal of Computational Chemistry*. – 2004. – Vol. 25. – № 13. – P. 1605-1612.

126. Joung I. S. Determination of Alkali and Halide Monovalent Ion Parameters for Use in Explicitly Solvated Biomolecular Simulations / I. S. Joung, T. E. Cheatham. // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – Vol. 112. – № 30. – P. 9020-9041.

127. Amber 2017 / G. D.A. Case, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H., H. Monard, I. Nguyen [et al.] // *University of California, San Francisco*. – 2017.

128. Thermodynamic Analysis of Stacking Hybridization of Oligonucleotides with DNA Template / D. V. Pyshnyi, I. A. Pyshnaya, A. S. Levina [et al.] // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2001. – Vol. 19. – № 3. – P. 555-570.

129. Lomzov A. A. Considering the oligonucleotide secondary structures in thermodynamic and kinetic analysis of DNA duplex formation / A. A. Lomzov, D. V. Pyshnyi // *Biophysics*. – 2012. – Vol. 57. – № 1. – P. 19-34.

130. Pyshnyi D. V. Efficiency of coaxial stacking depends on the DNA duplex structure. / D. V Pyshnyi, E. L. Goldberg, E. M. Ivanova // *Journal of biomolecular structure & dynamics*. – 2003. – Vol. 21. – № 3. – P. 459-468.

131. Nature of base stacking: Reference quantum-chemical stacking energies in ten unique

B-DNA base-pair steps / J. Šponer, P. Jurečka, I. Marchan [et al.] // *Chemistry - A European Journal*. – 2006. – Vol. 12. – № 10. – P. 2854-2865.

132. 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.

133. Polak M. Complete disproportionation of duplex poly(dT)middle dotpoly(dA) into triplex poly(dT)middle dotpoly(dA)middle dotpoly(dT) and poly(dA) by coralyne / M. Polak // *Nucleic Acids Research*. – 2002. – Vol. 30. – № 4. – P. 983-992.

134. Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism / V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, A. I. Poletayev. – Text : electronic // *Biopolymers*. – 1973. – Vol. 12. – № 1. – P. 89-110.

135. Structural and thermal studies on some morpholine complexes / M. S. Masoud, A. E. Ali, G. S. Elasala, R. E. Elwardany // *Journal of Molecular Structure*. – 2019. – Vol. 1175. – № 2. – P. 648-662.

136. Dissociation Constants (p K a) of Tertiary and Cyclic Amines: Structural and Temperature Dependences / A. V. Rayer, K. Z. Sumon, L. Jaffari, A. Henni // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2014. – Vol. 59. – № 11. – P. 3805-3813.

137. The Mechanical Properties of RNA-DNA Hybrid Duplex Stretched by Magnetic Tweezers / C. Zhang, H. Fu, Y. Yang [et al.]. – Text : electronic // *Biophysical Journal*. – 2019. – Vol. 116. – № 2. – P. 196-204.

138. Single-molecule measurements of the persistence length of double-stranded RNA / J. A. Abels, F. Moreno-Herrero, T. Van Der Heijden [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2005. – Vol. 88. – № 4. – P. 2737-2744.

139. Solution structure of an A-tract DNA bend / D. MacDonald, K. Herbert, X. Zhang [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2001. – Vol. 306. – № 5. – P. 1081-1098.

140. Antiviral Activity of a New Class of Chemically Modified Antisense Oligonucleotides against Influenza A Virus / A. V. Markov, M. S. Kupryushkin, E. P. Goncharova [et al.] // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2019. – Vol. 45. – № 6. – P. 774-782.

141. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction / M. Zuker // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31. – № 13. – P. 3406-3415.

142. Kibbe W. A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator / W. A. Kibbe // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – Vol. 35. – № SUPPL.2. – P. 43-46.

143. Richards E. G. Use of tables in calculation of absorption, optical rotatory dispersion and circular dichroism of polyribonucleotides. Vol. 1 / E. G. Richards. – 1975. – 596 p.

144. Synthesis and Preliminary Complexation Studies of Dialkylphosphorylthiourea and

Guanidines / W. O. Lin, C. N. Guimarães, M. C. De Souza [et al.] // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. – 1994. – Vol. 92. – № 1-4. – P. 1-9.

145. M. Takenaka. Measurement of the Thermal Expansion of Pure Water in the Temperature Range 0°C-85°C / M. Takenaka, R. Masui // *Metrologia*. – 1990. – Vol. 27. – P. 165-171.

146. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA / J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renčíuk, M. Vorlíčková // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – Vol. 37. – № 6. – P. 1713-1725.

147. Powell J. T. Specific effects of Li⁺ on stacking equilibria in polynucleotides / J. T. Powell, E. G. Richards // *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*. – 1972. – Vol. 281. – № 2. – P. 145-151.

148. Stereocontrolled Synthesis of Boranophosphate DNA by an Oxazaphospholidine Approach and Evaluation of Its Properties / R. I. Hara, T. Saito, T. Kogure [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2019. – Vol. 84. – № 12. – P. 7971-7983.

149. Duplex formation of the simplified nucleic acid GNA / M. K. Schlegel, A. E. Peritz, K. Kittigowittana [et al.] // *ChemBioChem*. – 2007. – Vol. 8. – № 8. – P. 927-932.

150. Structure and hybridization properties of phosphorylguanidine oligonucleotides / A. A. Lomzov, V. M. Golyshev, E. S. Dyudeeva [et al.] // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2019. – Vol. 37. – № 1, SI. – P. 83-84.

151. Melting of a DNA hairpin without hyperchromism / T. M. Davis, L. McFail-Isom, E. Keane, L. D. Williams // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – № 19. – P. 6975-6978.

152. Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures / R. Owczarzy, Y. You, B. G. Moreira [et al.] // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – № 12. – P. 3537-3554.

153. The effect of molecular crowding with nucleotide length and cosolute structure on DNA duplex stability / S. I. Nakano, H. Karimata, T. Ohmichi [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126. – № 44. – P. 14330-14331.

154. Nakano S. I. Effects of molecular crowding on the structures, interactions, and functions of nucleic acids / S. I. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto // *Chemical Reviews*. – 2014. – Vol. 114. – № 5. – P. 2733-2758.

155. Focus on PNA Flexibility and RNA Binding using Molecular Dynamics and Metadynamics / M. D. Verona, V. Verdolino, F. Palazzesi, R. Corradini // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № September 2016. – P. 1-11.

156. Optimization of an AMBER force field for the artificial nucleic acid, LNA, and benchmarking with NMR of L(CAAU) / D. E. Condon, I. Yildirim, S. D. Kennedy [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 118. – № 5. – P. 1216-1228.

157. Dickerson R. E. Structure of a B-DNA dodecamer / R. E. Dickerson, H. R. Drew //

Journal of Molecular Biology. – 1981. – Vol. 149. – № 4. – P. 761-786.

158. Schneider B. Hydration of the Phosphate Group in Double-Helical DNA / B. Schneider, K. Patel, H. M. Berman // *Biophysical Journal*. – 1998. – Vol. 75. – № 5. – P. 2422-2434.

159. Rozners E. Determination of Nucleic Acid Hydration Using Osmotic Stress / E. Rozners // *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. – 2010. – Vol. 43. – № 1. – P. 1-7.

160. 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.

161. Ninni L. Water activity in poly(ethylene glycol) aqueous solutions / L. Ninni, M. S. Camargo, A. J. A. Meirelles // *Thermochimica Acta*. – 1999. – Vol. 328. – № 1-2. – P. 169-176.

162. Thermodynamics of aqueous polyethylene-glycol (PEG) solutions at 298.15 K: Activity, activity coefficients and application of molecular theories / S. K. Kushare, V. R. Shaikh, S. S. Terdale [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2013. – Vol. 187. – P. 129-136.

163. Kinetics and equilibrium constants of oligonucleotides at low concentrations. Hybridization and melting study / K. Bielec, K. Sozanski, M. Seynen [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2019. – Vol. 21. – № 20. – P. 10798-10807.

164. Wu P. Temperature dependence of thermodynamic properties for DNA/DNA and RNA/DNA duplex formation / P. Wu, S. I. Nakano, N. Sugimoto // *European Journal of Biochemistry*. – 2002. – Vol. 269. – № 12. – P. 2821-2830.

165. Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. / J. Petruska, M. F. Goodman, M. S. Boosalis [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – Vol. 85. – № 17. – P. 6252-6256.

166. Hybridization of the bridged oligonucleotides with dna: Thermodynamic and kinetic studies / D. V. Pyshnyi, A. A. Lomzov, I. A. Pyshnaya, E. M. Ivanova // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2006. – Vol. 23. – № 5. – P. 567-579.

167. Ломзов А. А. Расчет температуры плавления нативных и модифицированных комплексов днк при различных концентрациях катионов металлов с помощью расширенной модели конденсации противоионов / А.А. Ломзов, Д.В. Пышный // *Вестник НГУ*. – 2008. – Том. 3. – № 2. – С. 61-75.

168. Statistical Analysis on the Performance of Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area versus Absolute Binding Free Energy Calculations: Bromodomains as a Case Study / M. Aldeghi, M. J. Bodkin, S. Knapp, P. C. Biggin // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2017. – Vol. 57. – № 9. – P. 2203-2221.

169. Lu X.-J. 3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures / X.-J. Lu, W. K. Olson // *Nature Protocols*.

– 2008. – Vol. 3. – № 7. – P. 1213-1227.

170. Cross C. W. Solution Structure of an RNA·DNA Hybrid Duplex Containing a 3'-Thioformacetal Linker and an RNA A-Tract † / C. W. Cross, J. S. Rice, X. Gao // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36. – № 14. – P. 4096-4107.

171. Comparison of the thermodynamic stabilities and solution conformations of DNA·RNA hybrids containing purine-rich and pyrimidine-rich strands with DNA and RNA duplexes / J. I. Gyi, G. L. Conn, A. N. Lane, T. Brown // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35. – № 38. – P. 12538-12548.

172. Hall K. B. Thermodynamic and structural properties of pentamer DNA.cntdot.DNA, RNA.cntdot.RNA and DNA.cntdot.RNA duplexes of identical sequence / K. B. Hall, L. W. McLaughlin // *Biochemistry*. – 1991. – Vol. 30. – № 44. – P. 10606-10613.

173. Zimmerman S. B. A RNA.DNA hybrid that can adopt two conformations: an x-ray diffraction study of poly(rA).poly(dT) in concentrated solution or in fibers. / S. B. Zimmerman, B. H. Pfeiffer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1981. – Vol. 78. – № 1. – P. 78-82.

174. Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA and DNA / H. Chen, S. P. Meisburger, S. A. Pabit [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – № 3. – P. 799-804.

175. Sen S. MD Simulations of Homomorphous PNA, DNA, and RNA Single Strands: Characterization and Comparison of Conformations and Dynamics / S. Sen, L. Nilsson // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – Vol. 123. – № 30. – P. 7414-7422.

176. Chakraborty K. Molecular dynamics simulation of a single-stranded DNA with heterogeneous distribution of nucleobases in aqueous medium / K. Chakraborty, S. Mantha, S. Bandyopadhyay // *Journal of Chemical Physics*. – 2013. – Vol. 139. – № 7.

177. Nucleobase morpholino β amino acids as molecular chimeras for the preparation of photoluminescent materials from ribonucleosides / R. Bucci, A. Bossi, E. Erba [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-8.