

На правах рукописи



**Щугорева Ирина Андреевна**

**Моделирование структуры и свойств синтетических олигомеров методами  
теории функционала плотности**

Специальность 1.3.8.  
Физика конденсированного состояния

Автореферат  
Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Красноярск – 2023

Работа выполнена в Институте физики им. Л. В. Киренского Сибирского отделения Российской академии наук (ИФ СО РАН) – обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН).

Научный руководитель: **Томилин Феликс Николаевич**,  
кандидат химических наук, старший научный  
сотрудник лаборатории физики магнитных  
явлений ИФ СО РАН

Официальные  
оппоненты: **Волков Владимир Владимирович**,  
доктор химических наук, главный научный  
сотрудник лаборатории рефлектометрии и  
малоуглового рассеяния,  
Федерального государственного учреждения  
«Федеральный научно-исследовательский центр  
«Кристаллография и фотоника» Российской  
академии наук, Института кристаллографии им.  
А.Н. Шубникова РАН

**Сорокина Любовь Юрьевна**  
кандидат физико-математических наук,  
старший научный сотрудник, лаборатории  
цифрового материаловедения,  
Федерального государственного автономного  
образовательного учреждения высшего  
образования Национального исследовательского  
технологического университета «МИСИС»

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Южный федеральный университет»  
(г. Ростов-на-Дону)

Защита состоится «13» октября 2023 г. в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета 24.1.228.01 при ИФ СО РАН по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, 50, строение 38.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИФ СО РАН и найти на сайте <http://kirensky.ru>

Автореферат разослан «\_\_» июля 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
24.1.228.01,  
д.р. физ.-мат. наук

Втюрин Александр Николаевич

## Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** Во всем мире проводятся интенсивные исследования по разработке быстрых, простых и чувствительных сенсоров для медицинской диагностики и биофизических исследований. На сегодняшний день существует огромное количество разнообразных биосенсоров в основе работы которых лежит молекулярное распознавание и его преобразование в измеримый результат. Тест-системы отличаются по способу преобразования сигнала, его детектирования и типу рецептора [1]. В последнее время, среди всех возможных рецепторов для молекулярного распознавания наибольший интерес вызывают синтетические одноцепочечные РНК или ДНК олигонуклеотиды, называемые аптамерами. Прежде всего они интересны тем, что способны связываться с различными ионами металлов, аминокислотами, белками и даже клетками с высокой аффинностью и специфичностью благодаря образованию уникальной трёхмерной структуры [2]. Однако для создания эффективного биосенсора на их основе необходимы адекватные элементы для преобразования события связывания в физически измеримый сигнал. Так, например, связывание аптамера с белком-мишенью было установлено с помощью ковалентно связанных с аптамером люминесцентных меток [3]. Однако стоит отметить, что добавление меток из различных функциональных групп может поставить под угрозу связывающие свойства аптамеров. В связи с этим, перспективным видится применение оптически активных молекул, которые не будут ковалентно связаны с аптамером. Совместное пребывание в растворе положительно заряженных оптически активных полимеров и отрицательно заряженных аптамеров приводит к образованию полиэлектролитных комплексов, что в свою очередь вызывает значительное тушение люминесценции полимеров. При появлении мишеней аптамеров интенсивность люминесценции сопряженных полимеров усиливается, поскольку аптамер предпочтет связываться с белком-мишенью [4].

Одним из перспективных кандидатов на роль оптически активных полимеров является водорастворимые сопряженные сополимеры на основе флуорена, которые активно применяются в оптоэлектронике. Данный класс полимеров обладает высоким квантовым выходом люминесценции, а длина волны излучения может быть настроена путем добавления различных заместителей в основную или боковую цепь. Более того, изменяя заместители в боковой цепи, можно контролировать растворимость в различных растворителях и заряд полимера в целом. Полимеры на основе флуорена способны специфически преобразовывать событие связывания аптамера с его мишенью в четкий оптический сигнал [5]. Такой, быстрый, чувствительный и селективный метод не требует какой-либо сложной химической модификации аптамеров.

Однако сдерживающим фактором создания биосенсоров на основе двух этих соединений является высокая сложность и длительность синтеза сополифлуоренов и невозможность получения точной структуры аптамеров кристаллографическими методами и, как следствие, непонимание фундаментальных основ взаимодействия аптамер-мишень. В связи с этим видится перспективным применение методов молекулярного моделирования к

этим проблемам. Для сополифлуоренов это позволит установить влияние различных заместителей на оптические свойства и будет способствовать их целенаправленному синтезу. А для аптамеров – поможет установить пространственную структуру, на основе которой возможно проведение различных модификаций с целью повышения связывающей способности и специфичности.

За последние десятилетия произошёл рост вычислительных ресурсов и развитие методов моделирования многоатомных систем, что позволило изучать физические свойства объектов, содержащих свыше тысячи атомов, в том числе макромолекул [6]. Методы развивались сразу в нескольких направлениях, одни шли на уточнение (увеличение точности описания) электронных, оптических, колебательных свойств относительно простых упорядоченных систем или небольших молекул, другие – на увеличение предельных размеров описываемых систем с простыми типами взаимодействия внутри [7]. На сегодняшний день имеется широкий спектр методов молекулярного моделирования начиная с высокоточных квантовохимических методов – метода связанных кластеров (Coupled cluster) [8], до молекулярнодинамических методов – крупнозернистого моделирования (Coarse-grained modeling) [9]. Такой широкий спектр методов даёт понимание свойств самых разнообразных соединений ещё до их синтеза, что в дальнейшем способствует сокращению временных и финансовых затрат на разработку новых устройств, таких как биосенсоры.

**Целью** диссертационной работы является определение физических свойств функциональных органических олигомеров, применяемых в биосенсорах, методами теоретического моделирования.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1. Установить влияние заместителей в основной и боковой цепи на оптические свойства олигомеров флуорена.
2. Восстановить пространственную структуру коротких синтетических олигонуклеотидов RE-31, Gli-55, Gli-233, Apt-31, LC-18t на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) с помощью квантовохимических и молекулярнодинамических методов.
3. Предложить укороченную нуклеотидную последовательность аптамера Gli-55, сохраняющую ключевые особенности пространственной структуры.

**Научная новизна.**

1. Проведены квантовохимические расчёты на TD-DFT/B3LYP уровне теории для олигомеров на основе флуорена с разным числом последовательно стоящих звеньев бензотиазола.
2. Смоделированы вторичные и пространственные структуры аптамеров LC18t, Gli-55, Gli-233 и Apt-31 и сопоставлены с данными МУРР.
3. Предложен укороченный вариант аптамера Gli-55, который сохраняет связывающую способность к клеткам глиобластомы головного мозга на уровне полноразмерного аптамера.

**Теоретическая и практическая значимость.** Методы молекулярного моделирования позволили выявить степень влияния различных заместителей в

основной и боковой цепи на оптические свойства олигомеров на основе флуорена. Установленные данные будут способствовать целенаправленному синтезу сопряженных сополифлуоренов с заданными оптическими свойствами. Также в работе были смоделированы полноатомные конформации пяти различных аптамеров в растворе на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния. Полученные атомные модели будут способствовать проведению различных модификаций структур аптамеров с целью повышения их специфичного связывания с различными белковыми мишенями. Результаты диссертационной работы позволят оптимизировать структуры синтетических олигомеров для практических применений в таких областях, как создание светоизлучающих устройств, био- и хемосенсорике.

**Методология и методы исследования.** Теоретическое моделирование атомной и электронной структуры основного состояния для олигомеров с флуореновыми звеньями проводилось в рамках теории функционала плотности DFT (Density Functional Theory) с использованием гибридного функционала B3LYP. Нахождение резонансных частот поглощения проводилось с помощью метода TD-DFT (Time-Dependent Density Functional Theory), реализованного в программе GAMESS-US. Моделирование различных конформаций аптамера было проведено с помощью молекулярнодинамического моделирования в сочетании с силовым полем Amber14sb, реализованного в программе GROMACS. Оптимизация геометрии молекулярных структур аптамера проводили с использованием квантовохимического метода фрагментации молекулярных орбиталей FMO (Fragment Molecular Orbital) с использованием метода теории функционала плотности в приближении сильной связи DFTB3 (Third-order Density-Functional Tight-Binding), реализованного в программе GAMESS-US.

**Основные положения выносимые на защиту:**

1. Наличие двух соседних звеньев бензотиазола в основной цепи сополифлуорена приводит к красному сдвигу в спектрах поглощения в сравнении со спектром поглощения олигомера, содержащего изолированное звено бензотиазола.

2. Увеличение длины углеродной цепи боковой алкильной группы флуореновых мономеров не влияет на значение энергетической щели и длины волны поглощения олигомера в целом.

3. Расчеты конформаций аптамеров при помощи метода молекулярной динамики Amber14sb/TIP3P позволяют восстановить пространственные структуры в растворе, основываясь на экспериментальных данных малоуглового рентгеновского рассеяния, с точностью, сопоставимой с квантовохимическими расчетами FMO2/DFTB3.

4. Молекулы аптамера LC-18t в растворе при нормальных условиях присутствует в нескольких конформациях, находящихся в термодинамическом равновесии, что существенно проявляется в спектрах МУРР.

5. Аптамер Gli-35, предложенный на основе восстановленной пространственной структуры аптамера Gli-55 и выявленной ключевой части последовательности, имеет аналогичную пространственную конформацию и

проявляет такие же связывающие свойства и более высокую специфичность к клеткам глиобластомы, чем исходная полноразмерная молекула.

**Достоверность результатов.** Применение современных, апробированных методов и согласованность результатов теоретических расчетов с данными, полученными в ходе реальных экспериментов, обеспечивают достоверность результатов диссертационной работы.

**Апробация работы.** Результаты исследований были представлены на конференциях различного уровня и направлений: 54-я Международная научная студенческая конференция (г. Новосибирск, 2016); VI Euro-Asian Symposium «Trends in MAGnetism – ESTMAG-2016» (г. Красноярск, 2016); XIV International Conference on pulsed lasers and laser applications – AMPL-2019 (г. Томск, 2019); «Artamers in Russia 2019» (г. Красноярск, 2019); 65-я Всероссийская научная конференция МФТИ (г. Москва, 2023).

Результаты диссертационной работы докладывались на научных семинарах в Институте физики ФИЦ КНЦ СО РАН (г. Красноярск), Институте высокомолекулярных соединений РАН (г. Санкт-Петербург) и Сибирском федеральном университете (г. Красноярск) (2022-2023).

**Личный вклад** соискателя заключается в построении атомных моделей синтетических олигомеров, проведении квантовохимических и молекулярно-динамических расчётов, интерпретации и обсуждении полученных результатов.

**Благодарности фондам.** Работа выполнена при поддержке фондов: Российского Научного Фонда (№ 21-73-20240); Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ FWES-2022-0005; Межведомственного суперкомпьютерного центра Российской академии наук.

**Публикации.** Основные результаты по теме диссертации изложены в 11 печатных изданиях, 5 из которых изданы в рецензируемых научных журналах рекомендованных ВАК и индексируемых Web of Science и Scopus, 5 – в тезисах докладов. Также получен 1 патент.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 4 глав, основных выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 96 страницах, включая 26 рисунков, 5 таблиц, 95 литературных источников.

## Основное содержание работы

**Во введении** приведена общая характеристика работы, обоснована актуальность исследования свойств синтетических олигонуклеотидов, сформулированы цель и задачи работы, а также приведены основные положения, выносимые на защиту.

**Первая глава** посвящена литературному обзору по теме исследования. Вначале описан принцип работы и основные компоненты биосенсоров. Приведены области их применения и сделан акцент на преимуществах тест-систем на основе аптамеров и сополифлуоренов. Далее дано краткое определение аптамеров и методика их синтеза. Рассмотрены основные преимущества аптамеров в сравнении с антителами. Кратко описаны основные структурные мотивы аптамеров, определяющих их специфичные свойства, а также рассмотрены экспериментальные методы определения структуры аптамеров, сложности, связанные с этим, и пути решения. Далее приведено описание структурных особенностей и оптических свойств сопряженных полимеров, вопросы, связанные с активным развитием данных соединений, а также различные области применения.

**Вторая глава** посвящена описанию теоретических методов исследования атомной и электронной структуры исследуемых синтетических олигомеров. Дается описание теории функционала плотности (DFT), общая схема расчета, а также кратко изложены нестационарная теория функционала плотности (TD-DFT) и теория функционала плотности в приближении сильной связи DFTB3. Также рассмотрены основы метода молекулярной динамики. Описана идеология и методика расчета метода фрагментации молекулярных орбиталей (FMO).

**Третья глава** посвящена изучению оптических свойств олигомеров на основе флуорена с различным числом звеньев бензотиазола в основной цепи, а именно с одним (FBF-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) и с двумя (F2BF-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>), а также с различными алкильными заместителями в боковой цепи, а именно с октильным (FBF-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) и метильным (FBF-CH<sub>3</sub>) радикалами [A1]. В работе были рассчитаны спектры поглощения олигомеров с одним и двумя звеньями бензотиазола методом TDDFT/B3LYP/6-31G(p,d) (рисунок 1а). По данным спектрам видно, что максимум спектра поглощения молекулы с двумя звеньями бензотиазола сдвинут в более длинноволновую часть спектра, относительно молекулы с одним звеном бензотиазола, при этом красный сдвиг составил 0,08 эВ. Схожее поведение спектров поглощения аналогичных олигомеров было отмечено в экспериментальных работах [10,11], величина сдвига составила 0,13 эВ. Для объяснения красного сдвига, были рассчитаны энергии высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) и низшей вакантной молекулярной орбитали (НВМО) (рисунок 1б).

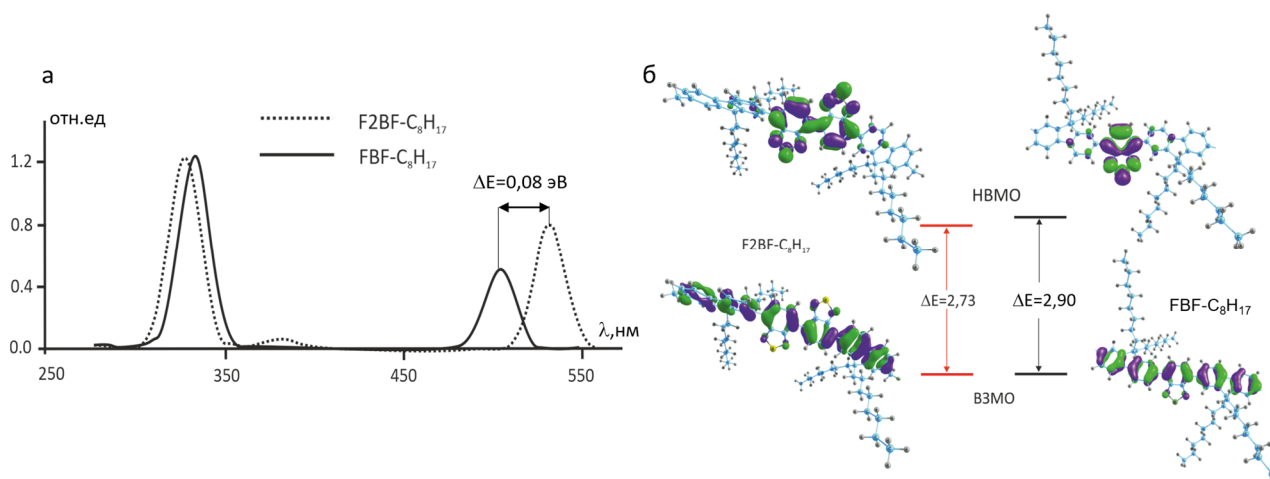


Рис. 1 – Спектры поглощения (а) и вид молекулярных орбиталей, участвующих в переходе  $S_0-S_1$  (б), олигомеров FBF- $C_8H_{17}$  и F2BF- $C_8H_{17}$

Энергия ВЗМО практически не меняется между моделями, поскольку орбитали для обоих олигомеров расположены вдоль всей сопряженной цепи и делокализованы примерно одинаково. При этом энергия НВМО понижается для молекулы F2BF- $C_8H_{17}$ , так как электроны на ней локализованы на двух звеньях бензотиазола, вместо одного.

Для понимания влияния боковых заместителей были рассмотрены молекулярные орбитали молекул FBF- $C_8H_{17}$  и FBF- $CH_3$ . Из рисунка 2а видно, что электроны алкильных заместителей практически не вносят вклад в образование ВЗМО и НВМО и, соответственно, не должны сильно влиять на оптические спектры олигомеров в целом. Квантовохимические расчеты спектров поглощения это подтверждают: максимумы поглощения для молекул FBF- $C_8H_{17}$  и FBF- $CH_3$  составили 2,46 эВ и 2,47 эВ, соответственно (рисунок 2б).

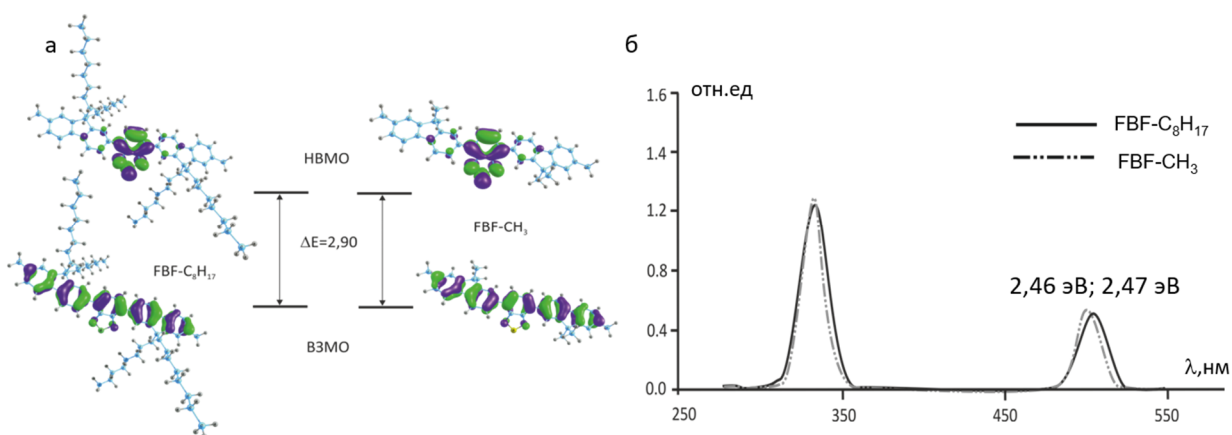


Рис. 2 – Вид молекулярных орбиталей, участвующих в переходе  $S_0-S_1$  (а), и спектры поглощения (б) молекул FBF- $C_8H_{17}$  и FBF- $CH_3$

По представленным результатам видно, что теоретические расчеты имеют хорошее согласие с экспериментальными данными. Для уменьшения стоимости расчётов возможно моделировать олигомеры с короткими алкильными заместителями, при этом не теряя в качестве описания фотофизических свойств.



Полученные результаты позволят выработать рекомендации для дизайна сопряжённых светоизлучающих полимеров на основе флуорена и различных заместителей в основной цепи, а также, способствовать целенаправленному синтезу полимеров с заданными оптическими свойствами.

**Четвертая глава** посвящена моделированию атомной структуры аптамеров [A2-A6]. Молекулярная структура аптамеров определяет их функцию и зависит от многих факторов: молекулярного окружения, температуры, pH раствора, сольватированных ионов и др. Компьютерное моделирование помогает создавать молекулярные модели в условиях реального раствора [12]. Ранжирование молекулярных структур по свободной энергии Гиббса, то есть предсказание того, какие из них более вероятны, является сложной вычислительной задачей. Поэтому теоретические модели могут быть верифицированы экспериментальными данными, например, путём сравнения со структурами из рентгеновской кристаллографии, однако, до сих пор, получение кристаллов аптамеров было невозможным, а процесс получения кристаллической структуры их белковых комплексов является трудоемкой и сложной задачей. Более того, данные рентгенографии не показывают возможные конформационные изменения в условиях реального раствора, которые могут быть более важными для моделирования реальных систем [13]. В этой связи для верификации теоретических структур было предложено использование малоуглового рассеяния рентгеновского лучей (МУРР). Ключевым преимуществом этой технологии является возможность измерения образцов в растворе в реальных условиях [14].

На примере моделирования пространственной структуры аптамера RE-31 была показана эффективность совместного применения метода молекулярной динамики и МУРР [A2, A6]. Из литературы известна нуклеотидная последовательность и вторичная структура данного аптамера [15]. Она состоит из трёх частей: 1) дуплексная часть (рисунок 3а, красный); 2) некомплементарных нуклеотидов (рисунок 3а, зелёный); 3) квадруплекс, состоящий из двух гуаниновых плоскостей и петель, соединяющих их (рисунок 3а, чёрный). На основе неё была смоделирована пространственная структура RE-31 и проведена оптимизация геометрии полуэмпирическим методом РМ6 в газовой фазе, с дальнейшим проведением расчета молекулярной динамики (МД), где в явном виде задавался растворитель (вода и ионы натрия и хлора), температура, давление, которые соответствовали экспериментальным условиям в МУРР. Экспериментальные данные МУРР были получены коллегами из Лаборатории физики магнитных явлений (ФМЯ) Института Физики им. Л.В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН на станции DICSU Курчатовского института (Москва). Сравнение кривых рассеяния теоретических моделей с экспериментальной кривой показало, что наименьшее отклонение от эксперимента имеет модель, полученная из расчета МД, при этом  $\chi^2$  уменьшился почти в два раза (с 4,79 до 2,56) относительно модели, полученной из полуэмпирического метода РМ6 (рисунок 3).

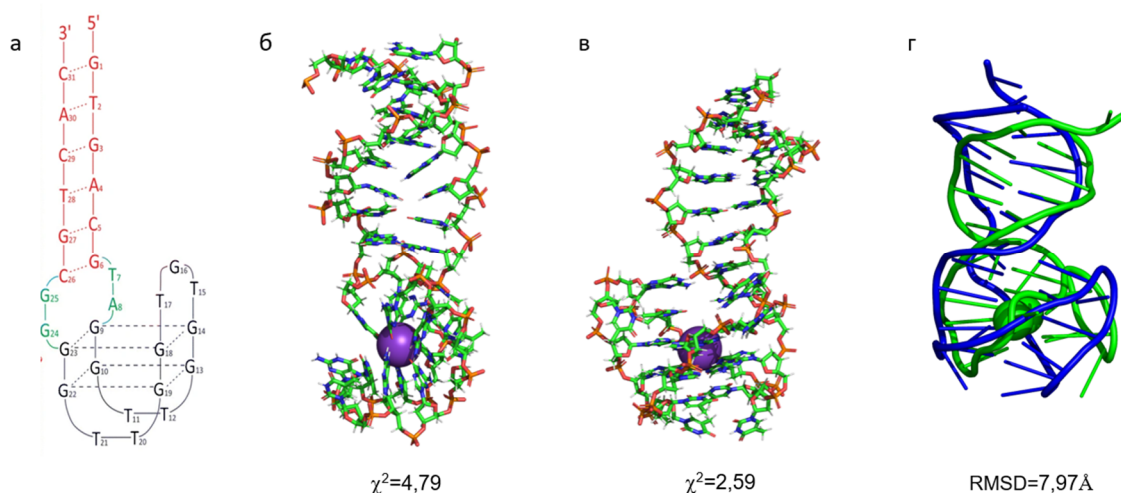


Рис. 3 – Вторичная (а) и пространственные структуры аптамера RE-31, полученные разными методами: (б) РМБ, (в) МД, (г) сравнение структур из МД (зеленый) и XRD (синий)

Было проведено сравнение модели из МД с кристаллической структурой аптамера RE-31 [15], при этом среднеквадратичное отклонение было достаточно велико (7,97 Å), что лишь подтверждает тот факт, что аптамер в растворе имеет другую конформацию по сравнению с кристаллом. При этом совместное применение МУРР и молекулярного моделирования дает представление о конформации аптамера именно в растворе, что более важно с точки зрения последующего применения.

Для дальнейшей работы по моделированию атомных структур аптамеров, для которых известна лишь нуклеотидная последовательность, были предложены следующие основные этапы моделирования и соответствующий набор методов и программ:

1. Моделирование вторичных структур на основе нуклеотидных последовательностей в программе mFold [16]. Данный этап даёт общее представление о том, как будут выглядеть основные структурные элементы аптамера, а именно, где будут комплементарные и некомплементарные участки, петли, квадруплексы, одинарные нити нуклеотидов и т.д.

2. Моделирование 3D-модели на основе вторичной структуры в программе Avogadro [17]. Данный этап позволяет получить первоначальное понимание атомной структуры аптамера и расположение в пространстве основных структурных элементов.

3. Проведение расчетов молекулярной динамики с силовым полем Amber14sb [18] и моделью воды TIP3P [19] в программном пакете GROMACS [20]. Даёт информацию о конформационных изменениях аптамера в растворе с явным учётом растворителя, температуры и давления.

4. Проведение квантовохимических расчётов методом FMO2/DFTB3-Zorb/PCM [21] с использованием программного пакета GAMESS [22]. Уточнение атомной структуры, полученной на предыдущем шаге (3).

5. Сравнение теоретических кривых рассеяния, полученных от атомных моделей из 3 и 4 пункта, с экспериментальной кривой рассеяния МУРР в

программе CRY SOL [23]. Данный этап помогает отобрать только те конформации аптамеров, которые имеют наименьшее отклонение от эксперимента.

Данная методология была применена к аптамеру LC-18t [A3], специфичному к клеткам аденокарциномы лёгкого, который был синтезирован коллегами из лаборатории бимолекулярных и медицинских технологий (БиоМед) Красноярского медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (КрасГМУ). Согласно выстроенной методике, на начальном этапе на основе нуклеотидной последовательности 5'-CGAACGCGAG TTGAGTTCCG AGAGCTCCGAC TTCT-3' были предсказаны вторичные структуры аптамера LC-18t (рисунок 4 а, б). Моделирование проводилось при концентрации ионов 146 мМ Na<sup>+</sup> и 0,5 мМ Mg<sup>2+</sup> при 20°С, что соответствовало условиям, в которых проводился эксперимент МУРР. Данные МУРР были получены коллегами из лаборатории ФМЯ Института Физики ФИЦ КНЦ СО РАН на синхротроне DESY в Германии. В результате моделирования получены 4 модели, на основе которых были смоделированы пространственные структуры, с последующим проведением расчетов молекулярной динамики Amber14sb/TIP3P и квантовохимических расчетов методом FMO2/DFTB3/PCM (рисунок 4 в, г, д).

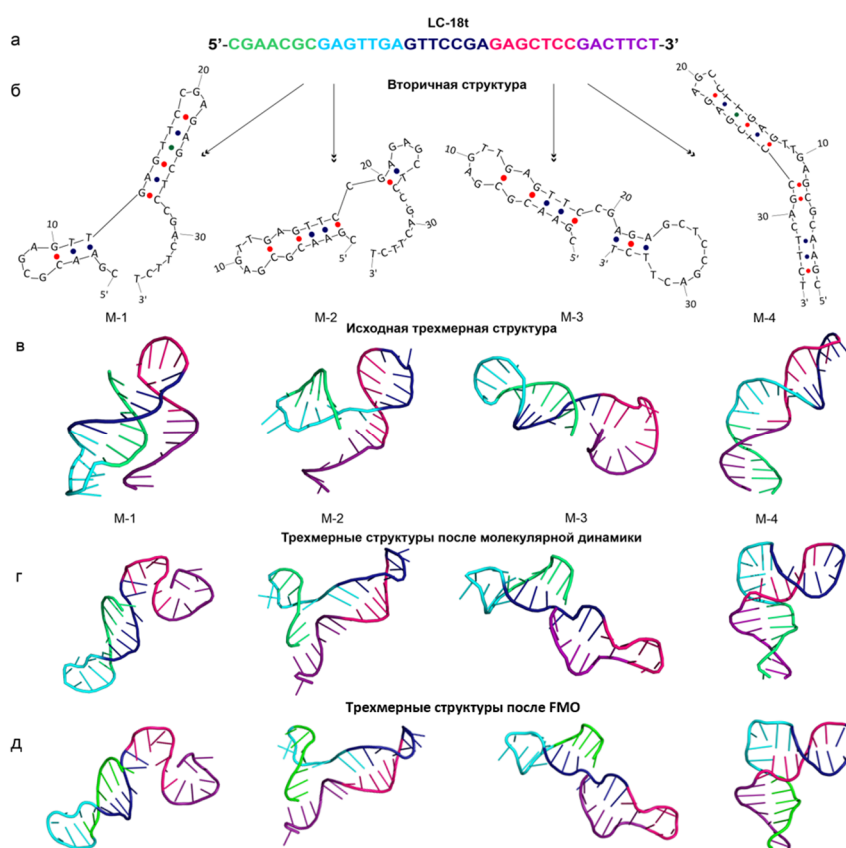


Рис. 4 – Молекулярное моделирование структуры аптамера.

Последовательность аптамера LC-18t, (б) вторичные структуры, (в) пространственные структуры, (г) пространственные структуры после расчета молекулярной динамики, (д) пространственные структуры после проведения квантовохимического расчета. 3'-конец – фиолетовый; центральная часть темно-синего цвета, а 5'-конец – зелёного цвета.

По моделям 1 и 2 (рисунок 4 в, г) видно, что после проведения расчёта молекулярной динамики, наибольшее изменение в структуре произошло в одинарных нитях аптамера (фиолетовые), поскольку они достаточно гибки в растворе. При этом наименьшие изменения произошли в комплементарных участках всех моделей, поскольку дуплексная часть достаточно жесткая и мало подвержена конформационным изменениям. Далее в работе проводилось сравнение кривых рассеяния от смоделированных моделей с экспериментальными данными МУРР (таблица 1).

Таблица 1 – Отклонения  $\chi^2$  экспериментальной кривой МУРР для LC-18t от смоделированных кривых на основе расчетов МД и FMO.

Модели LC-18t	$\chi^2$	
	MD	FMO
M-1	3.28	2.48
M-2	8.47	8.39
M-3	2.62	2.69
M-4	25.32	21.59

По полученным данным видно, что наименьшее отклонение от эксперимента среди структур, полученных из МД, имеют модели M-1 и M-3, а наибольшее отклонение имеет модель M-4. Такая же тенденция наблюдается и для моделей, полученных из FMO расчета, при этом  $\chi^2$  моделей M-1 и M-3 по-прежнему достаточно близки.

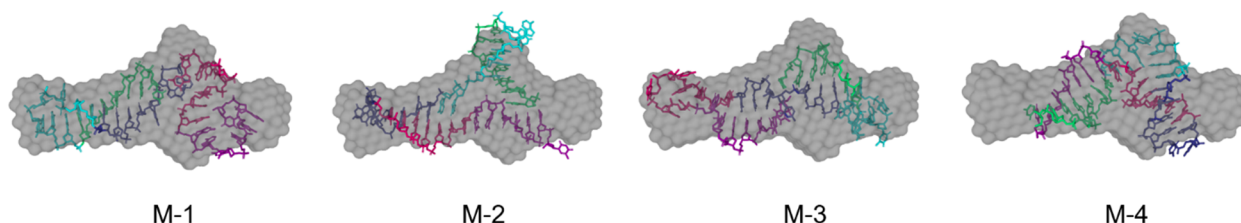


Рис. 5 – Сопоставление возможных конформаций аптамера из расчета МД с его общей электронной плотностью (серый), полученной методом МУРР в программе DAMMIN [24].

По рисунку 5 видно, что одни модели достаточно хорошо описывают выпуклые части шариковой модели электронной плотности (модель 2 и 4), а другие – хорошо описывают ее линейные размеры (модель 1 и 3). При этом не исключено, что некоторый объем, казавшийся пустым для моделей M-1 и M-3 на рисунке 5, может быть частично занят небольшими отклонениями в структуре того же конформера, вызванными локальным вращением гибких групп. В целом видно, что одна и та же конформация аптамера LC-18t физически не может выполнять два условия сразу: хорошо описывать выпуклые части и соответствовать линейным размерам. Наиболее правдоподобное объяснение

состоит в том, что релевантны несколько конформеров (моделей), то есть, они имеют близкую свободную энергию и сосуществуют в растворе.

В работе так же были исследованы возможные конформации аптамера Gli-55, который специфично связывается с клетками глиобластомы головного мозга [A5]. Данный аптамер был синтезирован коллегами из лаборатории БиоМед КрасГМУ. На основе его экспериментально установленной нуклеотидной последовательности, состоящей из 60 нуклеотидов, 5'-GTCCG GTTCA CCTCT AGCAT TCCTG GCGTT ATТАА CGGAG CAGTC CTGTG GAGTG GGTGA-3', было смоделировано три различных вторичных структуры в программе mFold. Моделирование проводилось при концентрации ионов 146 mM Na<sup>+</sup> и 0,5 mM Mg<sup>2+</sup> при 20 °С, что соответствовало условиям, в которых проводился эксперимент МУРР. Моделирование и визуализация пространственных структур аптамера проводились с помощью программ Avogadro.

Поскольку нуклеотидная последовательность данного аптамера богата гуанинами, то он может образовывать более сложную структуру, а именно G-квадруплекс. Из специализированной программы QGRS Mapper [25] была получена информация о предполагаемых G-квадруплексах. Данный аптамер может образовывать квадруплекс только в одной части последовательности (рисунок 6 а). С помощью специализированной программы 3D-Nus [26] было смоделировано 3 возможных варианта – параллельный, антипараллельный и гибридный квадруплексы (рисунок 6 б)

а 5'-GTCCGGTTC ACCTCTAGCAT TCCT GCGTT ATТАА CGGAG CAGTCCTGTG GAGTGGGTGA - 3'

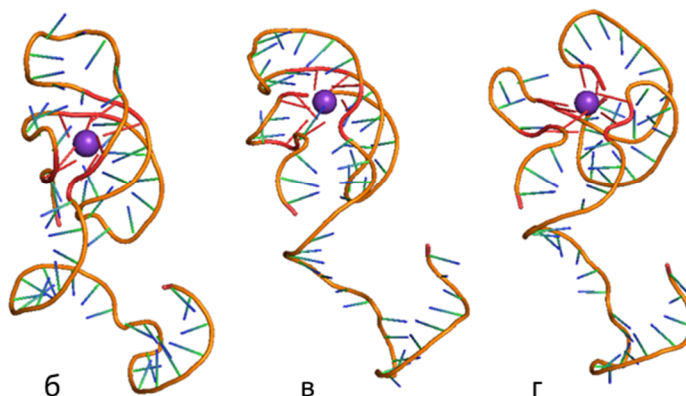


Рис.6 – Трёхмерные модели квадруплекса аптамера Gli-55. а – нуклеотидная последовательность аптамера; б – антипараллельный; в – гибридный; г – параллельный

Для всех моделей проводились расчёты молекулярной динамики и, далее, строились кривые рассеяния с последующим сравнением с МУРР, полученными коллегами из лаборатории ФМЯ Института Физики им. Л.В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН на синхротроне DESY (Германия). Для моделей с наименьшим отклонением от эксперимента проводились квантовохимические расчёты методом FMO/DFTB3/PCM и так же проводилось сравнение с кривыми МУРР.

Значения отклонений  $\chi^2$  между экспериментальными и смоделированными профилями МУРР приведены в таблице 2.

Таблица 2. Отклонения  $\chi^2$  экспериментальной кривой МУРР для Gli-55 от смоделированных кривых на основе расчетов МД и FMO.

Модели Gli-55	$\chi^2$	
	МД	FMO
М-1	2,18	1,94
М-2	7,95	6,76
М-3	3,70	3,42
Параллельный	2,67	2,65
Гибридный	4,09	
Антипараллельный	4,18	

Наименьший  $\chi^2$  имели модель 1 и модель с параллельным квадруплексом, как в расчетах МД (2,18 и 2,67), так и в расчетах FMO (1,94 и 2,65, соответственно). Поскольку квадруплекс обладает хиральностью, коллегами лаборатории ФМЯ Института Физики ФИЦ КНЦ СО РАН получен спектр кругового дихроизма, который показал пики на длинах волн 220 и 280 нм, что говорит об отсутствии квадруплекса [27] (рисунок 7 а). Соответственно, наиболее близкая конформация аптамера к эксперименту МУРР соответствует модели 1.

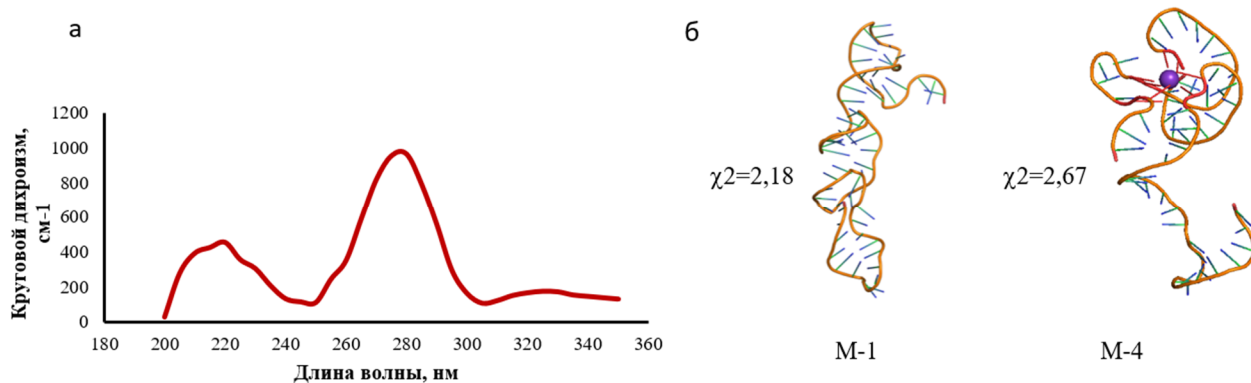


Рис. 7 – Спектр кругового дихроизма (а) и возможные пространственные структуры аптамера Gli-55 (б).

От длины нуклеотидной последовательности зависит конечная стоимость аптамера, в этой связи желательно получить короткую версию аптамера, сохраняющую свойства предшественника. В работе предложен вариант укорачивания аптамера Gli-55 на основе его вторичной и третичной структуры. Поскольку за специфичное связывание отвечает не только нуклеотидная последовательность, но и уникальная пространственная структура, укорачивание необходимо выполнить таким образом, чтобы максимально сохранить структурные мотивы исходного шестидесяти нуклеотидного аптамера



Gli-55. Конформационным изменениям меньше всего подвержена жёсткая дуплексная часть, поэтому аптамер был сокращён с сохранением наибольшего числа комплементарных участков (рисунок 8а). В результате обрезки получен аптамер Gli-35 имеющий аналогичную вторичную структуру, что и аптамер Gli-55. Более того, пространственная геометрия также достаточно близка к геометрии полноразмерного аптамера (рисунок 8 а, б). Отличие в структурах аптамеров Gli 55 и Gli-35 заключалось лишь в одинарной нити нуклеотидов (рисунок 8 а, б, фиолетовый цвет), которая в растворе обладает конформационной гибкостью.

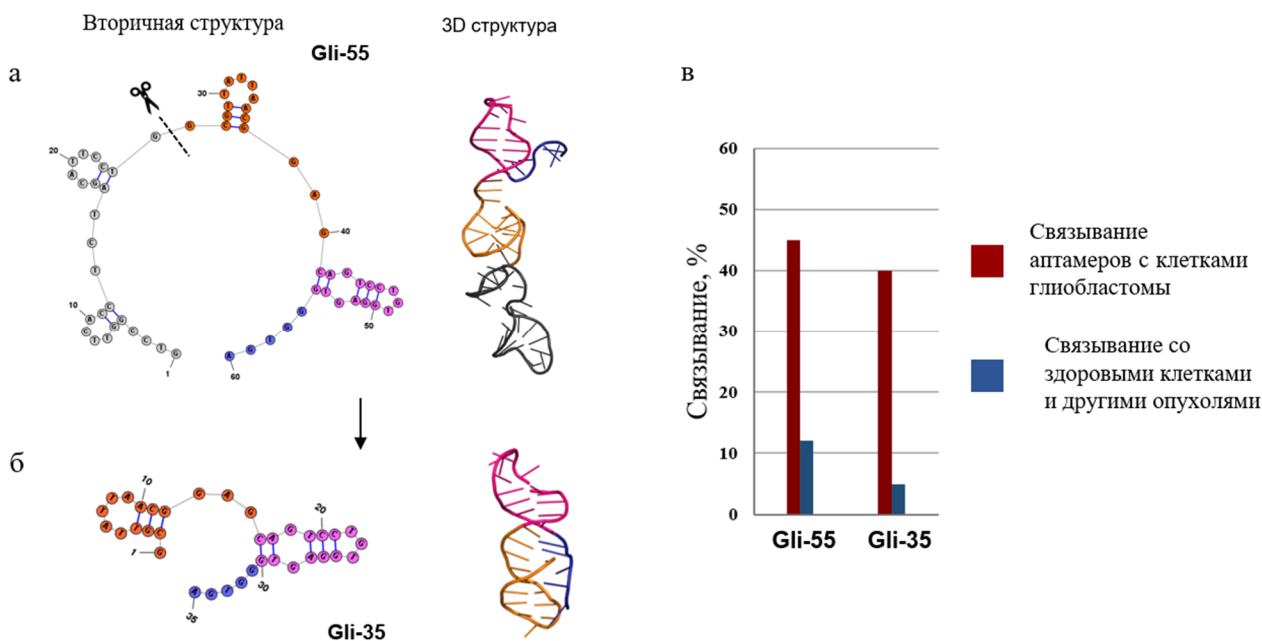


Рис. 8 – Вторичная и пространственная структуры аптамеров Gli-55 (а) и Gli-35 (б); (в) – доля связанных клеток для исходного и укороченного аптамера

В лаборатории БиоМед КрасГМУ было проверено связывание аптамеров с клетками глиобластомы головного мозга при помощи метода проточной цитометрии. Из рисунка 8 в видно, что доля клеток, связывающихся с аптамерами Gli-55 и Gli-35, составляет 45% и 40%, соответственно. Аптамеры проявляют близкие связывающие свойства, но при этом полученная укороченная последовательность почти в 2 раза меньше исходной. Более того, у укороченной версии аптамера повысилась специфичность. Данный результат показал эффективность применения молекулярного моделирования для установления пространственной структуры аптамеров и проведения на ее основе укорачивания нуклеотидной последовательности с сохранением связывающих свойств.

Так же были определены пространственные структуры аптамеров Gli-233 и Apt-31 [A4, A5], которые специфично связываются с клетками глиобластомы головного мозга и рецептор связывающим доменом вируса SARS-CoV-2, соответственно. Коллегами лаборатории ФМЯ Института Физики ФИЦ КНЦ СО РАН получены кривые рассеяния МУРР на станции ESRF (Франция) для аптамера Gli-233 и на станции БиоМУР (Москва) для Apt-31 (рисунок 9 а.1 и б.1).

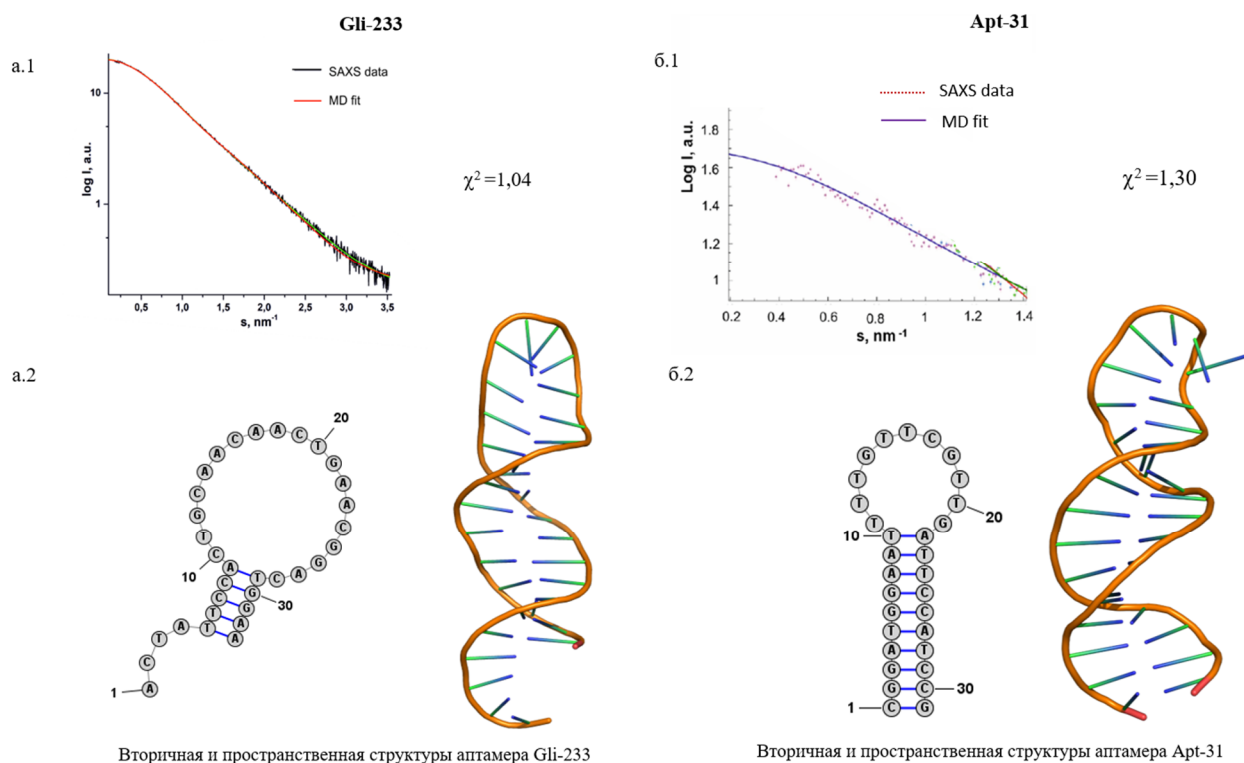


Рис. 9 – Теоретические и экспериментальные кривые рассеяния МУРР для аптамеров Gli-233 (а.1) и Apt-31 (б.1). Вторичные и пространственные структуры аптамеров

Полученные 3D-структуры имели небольшое отклонение от эксперимента МУРР ( $\chi^2$  составили 1,04 и 1,30 для аптамера Gli-233 и Apt-31, соответственно). Это связано с тем, что их структура достаточно жесткая и мало подвержена конформационным изменениям в растворе, поскольку состоит из протяженного дуплексного участка и небольшой петли на конце.

В целом, методы молекулярного моделирования позволяют изучить и спрогнозировать ключевые характеристики атомной и электронной структуры новых материалов на базе таких синтетических макромолекул как сополифлуорены и аптамеры, что в дальнейшем может способствовать разработке более эффективных биосенсоров на их основе для различных задач.

**В заключении** приведены основные результаты и выводы работы:

1. Показано, что увеличение числа бензотиазольных групп в цепи сополифлуорена приводит к уменьшению энергетической щели с 2,90 эВ до 2,73 эВ и, как следствие, к изменению спектральных свойств. Теоретически рассчитанный спектр поглощения олигомера с двумя звеньями бензотиазола сдвигается в длинноволновую область спектра на 0,08 эВ по сравнению с олигомером, содержащим одно звено бензотиазола, что согласуется с экспериментальными данными для соответствующих олигомеров.

2. Расчеты олигомеров сополифлуоренов с боковыми алкильными заместителями показали, что электронные состояния цепи предельных углеводородов не вносят вклад в образование молекулярных орбиталей,



определяющих основные электронные переходы в поглощении и люминесценции. Рассчитанные теоретические спектры поглощения олигомеров с различными алкильными заместителями показали, что их длина не оказывает существенное влияние на оптические свойства.

3. На примере аптамера RE-31 показано, что применение метода молекулярной динамики позволяет восстановить геометрию молекулы в растворе, которая лучше описывает экспериментальные кривые рассеяния малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) в сравнении с атомной структурой, полученной полуэмпирическим методом РМб.

4. Смоделированы вторичные и третичные атомные структуры ряда ДНК-аптамеров в растворе на основе экспериментальных данных МУРР. Равновесные геометрии аптамеров Gli-55 и LC-18t полученные методами MD/Amber14sb/TIP3P и FMO/DFTB3 одинаково хорошо согласуются с экспериментом МУРР.

5. На основе сопоставления кривых рассеяния теоретических моделей аптамера LC-18t, полученных из расчётов методами молекулярной динамики и функционала плотности, с экспериментальной кривой рассеяния МУРР, показано, что в растворе сосуществуют несколько конформаций.

6. В результате расчёта атомной структуры аптамера Gli-55 с шестьюдесятью нуклеотидами были выявлены ключевые участки, ответственные за формирование пространственной конфигурации и предложена укороченная версия аптамера с тридцатью пятью нуклеотидами – Gli-35, сохраняющая их. Согласно экспериментальным данным упрощенная молекулярная структура повышает специфичность и сохраняет связывающую способность с клетками глиобластомы головного мозга, в сравнении с полноразмерным аптамером Gli- 55.

## Публикации по теме диссертации

A1. Smyslov R. Yu. Synthesis and photophysical properties of copolyfluorenes for light emitting applications: Spectroscopic experimental study and theoretical DFT consideration / R. Yu. Smyslov, F. N. Tomilin, **I. A. Shchugoreva**, G. I. Nosova, E. V. Zhukova, L. S. Litvinova, A. V. Yakimansky, I. Kolesnikov, I. G. Abramov, S. G. Ovchinnikov, P. V. Avramov // *Polymer*. – 2019. – Т. 168. – P. 185 – 198.

A2. Tomilin F. N. Four steps for revealing and adjusting the 3D structure of aptamers in solution by small-angle X-ray scattering and computer simulation / F. N. Tomilin, R. V. Moryachkov, **I. A. Shchugoreva**, V. N. Zabluda, G. Peters, M. Platonov, V. Spiridonova, A. Melnichuk, A. Atrokhova, S. S. Zamay, S. G. Ovchinnikov, G. S. Zamay, A. Sokolov, T. N. Zamay, M. V. Berezovski, A. S. Kichkailo // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2019. – Т. 411. – P. 6723 – 6732.

A3. Morozov D. The role of SAXS and molecular simulations in 3D structure elucidation of a DNA aptamer against lung cancer / D. Morozov, V. Mironov, R. V. Moryachkov, **I. A. Shchugoreva**, P. V. Artyushenko, G. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, T. N. Zamay, A. V. Krat, D. S. Molodenskiy, V. N. Zabluda, D. V. Veprintsev, A. E. Sokolov, R. A. Zukov, M. V. Berezovski, F. N. Tomilin, D. G. Fedorov, Y. Alexeev, A. S. Kichkailo // *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. – 2021. – Т. 25. – P. 316 – 327.

A4. Mironov V. Structure-and Interaction-Based Design of Anti-SARS-CoV-2 Aptamers / V. Mironov, **I. Shchugoreva**, P. Artyushenko, D. Morozov, N. Borbone. et al. // *Chemistry–A European Journal*. – 2022. – Т. 28. – №. 12. – P. e202104481.

A5. Kichkailo A. S. Development of DNA Aptamers for Visualization of Glial Brain Tumors and Detection of Circulating Tumor Cells / A. S. Kichkailo, A. A. Narodov, M. A. Komarova, T. N. Zamay, G. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, E. E. Erakhtin, Y. E. Glazyrin, D. V. Veprintsev, R. V. Moryachkov, V. V. Zabluda, **I. Shchugoreva**, P. Artyushenko, et al. // *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. – 2023. – Т. 32. – P. 267 – 288.

## Патенты:

A6. RU 2751797 C1. Способ определения пространственной структуры биомолекул / Морячков Р. В, Слатинская О. В., **Щугорева И. А.**, Заблуда В. Н., Соколов А. Э. // № 2020140839 заявл. 11.12.2020., опубли. 19.07.2021.

## Список литературы

1. Biosensors: fundamentals and applications / ed. Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. Oxford; New York: Oxford University Press. – 1987. – P. 770.

2. Cai S. et al. Investigations on the interface of nucleic acid aptamers and binding targets // *Analyst*. – 2018. – Vol. 143, № 22. – P. 5317–5338.

3. Hamaguchi N., Ellington A., Stanton M. Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins // *Analytical Biochemistry*. – 2001. – Vol. 294, № 2. – P. 126–131.

4. Ho H.-A., Leclerc M. Optical Sensors Based on Hybrid Aptamer/Conjugated Polymer Complexes // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 126, № 5. – P. 1384–1387.

5. Bao B. et al. Rapid aptasensor capable of simply detect tumor markers based on conjugated polyelectrolytes // *Talanta*. – 2018. – Vol. 190. – P. 204–209.

6. Schlick T., Portillo-Ledesma S. Biomolecular modeling thrives in the age of technology // *Nat Comput Sci.* – 2021. – Vol. 1, № 5. – P. 321–331.
7. Schlick T. *Biomolecular Structure and Modeling: Historical Perspective // Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide.* New York, NY: Springer New York. – 2010. – Vol. 21. – P. 1–40.
8. Shavitt I., Bartlett R.J. *Many-body methods in chemistry and physics: MBPT and coupled-cluster theory.* Cambridge; New York: Cambridge University Press, – 2009. – P. 532.
9. Riniker S., Allison J.R., Van Gunsteren W.F. On developing coarse-grained models for biomolecular simulation: a review // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2012. – Vol. 14, № 36. – P. 12423.
10. Anant P., Lucas N.T., Jacob J. A Simple Route toward the Synthesis of Bisbenzothiadiazole Derivatives // *Org. Lett.* – 2008. – Vol. 10, № 24. – P. 5533–5536.
11. Wu F.-I. et al. Efficient White-Electrophosphorescent Devices Based on a Single Polyfluorene Copolymer // *Adv. Funct. Mater.* – 2007. – Vol. 17, № 7. – P. 1085–1092.
12. Jeevanandam J. et al. Advancing Aptamers as Molecular Probes for Cancer Theranostic Applications—The Role of Molecular Dynamics Simulation // *Biotechnol. J.* – 2020. – Vol. 15, № 3. – P. 1900368.
13. Li J. Not so crystal clear: the structure of the human telomere G-quadruplex in solution differs from that present in a crystal // *Nucleic Acids Research.* – 2005. – Vol. 33, № 14. – P. 4649–4659.
14. Da Vela S., Svergun D.I. Methods, development and applications of small-angle X-ray scattering to characterize biological macromolecules in solution // *Current Research in Structural Biology.* Elsevier BV, – 2020. – Vol. 2. – P. 164–170.
15. Russo Krauss I. et al. Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44, № 2. – P. 983–991.
16. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Research.* – 2003. – Vol. 31, № 13. – P. 3406–3415.
17. Hanwell M.D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform // *Journal of Cheminformatics.* – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 17.
18. Ivani I. et al. Parmbsc1: A refined force field for DNA simulations // *Nature Methods.* Nature Publishing Group, – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 55–58.
19. Jorgensen W.L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *The Journal of Chemical Physics.* American Institute of Physics AIP, – 1983. – Vol. 79, № 2. – P. 926–935.
20. Abraham M.J. et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX.* Elsevier B.V., – 2015. – Vol. 1–2. – P. 19–25.
21. Nishimoto Y., Fedorov D.G. The fragment molecular orbital method combined with density-functional tight-binding and the polarizable continuum model // *Physical Chemistry Chemical Physics.* Royal Society of Chemistry, – 2016. – Vol. 18, № 32. – P. 22047–22061.

22. Barca G.M.J. et al. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system // *The Journal of Chemical Physics*. – 2020. – Vol. 152, № 15. – P. 154102.
23. Svergun D., Barberato C., Koch M.H. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates // *Journal of Applied Crystallography*. International Union of Crystallography, – 1995. – Vol. 28, № 6. – P. 768–773.
24. Svergun D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing // *Biophysical Journal*. Biophysical Society, – 1999. – Vol. 76, № 6. – P. 2879–2886.
25. Kikin O., D'Antonio L., Bagga P.S. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34, № Web Server. – P. W676–W682.
26. Patro L.P.P. et al. 3D-NuS: A Web Server for Automated Modeling and Visualization of Non-Canonical 3-D imensional Nu cleic Acid S tructures // *Journal of Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 429, № 16. – P. 2438–2448.
27. Del Villar-Guerra R., Trent J.O., Chaires J.B. G-quadruplex secondary structure from circular dichroism spectroscopy: *Angewandte Chemie*. – 2018. – T. 130. – №. 24. – P. 7289-7293.

Отпечатано в типографии Института физики им. Л.В. Киренского  
Сибирского отделения Российской академии наук –  
обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН

Тираж 70 экз. Заказ № 6. Объем 1.15 усл. печ. л. Формат 60x84/16.  
660036, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Академгородок, д.50, стр. 38