



Кафедра  
Биоинженерии  
Биологического факультета МГУ

# ДИЗАЙН ПРОГРАММИРУЕМЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ

Дипломную работу выполнил

Фескин Павел Григорьевич

Научный руководитель:

профессор, д-р ф.-м. наук, чл.-корр. РАН

Шайтан Алексей Константинович

2025

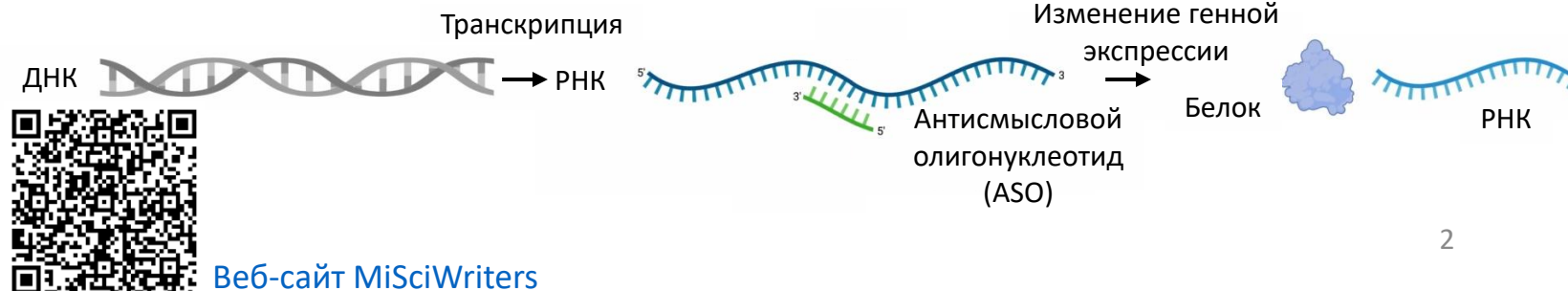
# Регуляция экспрессии генов

## Центральная догма молекулярной биологии



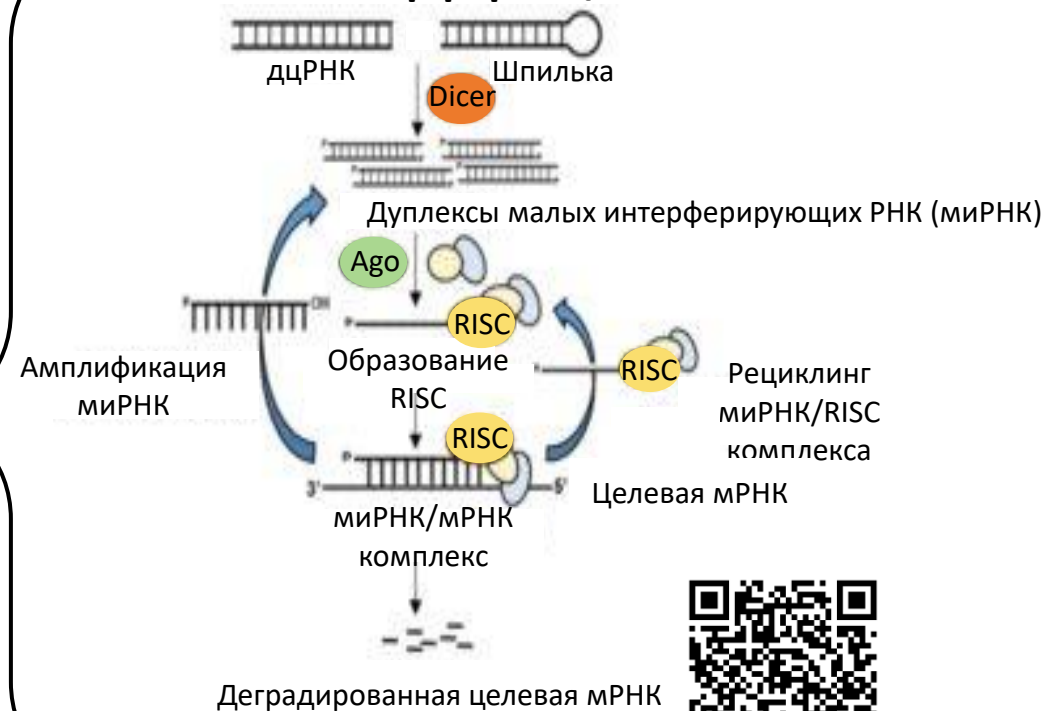
[Веб-сайт WIKIMEDIA COMMONS](#)

## Антисмысловые олигонуклеотиды как лекарственный препарат



[Веб-сайт MiSciWriters](#)

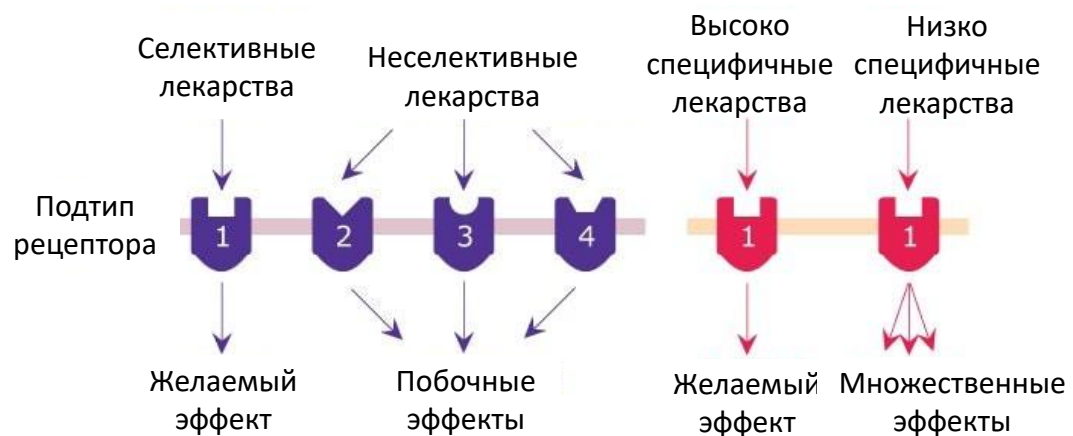
## РНК-интерференция



[Веб-сайт MICROBIOLOGY NOTES](#)

# Нанотехнологии в терапии

**Идеальное лекарство должно быть селективным и специфичным**



[Веб-сайт Sigma-Aldrich](#)



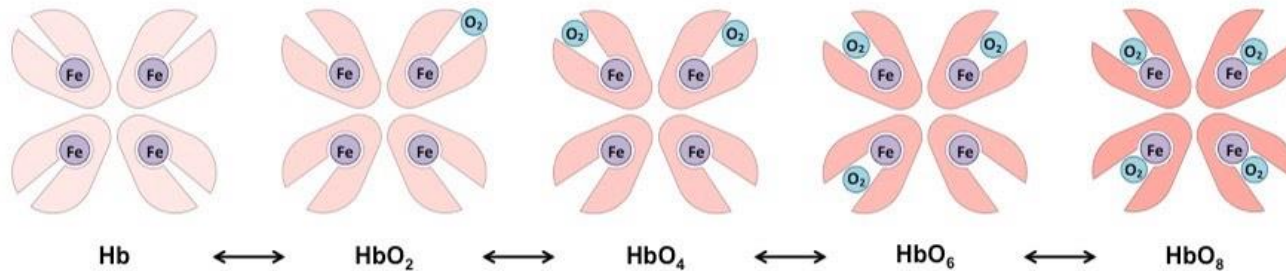
## ДНК Нанотехнологии в терапии



[Chen, 2018](#)

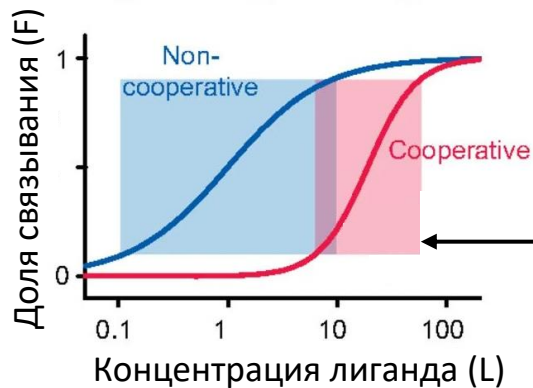
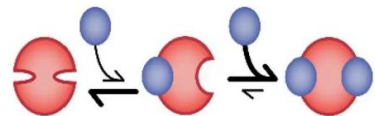
# Явление кооперативности

## Кооперативное связывание кислорода гемоглобином



Низкое  $\longleftrightarrow$  Средство к связыванию кислорода  $\longleftrightarrow$  Высокое

[Веб-сайт BioNinja](http://www.bioninja.com)

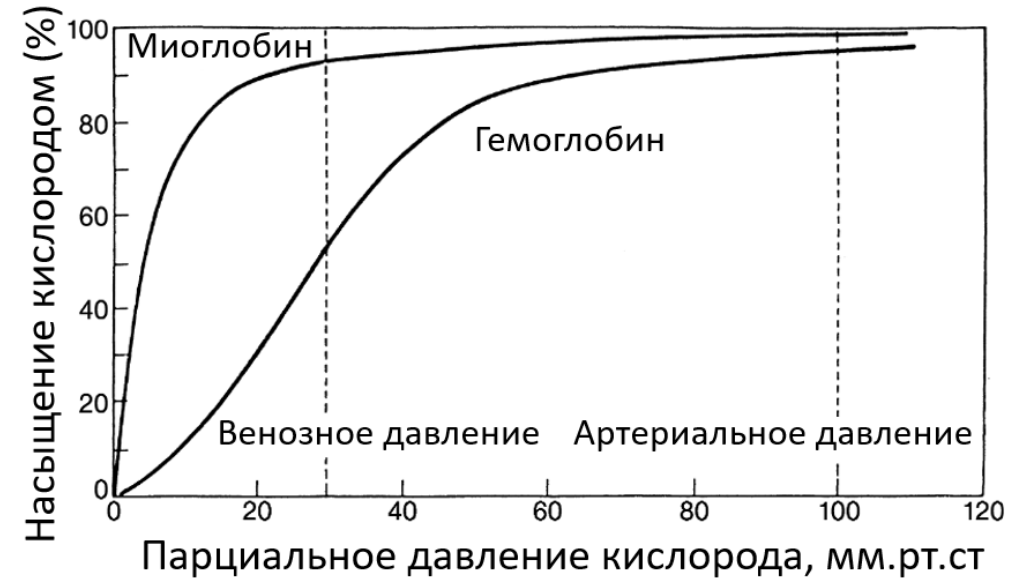


Чем ниже  $L(0.9/0.1)$ , тем выше кооперативность

$$L_{0.9/0.1} = \frac{L(F = 0.9)}{L(F = 0.1)}$$



[Simon, 2014](#)



$n$  – число сайтов

связывания;

$[R]_0$  – начальная концентрация рецептора;

$[L]$  – концентрация свободного лиганда;

$[L]_{\text{bound}}$  – концентрация связанного лиганда;

$F$  – доля связывания.

## Уравнение Хилла

$$nL + R \xrightleftharpoons[k_-]{k_+} L_nR$$

$$F = \frac{[L]_{\text{bound}}}{n[R]_0} = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n}$$

# Цель и задачи работы

## Цель работы:

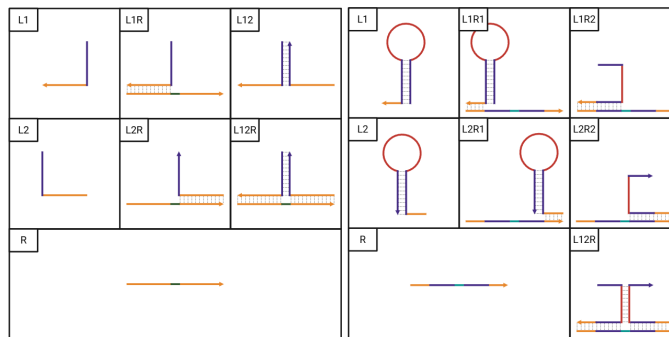
Разработка и исследование усовершенствованных систем регуляции экспрессии генов на основе олигонуклеотидных последовательностей, способных к кооперативным взаимодействиям, и тестирование таких систем экспериментальными методами.

## Задачи:

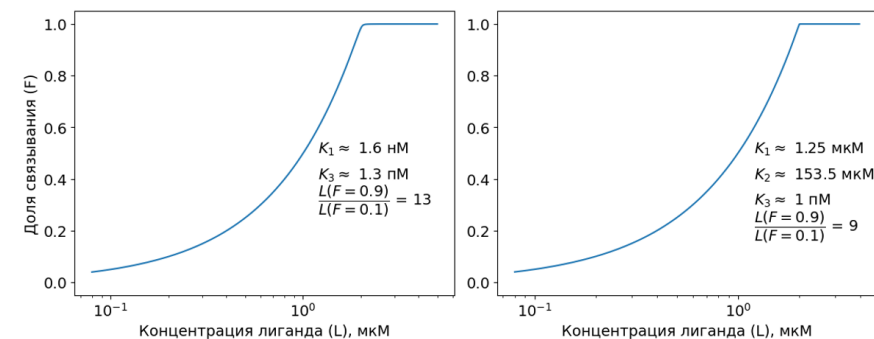
1. Предложить ряд молекулярных систем на основе олигонуклеотидов, при взаимодействии которых проявляются эффекты кооперативности, и провести теоретический анализ методами молекулярного моделирования и химической кинетики поведения данных систем;
2. На основе теоретического анализа разработать систему взаимодействующих олигонуклеотидов, проявляющих эффект кооперативности в заданных диапазонах концентраций и при заданных условиях;
3. Проверить способность спроектированных олигонуклеотидов *in vitro* к кооперативному взаимодействию.

# Общий план работы

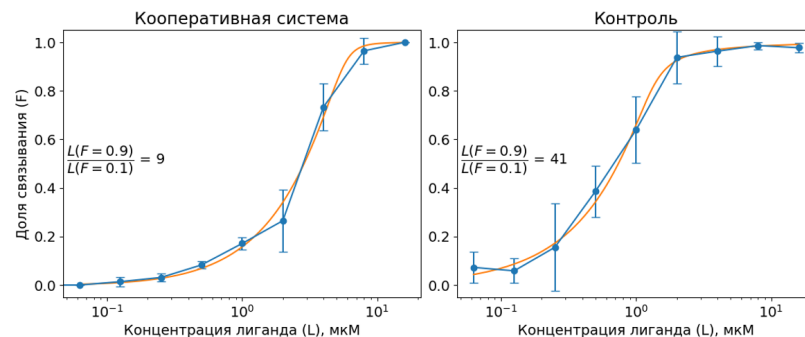
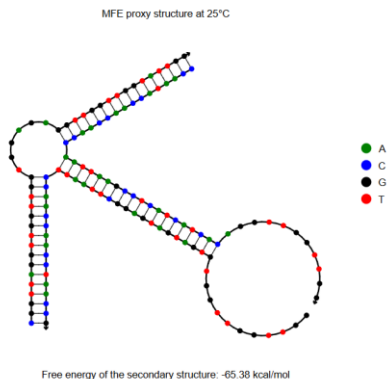
Системы олигонуклеотидов



Поиск наибольшей кооперативности



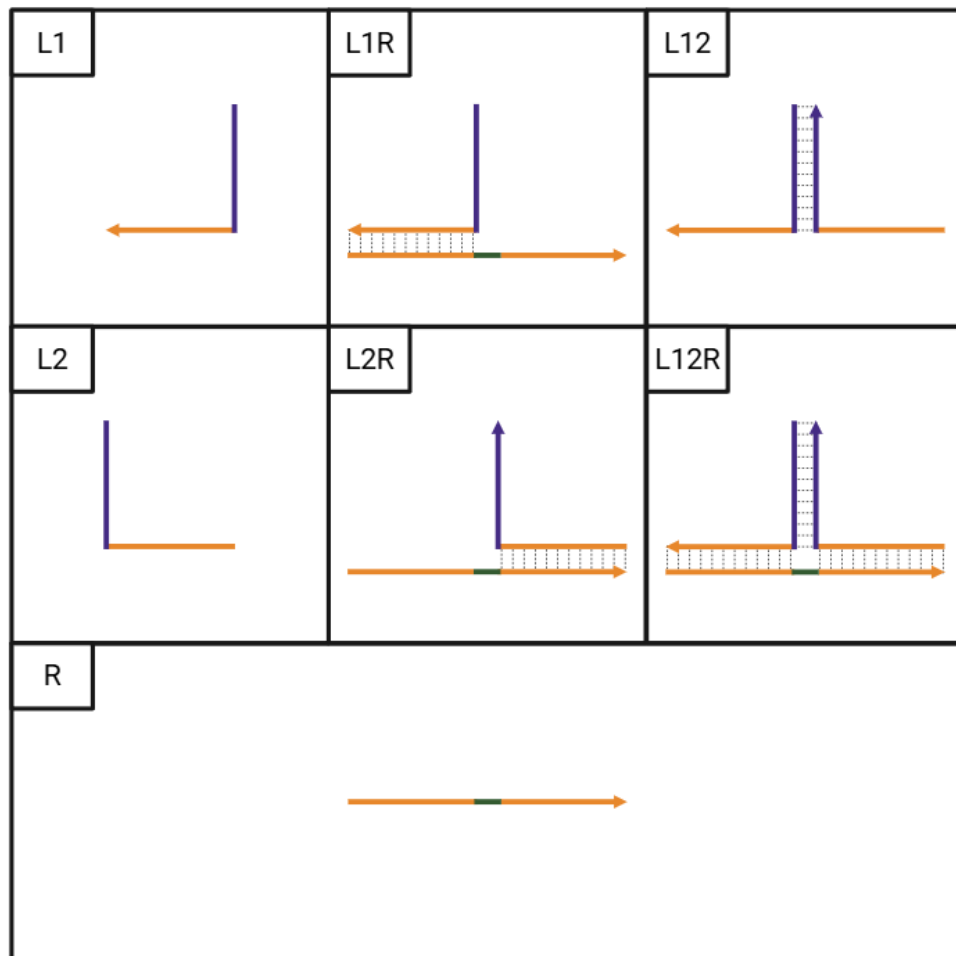
Дизайн олигонуклеотидов



Экспериментальное тестирование

# Анализ кинетики поведения систем олигонуклеотидов

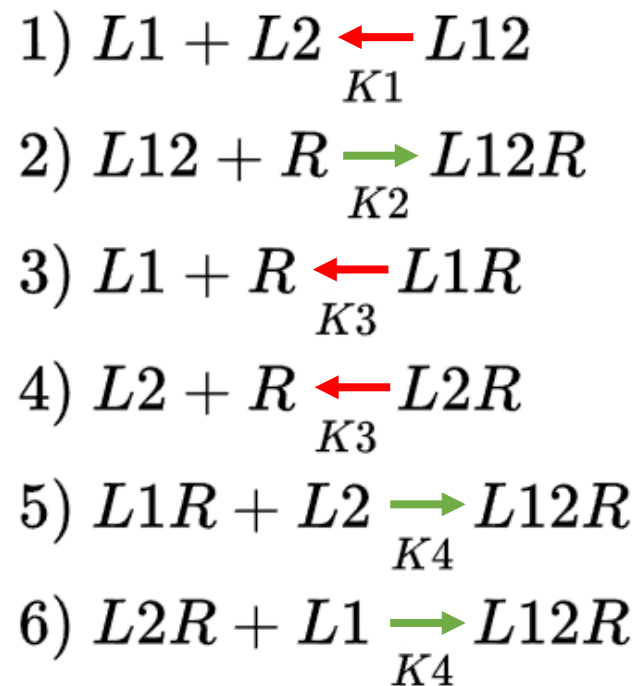
Олигонуклеотидные взаимодействия в системе



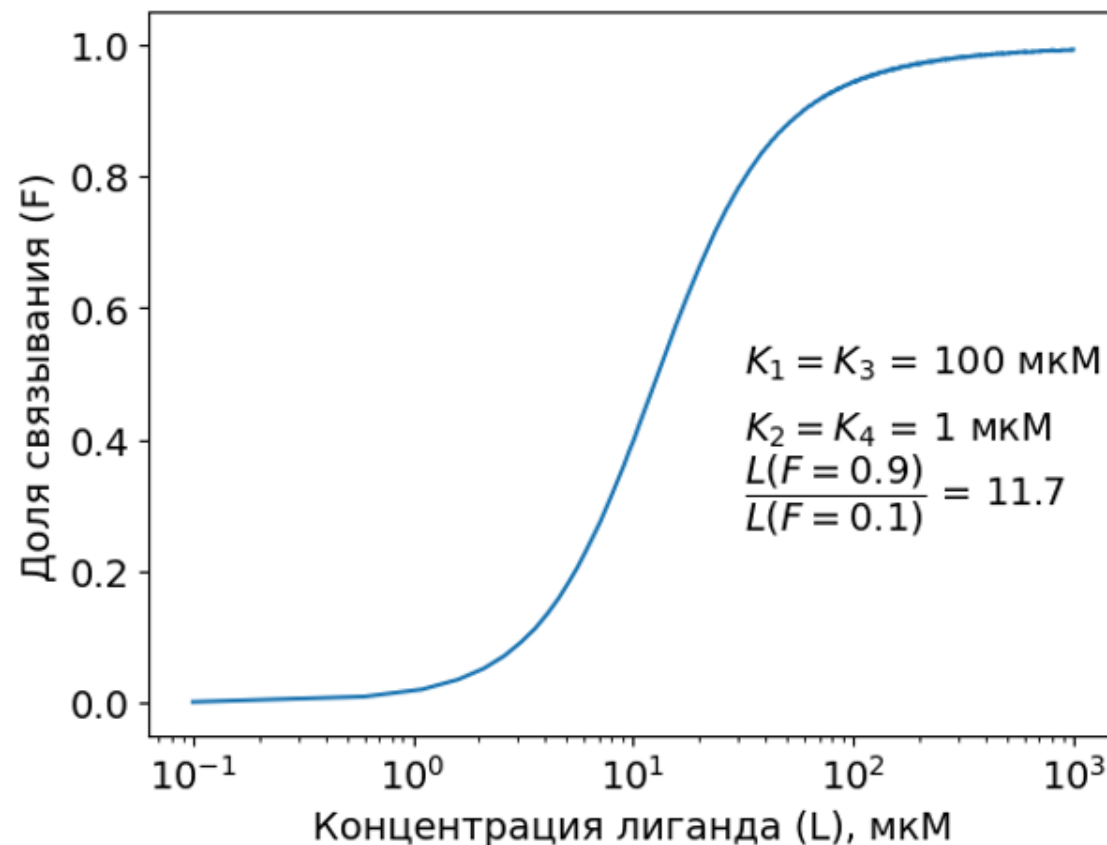
Уравнения, описывающие систему олигонуклеотидов

- 1)  $L1 + L2 \xrightleftharpoons{K1} L12$
- 2)  $L12 + R \xrightleftharpoons{K2} L12R$
- 3)  $L1 + R \xrightleftharpoons{K3} L1R$
- 4)  $L2 + R \xrightleftharpoons{K3} L2R$
- 5)  $L1R + L2 \xrightleftharpoons{K4} L12R$
- 6)  $L2R + L1 \xrightleftharpoons{K4} L12R$

# Эффект кооперативности в системе олигонуклеотидов

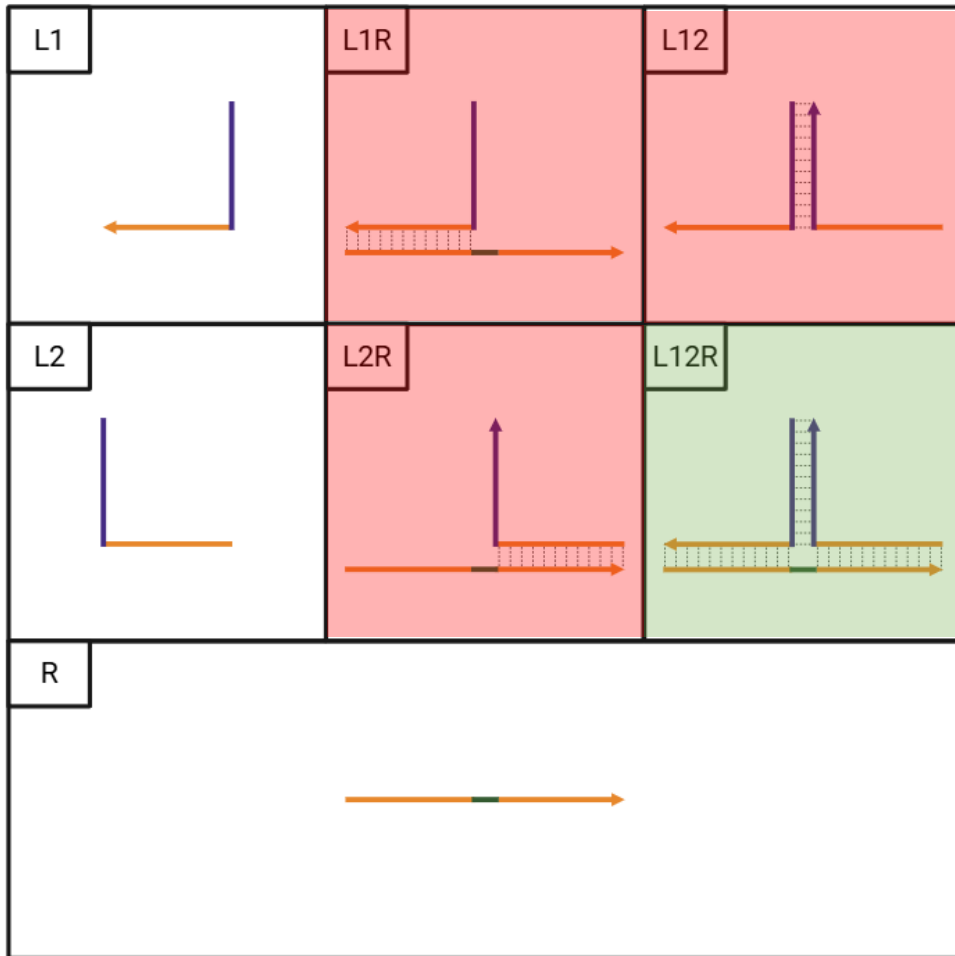


Кривая связывания R L1 и L2 для случая наибольшего эффекта кооперативности

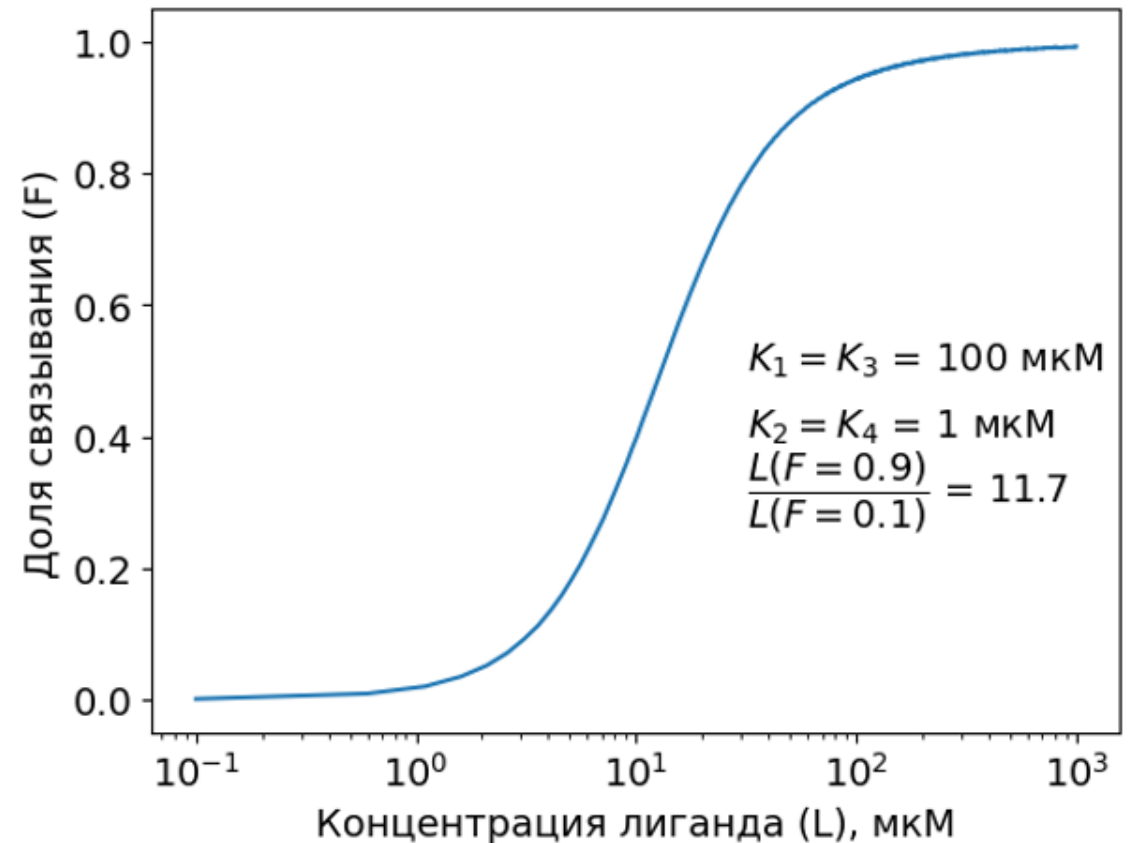




# Эффект кооперативности в системе олигонуклеотидов

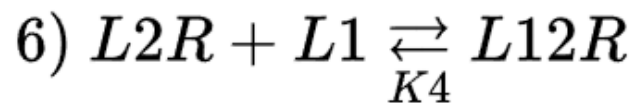
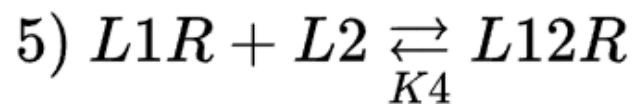
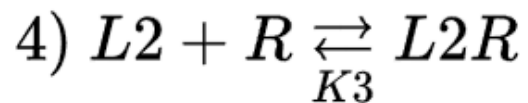
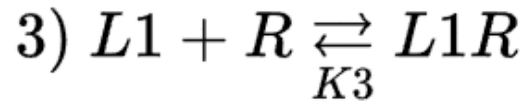
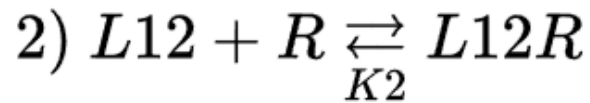
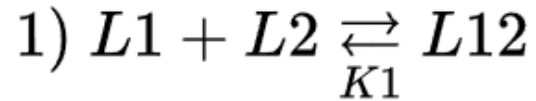


Кривая связывания R L1 и L2 для случая наибольшего эффекта кооперативности

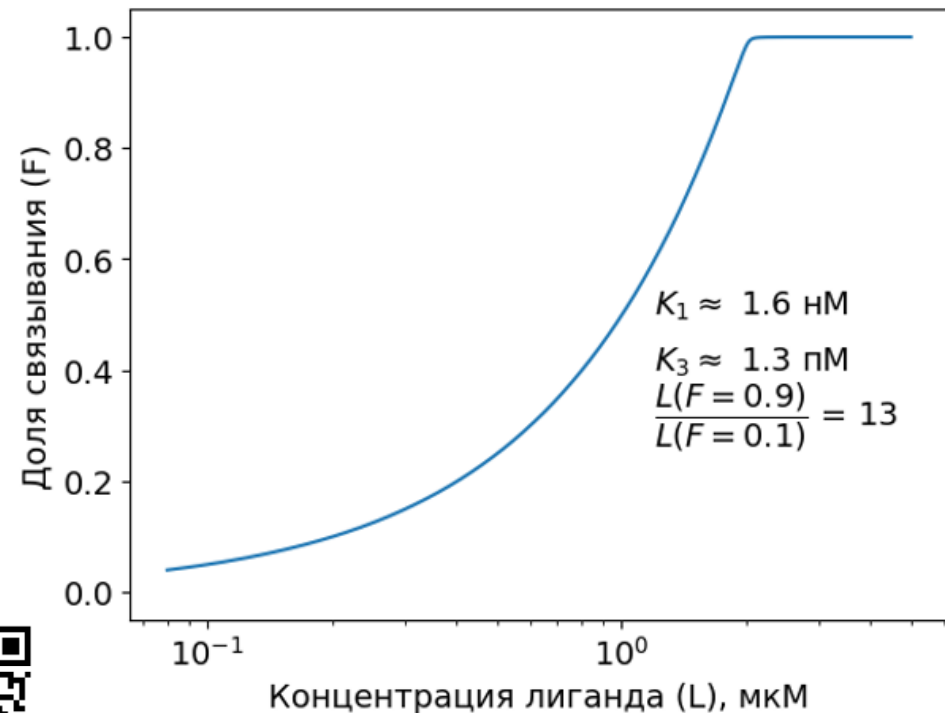


# Эффект кооперативности в системе олигонуклеотидов

Эффект кооперативности наблюдается при низких значениях  $K_1$  и  $K_3$ , причем  $K_1 > K_3$



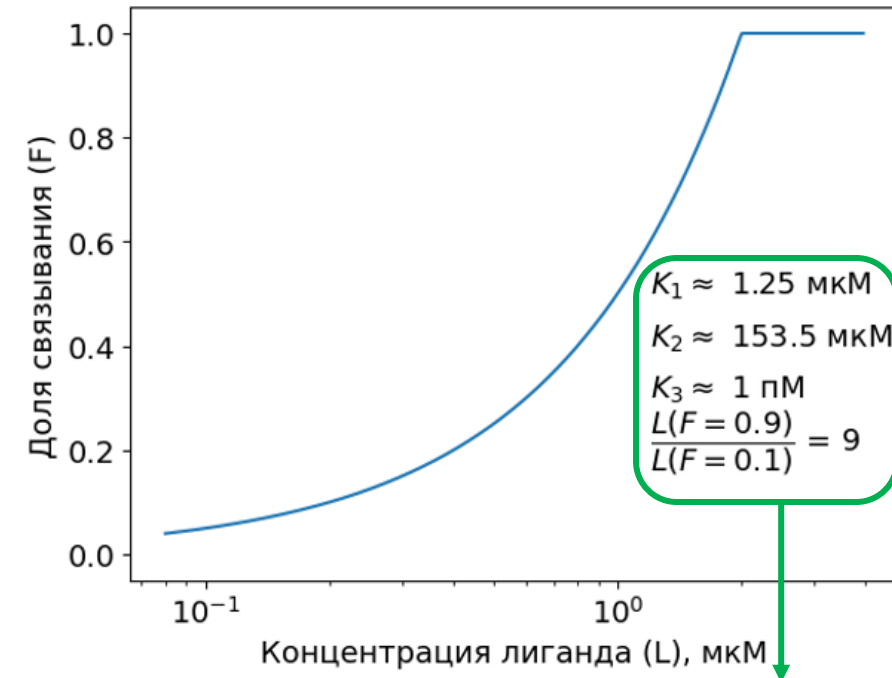
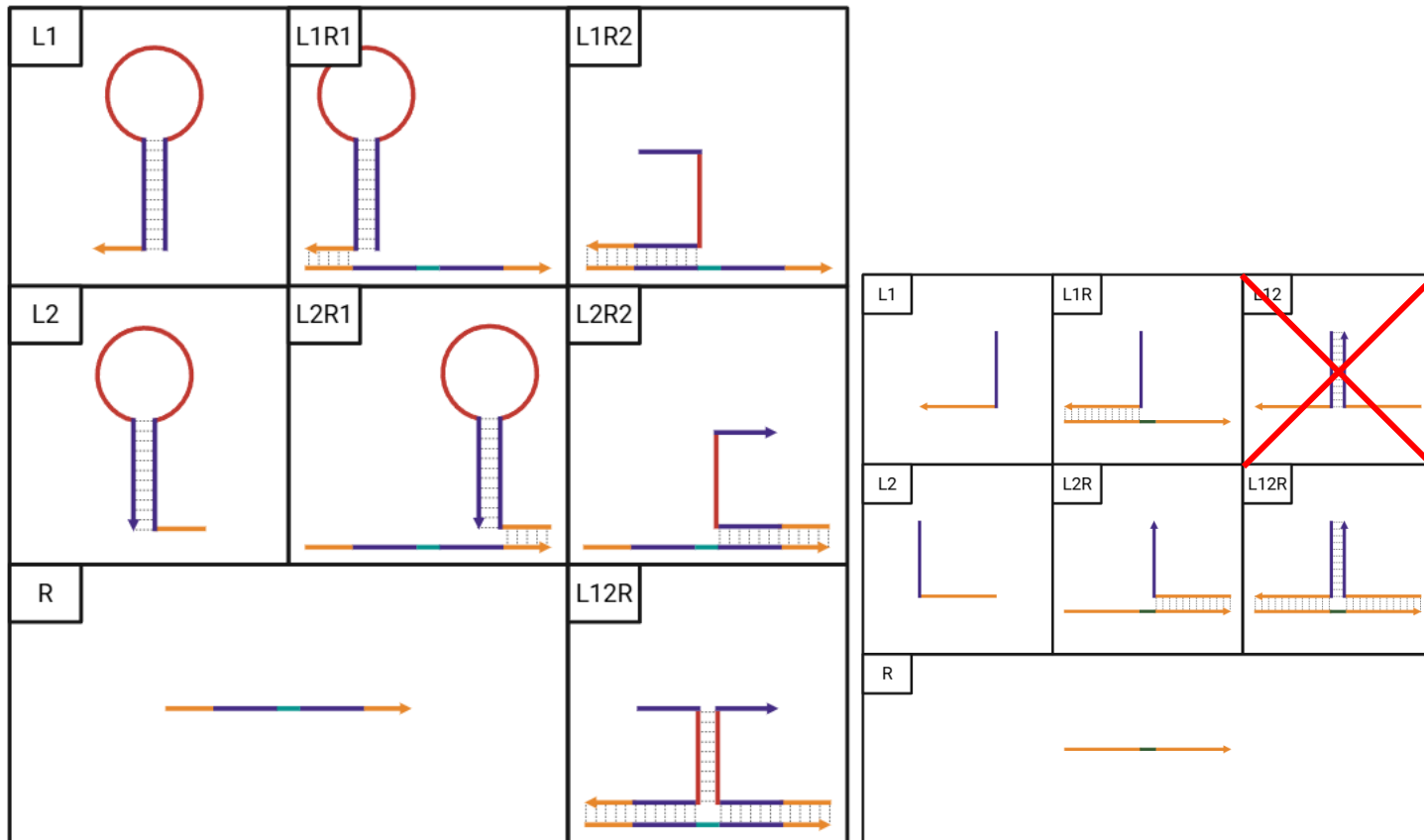
$$+ \begin{aligned} K_2 &= K_3^2 \\ K_4 &= K_1 * K_3 \end{aligned}$$



Реализация данной идеи: [Kandimalla, 1995](#)

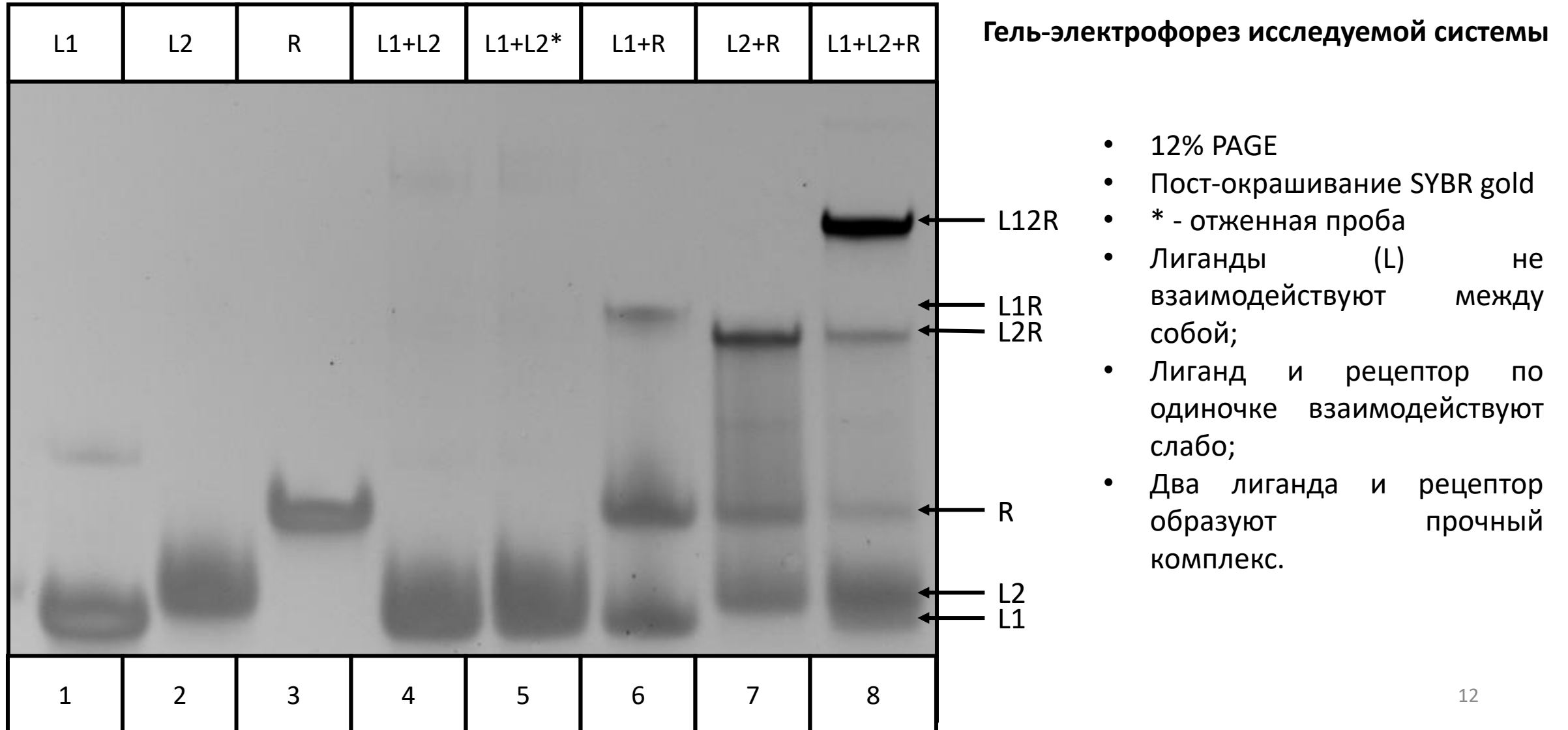
# Дизайн олигонуклеотидов с усиленным эффектом кооперативности

## Олигонуклеотидные взаимодействия в системе



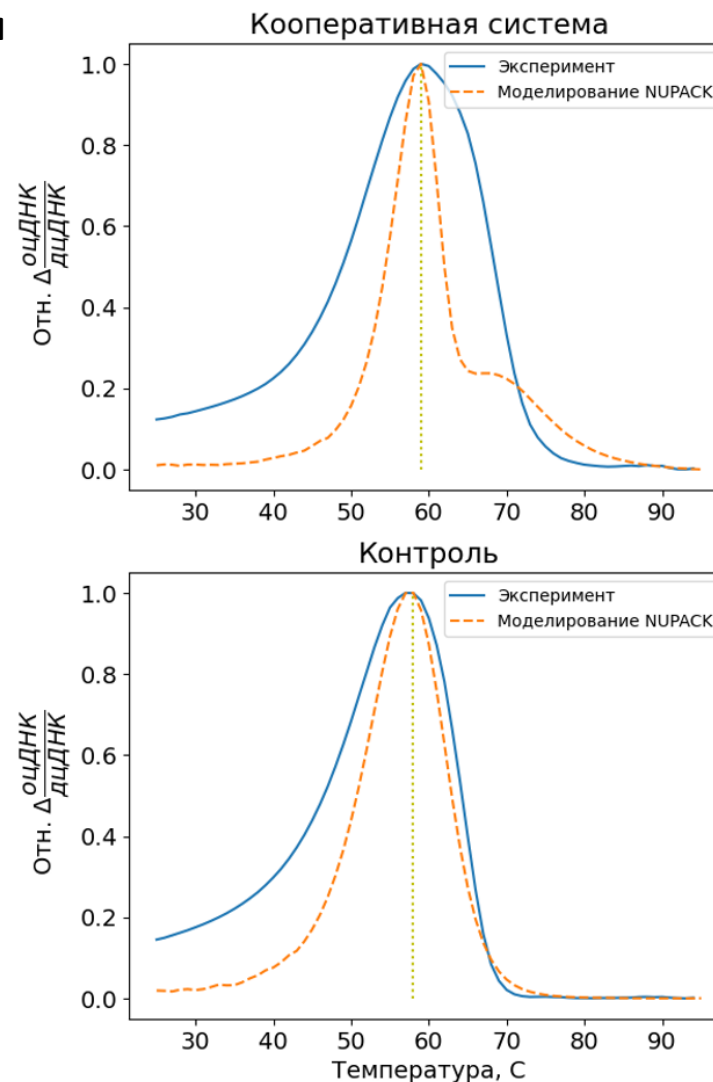
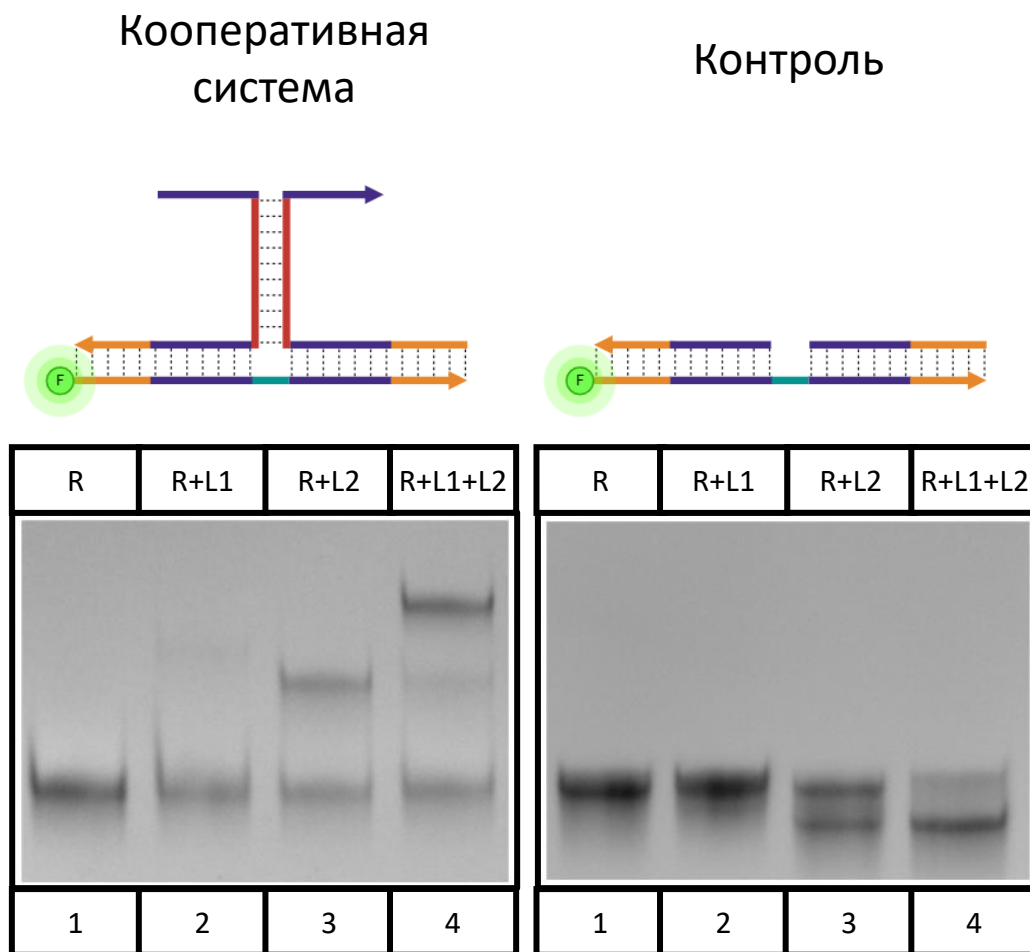
Параметры  
смоделированной  
системы  
олигонуклеотидов в  
NUPACK

# Анализ поведения системы олигонуклеотидов

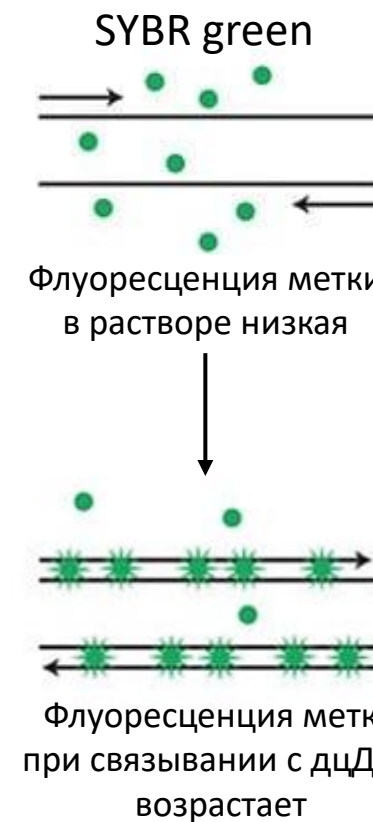


# Анализ поведения системы олигонуклеотидов

## Гель-электрофорез исследуемой системы и контроля

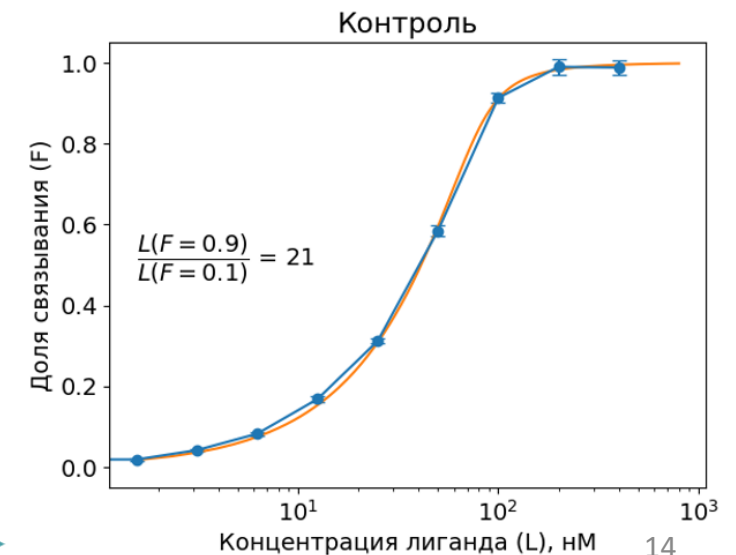
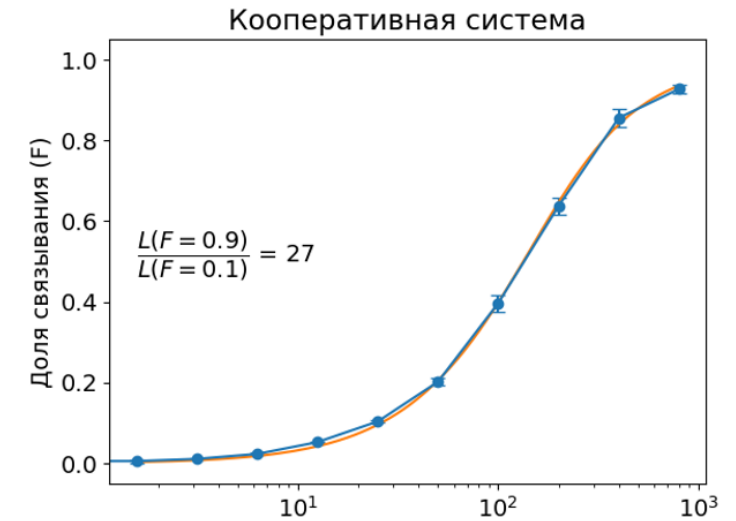
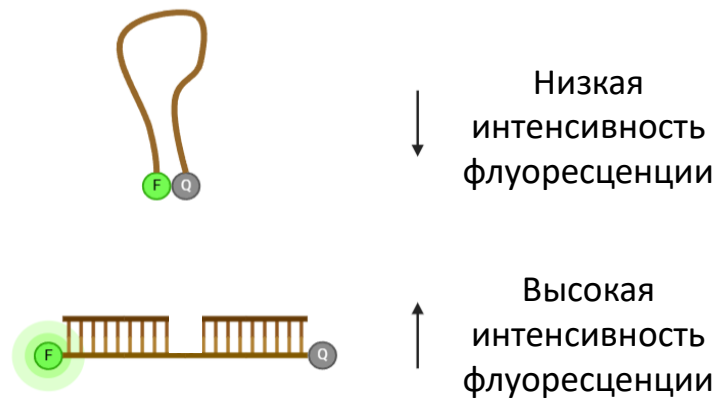


## Кривые плавления исследуемой системы и контроля

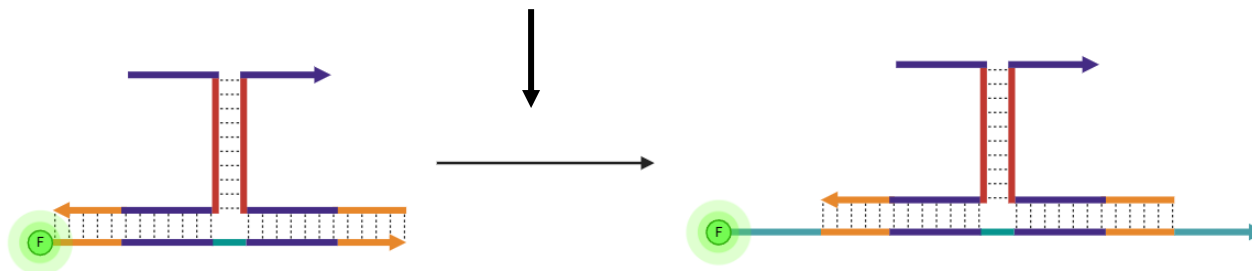


# Анализ кинетики связывания лиганда с рецептором

Экспериментальные кривые связывания исследуемой системы и контроля

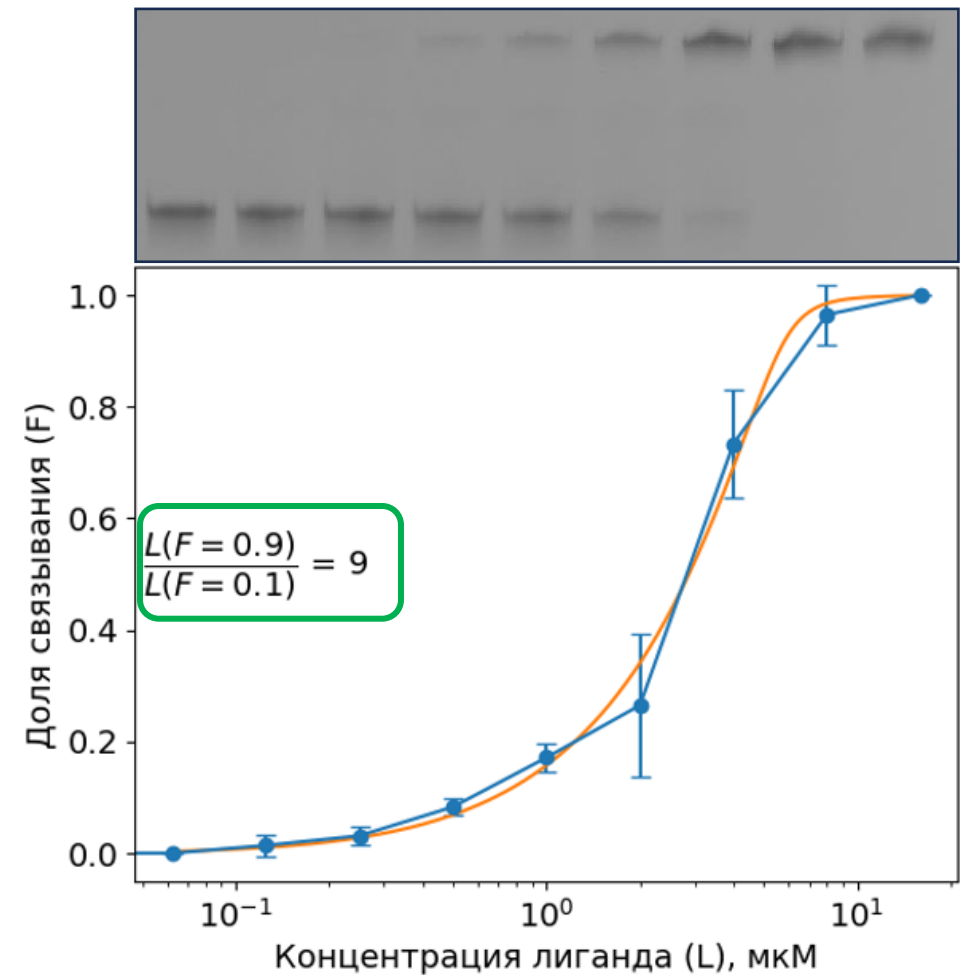


Кооперативный эффект тестируемой системы и контроля практически совпадают, что объясняется кооперативным раскручиванием смежных областей у коротких олигонуклеотидов при гибридизации

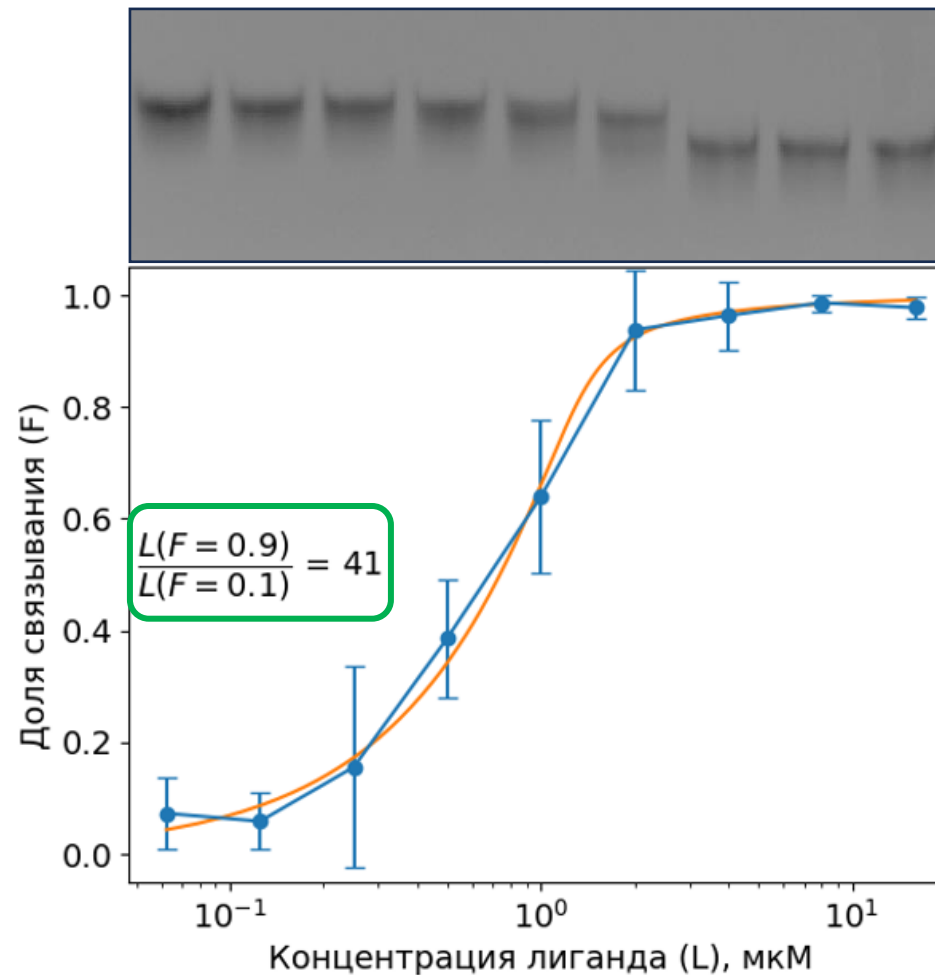


# Анализ кинетики связывания лиганда с рецептором

Кооперативная система



Контроль



Кооперативный эффект исследуемой системы значительно превосходит контрольный

# Выводы

- Теоретический анализ выявил ключевые параметры для кооперативного взаимодействия. Наибольший эффект достигается при слабом связывании отдельных лигандов (высокие  $K_1$  и  $K_3$ ) и сильном взаимодействии их комплексов с рецептором (низкие  $K_2$  и  $K_4$ ), что соответствует основным моделям кооперативности.
- Успешно разработана модифицированная система олигонуклеотидов со шпильчатой структурой лигандов. Такой дизайн позволил скрыть домены межлигандного взаимодействия и усилить кооперативный эффект, достигнув расчетного параметра кооперативности  $L_{0.9}/L_{0.1} = 9$ .
- Экспериментальная проверка продемонстрировала образование ожидаемых комплексов и проявление кооперативных эффектов. Основные результаты согласуются с теоретическими предсказаниями, демонстрируя работоспособность предложенного подхода.



# Благодарности

- Шайтану Алексею Константиновичу – за ценные идеи и концептуальную поддержку;
- Мамаевой Наиде Юсуповне – за советы при проведении экспериментов;
- Армееву Григорию Алексеевичу – за рекомендации в проведении теоретического анализа и при презентации данных;
- Кристовскому Николаю Всеволодовичу – за советы по презентации данных;
- Буглакову Александру Игоревичу – за конструктивные замечания и рекомендации.