

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биоинженерии

Кристовский Николай Всеволодович

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ОКРУЖЕНИЯ
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРСТЕРОВСКОГО РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА
ЭНЕРГИИ ПРИ ПОМОЩИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК

Выпускная квалификационная работа магистра

Научный руководитель
к.ф.-м. н. Армeeв Григорий Алексеевич

Москва - 2023 г.

Оглавление

Оглавление.....	1
Список сокращений.....	2
Введение.....	3
Цели и задачи.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1. Ферстеровский резонансный перенос энергии.....	6
1.2. Моделирование ФРПЭ.....	11
1.3. Введение флуоресцентных меток в последовательность ДНК.....	16
Глава 2. Материалы и методы.....	22
2.1 Создание молекулярных моделей флуоресцентных меток.....	22
2.2 Метод Молекулярной динамики.....	25
2.3 Параметризация меток.....	26
2.4 Подготовка системы ДНК-метка для вычислительного эксперимента.....	30
2.5 Проведение вычислительного эксперимента.....	31
2.6 Анализ траекторий.....	32
2.7 Молекулярное моделирование ФРПЭ.....	33
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	34
3.1 Моделирование динамики одиночных меток.....	34
3.2 Изучение вращательной диффузии.....	39
3.3 Моделирование динамики донорно-акцепторных пар.....	43
3.4 Молекулярное моделирование ФРПЭ.....	45
3.5 Сравнение методов молекулярной динамики и молекулярного моделирования.....	49
Заключение.....	51
Результаты и выводы.....	52
Список Литературы.....	53
Приложение.....	60

Список сокращений

ААЦ — азид-алкиновые циклоприсоединения

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК — рибонуклеиновая кислота

п.н. — пара нуклеотидов

ФРПЭ — Ферстеровский резонансный перенос энергии (forster resonance energy transfer (FRET))

Су3 — циановый 3

Су5 — циановый 5

GAFF — генерализованное силовое поле «Амбер» (general Amber force field)

МД — молекулярная динамика (molecular dynamics)

ММ — молекулярное моделирование (molecular dynamics)

Введение

Применение Ферстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ) в биологии резко возросло за последние двадцать лет. В поисковой системе PubMed количество публикаций с упоминанием ФРПЭ в качестве темы исследования выросло с 200 в 1988 году до более чем 1700 в 2018 году (Algar и др., 2019). Этот факт отражает как быстрое развитие, так и растущее разнообразие доступных методов на основе ФРПЭ. Движущей силой этого роста является тот факт, что ФРПЭ представляет собой простейшую и наиболее доступную форму оптических измерений со сверхвысоким разрешением, предоставляющую информацию о внутри- и межмолекулярных расстояниях в нанометровом масштабе (Algar и др., 2019). При работе с методами, основанными на Ферстеровском резонансном переносе энергии, работа ведется с парой флуорофоров (донорно-акцепторной парой). Для введения донорно-акцепторной пары в исследуемую систему используются молекулы «линкеры». От расстояния между флуорофорами зависит эффективность переноса энергии с донора на акцептор. Применение различных «линкеров» к одной донорно-акцепторной паре приводит к возможности расхождения данных для одной и той же исследуемой системы. В итоге, такие факторы как: структура исследуемого объекта, строение «линкеров», состав растворителя, концентрация ионов в растворителе могут привести к неправильной интерпретации полученных данных. В связи со всеми вышеперечисленными факторами присутствует необходимость в моделирование ФРПЭ влияние перечисленных факторов на значения эффективности ФРПЭ. Работы по моделированию ФРПЭ основываются на таких методах, как молекулярное моделирование и молекулярная динамика, с целью воссоздать подвижность флуорофоров в пространстве. Целью данных работ является создание алгоритмов, позволяющих достаточно точно предсказать экспериментальные значения эффективности ФРПЭ. Наибольшее внимание в контексте этих работ

уделяется таким параметрам, как химические и структурные особенности флуорофоров, подвижность флуорофоров, параметры системы, в которую были введены флуорофоры. Одной из проблем, стоящих перед экспериментатором, является получение параметров, необходимых для запуска молекулярной динамики. А конкретно, данных, описывающих механику движения атомов внутри флуорофоров и распределение парциальных зарядов в флуорофорах. Поскольку зачастую структура флуоресцентной метки не является простой и включает в себя ароматические связи, процесс получения корректных параметров для меток может быть затруднительным. В добавок, в зависимости от способа введения меток может отличаться их структура. В данной работе при помощи метода молекулярной динамики мы изучаем, как структурные особенности линкеров, параметры растворителя и значения ионной силы влияют на динамику флуоресцентных меток и теоретические значения эффективности ФРПЭ.

Цели и задачи

Целью работы является изучение влияния молекулярного окружения на эффективности ФРПЭ с использованием метода молекулярной динамики.

Для изучения молекулярного окружения на эффективность ФРПЭ были поставлены следующие задачи:

1. Составить протокол для генерации файлов, которые описывают механику движения атомов внутри молекулы и распределение парциальных зарядов. (необходим для метода МД)
2. Рассчитать молекулярную динамику флуорофоров в комплексе с В ДНК и использовать полученные траектории для расчета молекулярного моделирования
3. Оценить влияние факторов окружения (концентрация ионов, тип воды) на динамику флуоресцентных меток
4. Оценить время вращательной диффузии меток
5. Рассчитать теоретические значения эффективности переноса энергии

Объем и структура работы.

Работа состоит из введения, 3 глав, заключения и 5 приложений. Полный объём работы составляет 65 страниц, включая 21 рисунков и 1 таблицы. Список литературы содержит 63 наименований.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Ферстеровский резонансный перенос энергии

Ферстеровский резонансный перенос энергии (Frster resonance energy transfer, ФРПЭ) является важным методом для изучения структур, пространственно-временной динамики и совместной локализации биомолекулярных систем (Förster, 1948). ФРПЭ представляет собой безызлучательный перенос энергии от электронно-возбужденного «донорного» флуорофора к подходящему «акцепторному» флуорофору по средствам диполь-дипольных взаимодействий. Критерии, которым должны удовлетворять флуорофоры, чтобы подходить для экспериментов с ФРПЭ: перекрывание спектра флуоресценции донора со спектром поглощения света акцептора, спектр поглощения донора не должен полностью перекрываться со спектром поглощения акцептора. Такие пары флуорофоров называются донорно-акцепторными парами.

Вероятность передачи энергии от донора к акцептору (известная как эффективность ФРПЭ) зависит, в том числе от расстояния между флуорофорами (формула 1).

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

Где Е — эффективность ФРПЭ, R_{DA} — расстояние между донором и акцептором при измерении, R_0 — Ферстеровский радиус, расстояние между донором и акцептором, на котором перенос энергии происходит в 50% случаях. Скорость переноса возбужденного состояния с донора на акцептор описывается формулой:

$$k_{\text{ФРПЭ}} = \frac{1}{\tau_{D(0)}} \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right) \quad (2)$$

Где $\tau_{D(0)}$ — время жизни возбужденного состояния донора в отсутствии акцептора, типовое время составляет порядка наносекунд (Huff и др., 2021).

Тогда эффективность ФРПЭ можно записать как:

$$E = \frac{k_{\text{ФРПЭ}}}{k_0 + k_{\text{ФРПЭ}}} = \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_{D(0)}} \quad (3)$$

Где $k_0 = 1/\tau_{D(0)}$ — константа скорости релаксации возбужденного состояния донора в отсутствии акцептора, $\tau_{D(0)}$ — время жизни возбужденного состояния донора в присутствии акцептора.

Ферстеровский радиус рассчитывается по следующей формуле (Forster, 1946):

$$R_0^6 = \frac{0,529 \kappa^2 \Phi_D J(\lambda)}{N n^4} \quad (4)$$

Где κ^2 — ориентационный фактор, Φ_D — квантовый выход донора, n — показатель преломления среды, $J(\lambda)$ — интеграл спектрального перекрывания, N — число Авогадро.

Единственная величина, которую нельзя измерить напрямую — ориентационный фактор. Его значение может варьироваться от 0 до 4 и рассчитываются по формуле (5) и в случае свободной диффузии флуорофоров равно 2/3:

$$\kappa^2 = (cos\theta_T - 3cos\theta_D cos\theta_A)^2 \quad (5)$$

где θ_T — угол, образованный переходными моментами донора и акцептора, θ_D и θ_A — углы между каждым переходным моментом и вектором, соединяющим среднюю точку каждого диполя (рис.1).

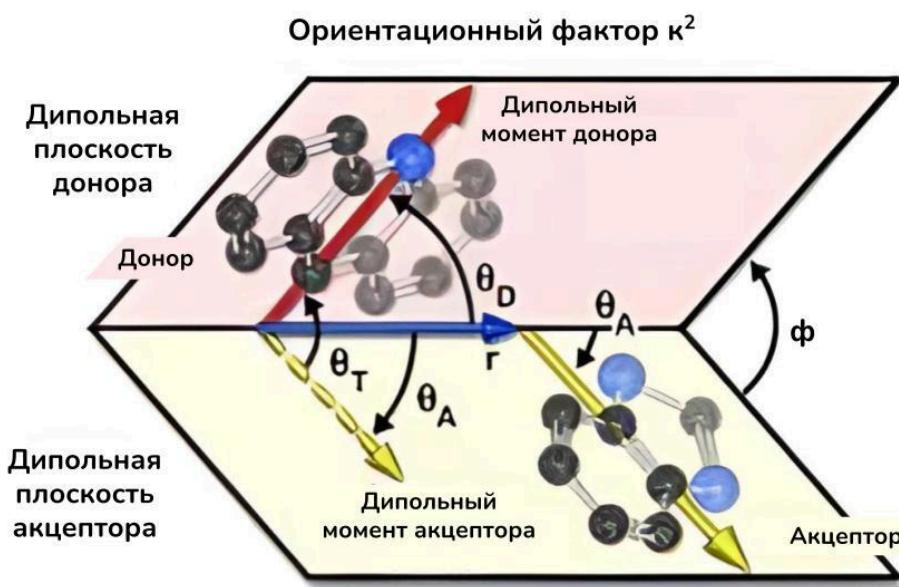


Рисунок 1. Схема взаимной ориентации флуорофора донора и акцептора.
Адаптировано из: (Saini, Singh, Bagchi, 2006)

Существуют методы, основанные на квантовой химии и квантовой механике, позволяющие оценить значение ориентационного фактора, однако такие расчеты крайне сложны, и их результатом являются полученные значения только для одной пары флуорофоров (Khrenova и др., 2015). Помимо этого, есть методы, основанные на изучении анизотропии флуорофоров.

В 1995 году Cristobal G. dos Remedios, Pierre D.J. Moens описывали числовое значение k^2 как «в лучшем случае неприятность, а в худшем — непреодолимая проблема» (Remedios dos, Moens, 1995). Robert E. Dale и Josef Eisinger были одними из первых, кто критически исследовал приближение $\langle k^2 \rangle = \frac{2}{3}$ и показали, что даже если точное значение $\langle k^2 \rangle$ не может быть определено, это не должно создавать непреодолимой проблемы. Они разработали теоретическую модель и экспериментальную процедуру для определения пределов $\langle k^2 \rangle$ от анизотропии излучения донора и акцептора (Dale, Eisinger, 1974; Dale, Eisinger, 1976).

Значения $\langle k^2 \rangle_{\min}$ и $\langle k^2 \rangle_{\max}$ позволяют вычислить возможный диапазон R и, таким

образом, дают оценку ошибки, вносимой предположением $\langle \kappa^2 \rangle = 2/3$. В статье 2006 г. Ben Corry и др. описали метод, который использует интенсивность флуоресценции из изображений полученных при помощи конфокального микроскопа для определения диапазона значений фактора ориентации (Corry и др., 2006). В данном методе флуорофоры были связанных с мембранами липосом, таким образом. Ivanov et al. описали метод использования измерений анизотропии излучения для оценки ошибки в измерениях расстояния ФРПЭ из-за неизвестного значения $\langle \kappa^2 \rangle$ (Ivanov, Li, Mizuuchi, 2009).

При введении флуорофоров в заранее выбранные позиции внутри исследуемой системы, эффективность ФРПЭ можно использовать для определения близости зондов и, как меру межмолекулярных и внутримолекулярных расстояний в диапазоне 10-100 Å (1-10 нм.)(Deplazes, Jayatilaka, Corry, 2011). Данный метод применяется как для измерений межмолекулярных расстояний, так и для измерения внутримолекулярных расстояний (Kalinin и др., 2012; König и др., 2013; Takanishi и др., 2006).

При теоретических расчетах ФРПЭ важно знать позиции введения флуоресцентных меток в исследуемую систему, для расчета предполагаемой эффективности ФРПЭ. Однако, помимо точек прикрепления флуорофоров, необходимо учитывать параметры «линкеров» — химических соединений, посредством которых флуорофоры прикреплены к исследуемой молекуле. Наличие линкеров приводит к образованию доступного объема, в котором могут находиться флуорофоры. В итоге положение флуорофоров в системе соответствует не конкретной точке в пространстве, а некому облаку, где флуорофор может находиться (Dolghih, Roitberg, Krause, 2007; Hoefling и др., 2011; Sindbert и др., 2011a). Для более точного понимания процесса ФРПЭ и использования его для количественных измерений расстояний проводятся исследования по моделированию молекулярной динамики ФРПЭ.

1.2. Моделирование ФРПЭ

В другом виде формулу 1 можно представить как:

$$E_{\text{изо.}} = \frac{R_0^6}{R_{DA}^6 + R_0^6} \quad (6)$$

Для дальнейшего обсуждения такой вид является более удобным. При моделировании ФРПЭ данный вид расчета эффективности ФРПЭ называют изотропным. Поскольку подразумевается что значение ориентационного фактора равняется $2/3$, вне зависимости от параметров моделируемой системы, параметров линкеров и самих флуорофоров.

Одним из методов позволяющих теоретически оценивать значения ориентационного фактора является метод молекулярной динамики. Где исходя из заданных параметров моделируемой системы рассчитываются траектории движения молекул (Deplazes, Jayatilaka, Corry, 2011). Исходя из траекторий взаимных ориентаций донорно-акцепторных пар можно рассчитать теоретические значения ориентационного фактора. Формулу (7) используется для оценки полученных значений ориентационного фактора.

$$E = \frac{\kappa^2 \cdot 3/2 \cdot R_0^6}{R_{DA}^6 + \kappa^2 \cdot 3/2 \cdot R_0^6} \quad (7)$$

Где эффективность ФРПЭ для одной донор-акцепторной пары зависит от: расстояния между флуорофорами R_{DA} , фактора ориентации (κ^2). Ферстеровский радиус (R_0) домножается на дробь $3/2$ чтобы удалить из R_0 стандартное значения фактора ориентации (равное $2/3$).

Среднее значение κ^2 равное $2/3$, допустимо использовать при условии отсутствия пространственных ограничений для вращательной диффузии флуорофоров, при условии, что время вращательной диффузии флуорофоров много меньше времен жизни возбужденных состояний флуорофоров. Таким

образом флуорофоры могут посетить любую взаимную ориентацию за время жизни возбужденного состояния.

Поскольку невозможно ценить значения k^2 напрямую, одним из методов оценки значений фактора ориентации, а также оценки его вклада в значение эффективности ФРПЭ является метод молекулярной динамики. В разделе 1.2, формулы 6, 8, 9 упоминались работы с использованием метода молекулярной динамики для моделирования траекторий флуорофов, как свободно диффундирующих в растворе, так и прикрепленных к исследуемой системе (Barth и др., 2022; Phillips и др., 2005; Saini, Singh, Bagchi, 2006). При использовании метода молекулярной динамики для расчета эффективности ФРПЭ есть возможность рассчитывать расстояние между донором и акцептором и фактор ориентации на каждом шагу интегрирования. Как результат, получить диапазон значений эффективности ФРПЭ для каждого кадра траекторий, как с моментальным значением ориентационного фактора (k^2) так и с усредненным по траектории ($\langle k^2 \rangle$).

Исходя из отношения константы скорости переноса возбужденного состояния с донора на акцептор ($k_{\text{ФРПЭ}}(2)$) к константе скорости скорости диффузии флуорофоров (k_d) и константе скорости флуктуации ориентации с взаимное время корреляции вращения $k_R = 1/\rho$ принято выведено три режима расчета значений эффективности ФРПЭ (Woźniak и др., 2008).

Если $k_R \gg k_{\text{ФРПЭ}} \gg k_d$ для расчета эффективности ФРПЭ используется формула расчета $E_{\text{изо.}}$ (6).

В случае если $k_R, k_d \gg k_{\text{ФРПЭ}}$ используют режим динамического расчета эффективности ФРПЭ по формуле (8).

$$E_{\text{дин.}} = \frac{\langle \kappa^2 \rangle \cdot {}^3/{}_2 \bullet R_0^6}{\langle \kappa^2 \rangle \cdot {}^3/{}_2 \bullet R_0^6 + R_{DA}^6} \quad (8)$$

Где значение ориентационного фактора является средним арифметическим из всего диапазона значений принимаемых метками за время моделирования системы.

Данную формулу уместно использовать для расчета эффективности ФРПЭ при условии, если вращательная диффузия флуорофора много больше константы скорости переноса энергии (скорости сбрасывания возбужденного состояния с флуорофора донора). Времени нахождения флуорофора в возбужденном состоянии. Также подразумевается, что κ^2 и R независимые переменные, т.е. метки непосредственно не взаимодействуют друг с другом и не соединены жесткими линкерами

В случае если $k_R, k_d \ll k_{\text{ФРПЭ}}$ используют режим статического расчета в моделировании ФРПЭ называют расчет эффективности ФРПЭ по формуле (9).

$$E_{\text{стат.}} = \frac{\kappa^2 \cdot {}^3/{}_2 \bullet R_0^6}{\kappa^2 \cdot {}^3/{}_2 \bullet R_0^6 + R_{DA}^6} \quad (9)$$

Где ориентационный фактор принимает мгновенное значение, рассчитанное из каждого кадра траектории молекулярной динамики.

Данная формула подразумевает, что константа скорости вращательной диффузии много меньше константы скорости переноса энергии. Необходимо учитывать, чтобы флуорофоры непосредственно не взаимодействовали друг с другом, и для их присоединения к изучаемой молекуле не использовались

жесткие линкеры, иначе возможно появление зависимости между κ^2 и R_{DA} . При динамическом режиме усреднения неявно предполагается, что κ^2 и R_{DA} являются независимыми переменными.

Таким образом $\langle \kappa^2 \rangle \cdot \langle R_{DA} \rangle = \langle \kappa^2 R_{DA} \rangle$. Если же κ^2 и R коррелируют друг с другом, то для каждого $\langle \kappa^2 \rangle$ необходимо отдельное распределение R_{DA} . В итоге одно из предположений используемых в моделирование заключается в том, что корреляции не существует.

В качестве примера моделирования донорно-акцепторной пары с целью расчета ФРПЭ в работе Evelyne Deplazes, Dylan Jayatilaka и Ben Corry от 2011 г. в качестве донорно-акцепторной пары использовались 8 молекул Alexafluor488 (AF488, донор) и 8 молекул Alexafluor 568 (AF568, акцептор) в кубическом боксе с длинами сторон 200 Å, что соответствует общей концентрации красителя 3,32 mM (Deplazes, Jayatilaka, Corry, 2011). Систему сольватировали водой TIP3, а нейтральность сохраняли добавлением ионов натрия и хлорида, доводя общее количество атомов до 781 533. Такая большая система использовалась, чтобы избежать зависимости результатов от периодического размера ячейки. Моделирование проводилось с помощью пакета программ NAMD с использованием ранее полученных структур и параметров для красителей и силового поля всех атомов CHARMM27 (Corry, Jayatilaka, 2008; Phillips и др., 2005). Для воды и ионов длины связей с атомами водорода оставались фиксированными, так как использовался шаг интегрирования 2 фс. Электростатические взаимодействия были рассчитаны с использованием схемы частиц-сеток Эвальда, а взаимодействия Леннарда-Джонса были рассчитаны с отсечкой 1,2 нм. Динамика Ланжевена использовалась для управления температурой с коэффициентом затухания 5 пс⁻¹ и применялась ко всем атомам, кроме водорода. Моделирование проводилось при постоянной температуре (298 К) и давлении (1 атм) с периодическими граничными условиями в течение 30 нс.

За направление векторов переходных дипольных моментов в молекулах доноров и акцепторов принималась ось вдоль ароматических колец в флуорофорах. Расстояние между донором и акцептором рассчитывалось как между центрами флуорофоров, в виде атома кислорода (Рис. 1).

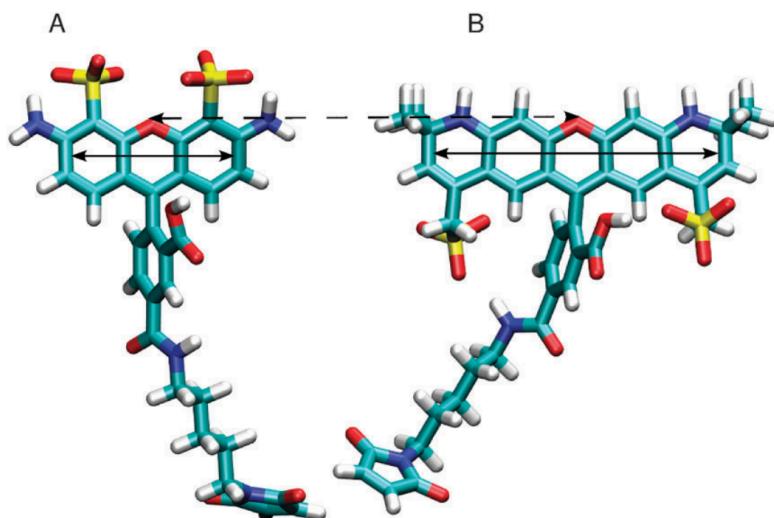


Рисунок 1. Где под буквой А — флуорофор донор Alexafluor488, Под буквой Б — флуорофор акцептор Alexafluor 568. Стрелками с непрерывной линией указаны направления векторов дипольных моментов, пунктиром указаны атомы кислорода, расстояние между которыми принималось за R_{DA} источник (Deplazes, Jayatilaka, Corry, 2011).

Для анализа κ^2 использовались только 8 доноров и 8 акцепторов (64 пары DA) в расчетной ячейке. Также эти 64 пары DA использовались для оценки диффузии, полученные значения сравнивались с ожидаемым распределением. Подразумевалось, что моделирование системы начиналось со случайных значений взаимных ориентаций флуорофоров. Затухание анизотропии флуоресценции, было рассчитано путем сопоставления собственной ориентации флуорофора относительно следующего кадра траектории, вдоль всей рассчитанной траектории. Время корреляции вращения (τ_0) определялось путем сопоставления конечного $r(t)$ к функции экспоненты (10).

$$r(t) = r_0 e^{\frac{t}{\tau_\theta}} \quad (10)$$

где r_0 — анизотропия красителя, наблюдаемая в отсутствие других деполяризующих процессов, таких как вращательная диффузия или перенос энергии.

Фактор ориентации κ^2 рассчитывался для каждой пары DA на каждом кадре с использованием формулы 3.

В более поздней статье Seidel и др. моделировали эффективность ФРПЭ для систем флуорофоров в комплексе со статичными моделями ДНК (Woźniak и др., 2008). В качестве донорно-акцепторной пары были выбраны флуорофоры Alexa Fluor 488 и Cy5. Использовались три метода расчета эффективности ФРПЭ указанных выше (6, 8, 9) Ими было показано влияние последовательности моделей A, B и Z ДНК на изгиб нуклеиновой цепочки. Стоит отметить, что в данной работе модели ДНК в ходе моделирования оставались статичными, а также не учитывали электростатические взаимодействия флуорофоров с ДНК.

1.3. Введение флуоресцентных меток в последовательность ДНК

Данная работа посвящена исследованию влияния молекулярного окружения флуоресцентных меток на Ферстеровский резонансный перенос энергии. В нашей работе флуоресцентные метки вводились в последовательность нуклеиновых кислот. Для прикрепления флуоресцентной метки внутрь последовательности ДНК используются линкеры связанные с азотистым основанием. Для прикрепления флуоресцентной метки на концевые участки ДНК (3'-5') используются линкеры связанные с фосфатной группой. Ниже подробно рассматриваются способы связывания линкерной части флуорофора, как с азотистым основанием, так и с фосфатной группой.

Чтобы постсинтетически добавить флуоресцентную метку к 5'-концу или 3'-концу олигонуклеотида, амино (-NH₂) или тиольную (-SH) группу добавляют через алифатический углеродный линкер, который связан с концевой фосфатной группой. Затем флуорофоры, производные сукцинимидилового эфира, изотиоцианата или сульфонилхлорида, могут быть ковалентно связаны с нуклеотидами с аминофункциональными группами. Флуорофоры, дериватизированные малеимидом или йодацетамидом, могут быть ковалентно связаны с нуклеотидами с тиоловыми группами. Протоколы маркировки были опубликованы ранее и поставляются вместе с красителем от производителя (Rueda, Walter, 2006; Walter, 2002; Zhao, Rueda, 2009). Реакции мечения обычно можно проводить при комнатной температуре в мягких условиях (Wood, Rueda, 2013).

1.3.1 Клик-химия

В 1999 году К. Б. Шарплесс использовал термин «click chemistry» (клик-химия) для определения набора реакций, которые являются широкими по объему, с высоким выходом, стереоспецифичны и приводят к небольшому количеству побочных продуктов или вообще без них (El-Sagheer, Brown, 2010; Kolb, Finn, Sharpless, 2001). Название олицетворяет химические превращения, которые просты в осуществлении, включают легкодоступные исходные реагенты, совместимы с водной средой или без растворителя и требуют простого разделения продуктов (например, хроматографические методы).

Клик-химия чрезвычайно мощный метод быстрого и эффективного ковалентного сопряжения молекулярных объектов. Его широкий охват положительно повлиял на многие научные дисциплины, а его применение в области нуклеиновых кислот позволило исследователям создать широкий спектр инструментов для применения в биологии, биохимии и биотехнологии. Азид-алкиновые циклоприсоединения (ААЦ) по-прежнему являются ведущей технологией среди клик-реакций из-за легкой модификации и включения

азидных и алкиновых групп в биологические каркасы (Рис. 2). Применение химии AAC к нуклеиновым кислотам позволяет эффективно и экономично маркировать, лигировать и циклизировать олигонуклеотиды по сравнению с ранее использовавшимися химическими и ферментативными методами.

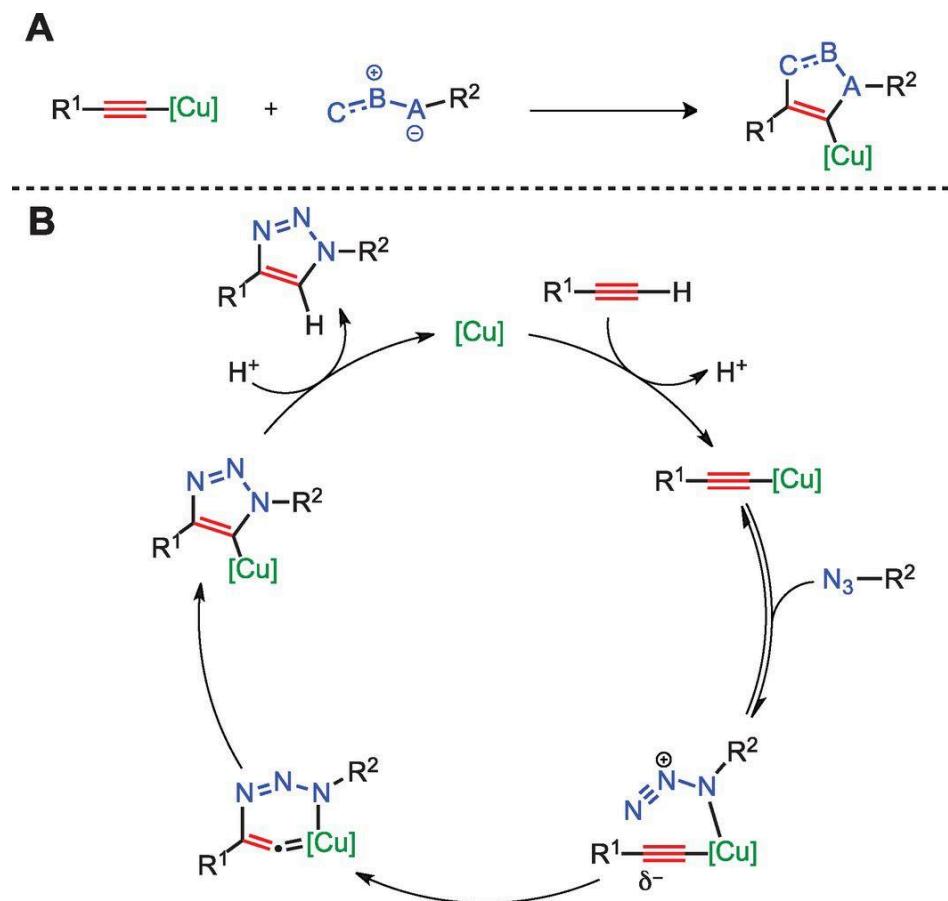


Рисунок 2. А — реакция азид-алкинового циклоприсоединения, В — механизм реакции, (El-Sagheer, Brown, 2010).

Особенность реакций клик-химии: азиды и алкины могут быть присоединены к нуклеиновым кислотам, при этом не сильно влияя на их биофизические свойства; азиды и неактивированные алкины почти полностью не реагируют с функциональными группами, обычно встречающимися в природных молекулах; они реагируют только друг с другом; триазол чрезвычайно стабилен и не токсичен (El-Sagheer, Brown, 2010).

1.3.2 Реакция Хека

Реакция Хека представляет собой химическую реакцию ненасыщенного галогенида с алкеном в присутствии основания и палладиевого катализатора с образованием замещенного алкена. Хек был удостоен Нобелевской премии по химии в 2010 году, которую он разделил с Эй-ити Негиши и Акирой Судзуки., за открытие и разработку этой реакции. Эта реакция была первым примером реакции образования углерод-углеродной связи, которая следовала за катализитическим циклом Pd (0) / Pd (II), тем же катализитическим циклом, который наблюдается в других реакциях кросс-сочетания, катализируемых Pd (0)(Beletskaya, Cheprakov, 2000). В данный момент существует множество протоколов проведения реакции Хека, где в качестве растворителя выступает как вода, так и раствор CH₃CN/H₂O (Рис. Н.).

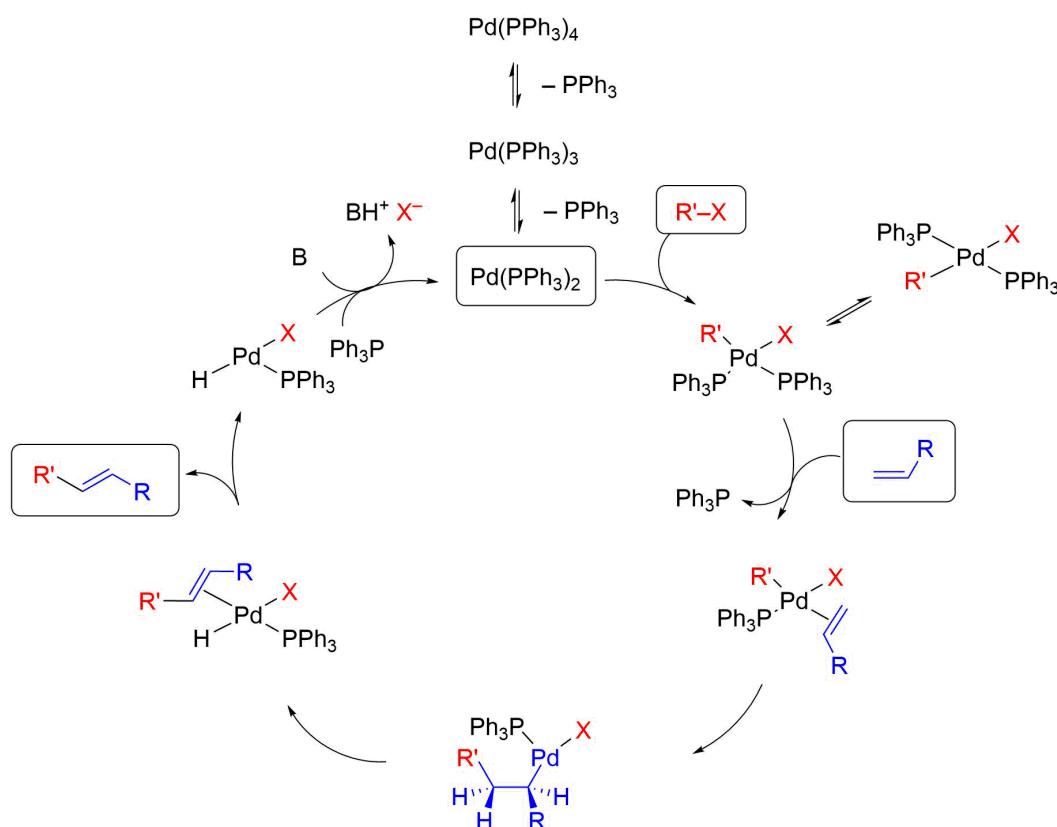


Рисунок 3. Механизм реакции Хека (Beletskaya, Cheprakov, 2000).

1.3.3 Реакция Соногаширы

Реакция Соногаширы — это реакция кросс-сочетания, так же как и реакция Хека. Реакция проходит между арилгалогенидом или винилгалогенидом и концевым алкином, это широко используемый протоколом для построения связи C(sp²)-C(sp) (Рис.4). Полученные внутренние алкины очень универсальны для получения различных алкин-содержащих каркасов. Условия реакции и каталитические системы можно настроить, чтобы облегчить активацию стерически затрудненных или богатых электронами электрофилов. Катализируемая палладием реакция Соногаширы без меди привлекает все большее внимание, поскольку улучшенный метод может быть более безвредным для окружающей среды (Рис.4, В). Более того, условия реакции могут быть легко изменены, чтобы обеспечить слияние других стадий карбонилирования или декарбоксилирования в каталитическом цикле и, таким образом, позволить более сложный, но универсальный конвергентный синтез протекать простым в эксплуатации однореакторным способом.

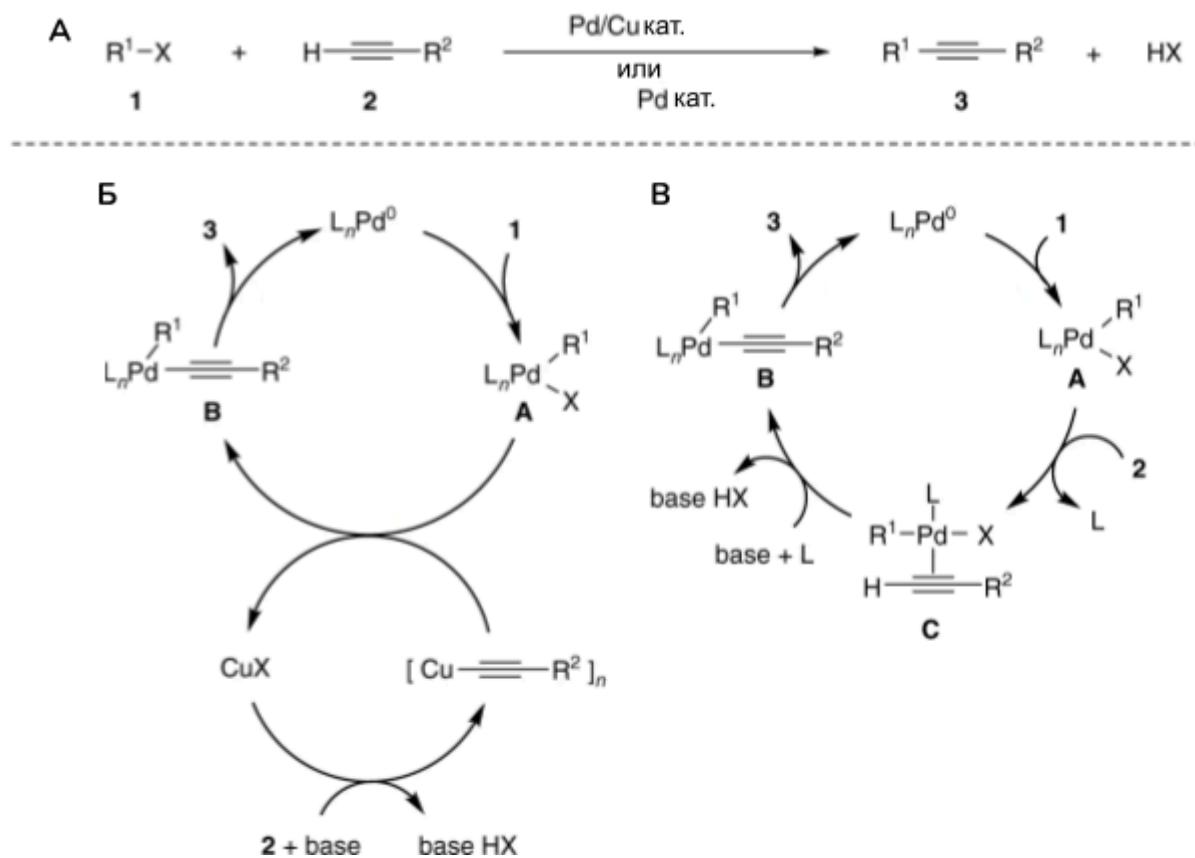


Рисунок 4. Реакция Соногаширы. А — Общее уравнение реакции катализируемой Pd/Cu или катализатором без Cu. Б — механизм реакции кросс-сочетания Соногаширы, катализируемой, как Pd, так и Cu. В — механизм реакции кросс-сочетания Соногаширы без медного катализатора(Gazvoda и др., 2018).

Таким образом для введения флуоресцентных меток в белок и ДНК могут использоваться различные подходы, которые приведут к формированию структурных особенностей в структурах линкеров. В случае использования клик-химии формируется тиазольное кольцо, которое может контактировать с другими ароматическими группами (Wang и др., 2018; Yilmaz и др., 2005). В результате реакции Соногаширы формируется тройная углеродная связь, что в перспективе позволяет задать направление позиционирования флуоресцентной метки относительно точки прикрепления линкера. В реакции хека же формируется двойная углеродная связь, что может придавать большую подвижность молекуле линкера.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Создание молекулярных моделей флуоресцентных меток

В нашей работе в качестве донорно-акцепторной пары были взяты метки цианиновый 3 и цианиновый 5 (Cy3 и Cy5). Данная донорно-акцепторная пара активно применяется при исследовании хроматина, отличается очень большим квантовым выходом (0,31 и 0,21 соответственно) и стабильностью, а также коммерчески доступна, подходит под типовые спектральные линии лазеров(Huynh и др., 2020; Kekić, Lietard, 2022a) (Рис. 5).

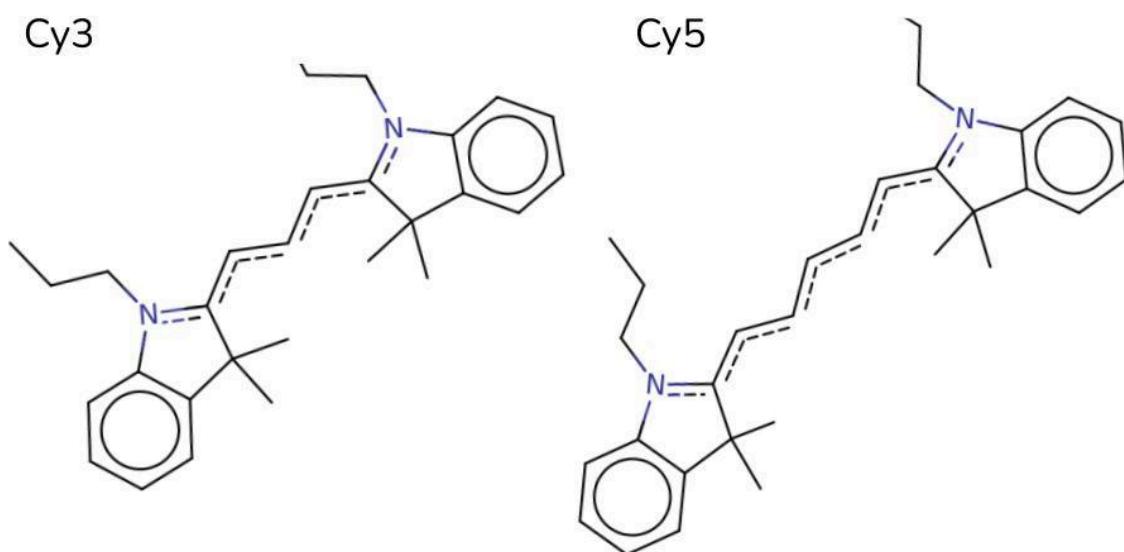


Рисунок 5. Химические модели меток, слева представлена метка Cy3, справа Cy5.

Где в качестве донора выступает Cy3, а акцептором Cy5, так как спектр флуоресценции Cy3 и спектр поглощения Cy5 хорошо перекрываются Рис. 6.

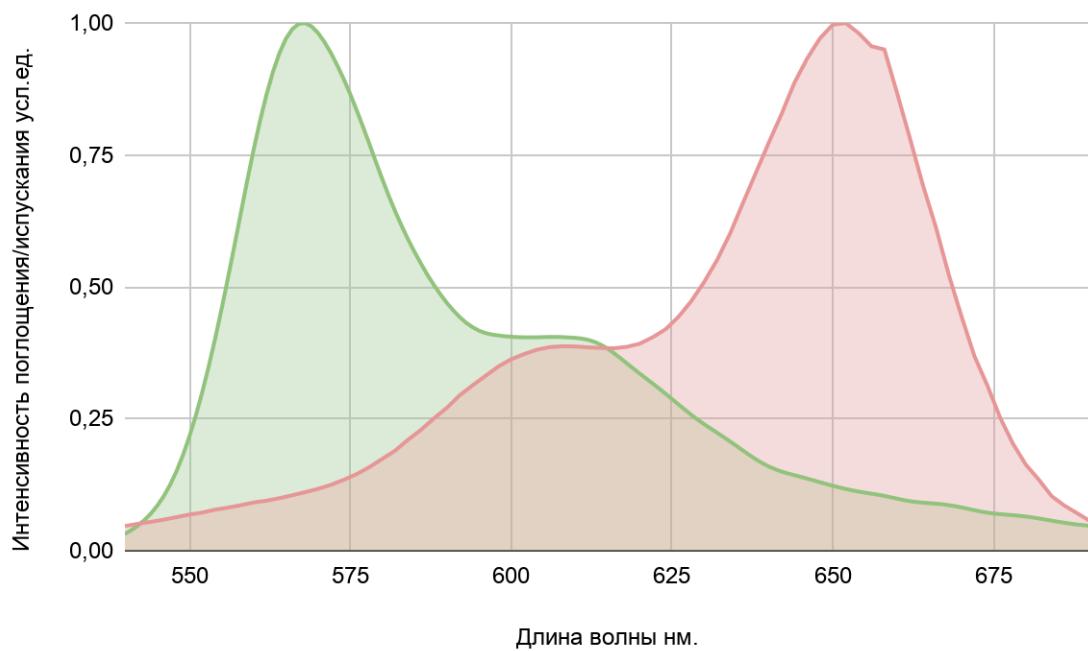


Рисунок 6. Зеленый график — спектр флуоресценции Cy3, красный — спектр поглощения Cy5.

Для прикрепления флуоресцентных меток в медиальные позиции на ДНК были выбраны линкеры представляемые на российском рынке компаниями Syntol и Lumiprobe (Рис.7 А,Б).

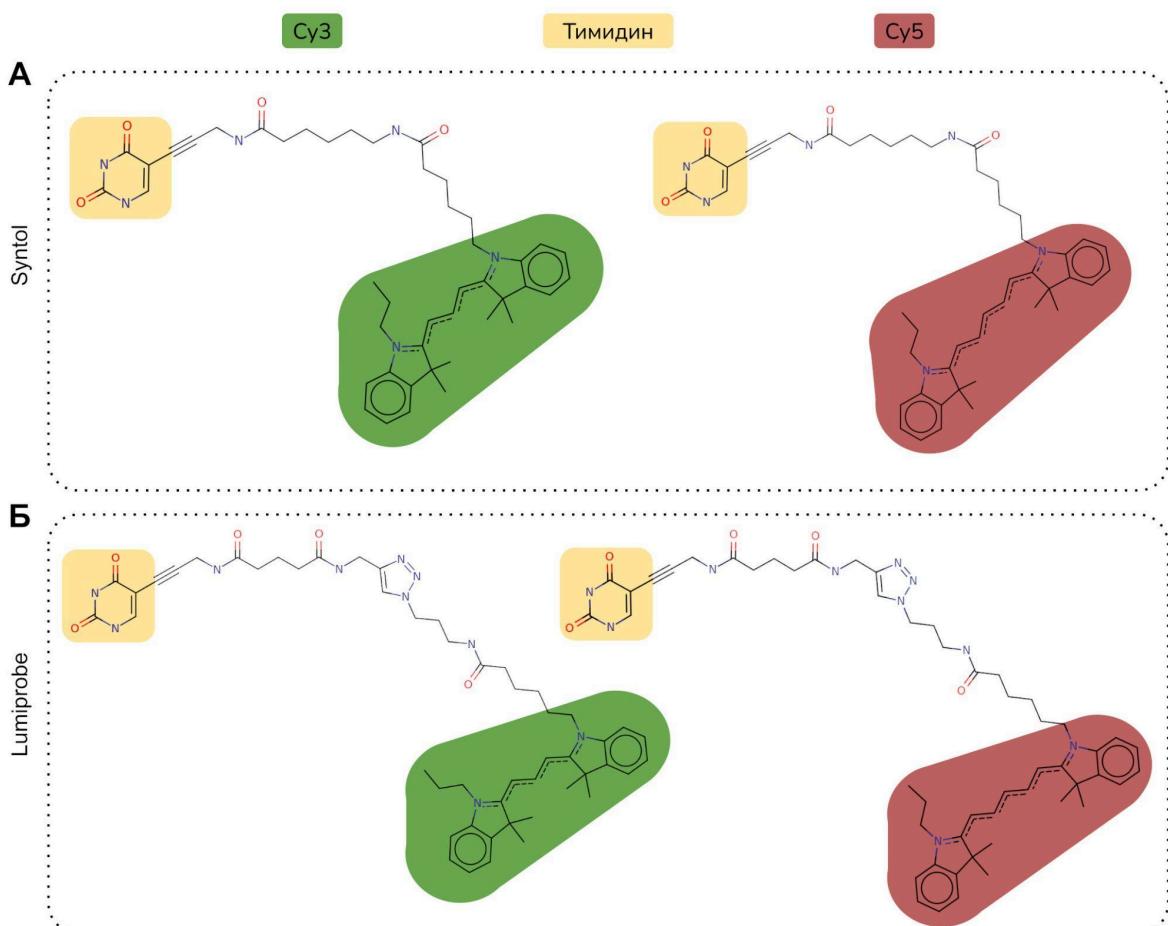


Рисунок 7. Химические модели меток Су3 — зеленый, Су5 — красный с прикрепленными к ним линкерами от компании Syntol — А и от компании Lumiprobe — Б. Желтым отмечено азотистое основание тимин, через которое метки внедряются в состав ДНК. Линкеры от этих компаний различаются как длинной, так и составом. Вариант линкера от компании Lumiprobe длиннее на 7 эквивалентных связей С-С.

Таким образом для каждого флуорофора было две модели, одна с линкером от Lumiprobe, другая с линкером от Syntol. С помощью программного обеспечения MarvinSketch были созданы модели меток с линкерами.

2.2 Метод Молекулярной динамики

В основе метода молекулярной динамики лежит представление атомов в виде материальных точек, взаимодействия между которыми описываются потенциальной функцией (Rahman, 1964). Взаимодействия атомов разделяются на две группы: невалентные (межмолекулярные) и валентные (внутримолекулярные).

Невалентное взаимодействие возникает между атомами разных молекул и является причиной существования разных фаз вещества. К невалентным взаимодействиям относят Ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия атомов. Ван-дер-ваальсово взаимодействие между атомами проявляется на малых расстояниях в виде отталкивания, а на больших расстояниях в виде притяжения. Такое взаимодействие часто описывают с помощью потенциала Леннард-Джонса. Электростатические взаимодействия рассчитываются с помощью электростатического потенциала (Кулоновского потенциала).

$$U_{\text{невал.}} = \sum 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] + \sum \frac{q_i q_j}{r} \quad (11)$$

Валентное взаимодействие возникает между атомами одной молекулы в результате наличия общих валентных пар электронов у соседних атомов, то есть в результате образования химической связи. К таким взаимодействиям относят изменение длины химической связи, изменение валентного угла, изменение двугранного угла и угла выхода из плоской группы. Энергия этих типов взаимодействий описывается следующим набором потенциалов:

$$U_{\text{вал.}} = U_{\text{связь}} + U_{\text{угол}} + U_{\text{торсион}} + U_{\text{пл. групп}} \quad (13)$$

Взаимодействия одной частицы со всеми другими частицами определяют потенциальную энергию этой частицы в каждый момент времени, производная потенциальной энергии определяет силу (14), которая в свою очередь согласно второму закону Ньютона определяет направление движения и величину ускорения (15).

$$F_i = - \frac{\delta U(r_1, \dots, r_N)}{\delta r_i} \quad (14)$$

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i, \quad i = 1, \dots, N \quad (15)$$

Для того чтобы избежать появления краевых эффектов, при моделировании используют периодические граничные условия.

Таким образом, при заданных начальных положениях атомов и начальных скоростях проводится расчет развития системы во времени — траектории молекулярной динамики.

В нашей работе мы использовали метод молекулярной динамики для моделирования флуоресцентных меток на ДНК. В ходе моделирования изменяли параметры системы, такие как: тип воды, концентрация ионов в моделируемой системе, тип линкера для введения флуорофора в последовательность ДНК.

2.3 Параметризация меток

Для расчета молекулярной динамики меток необходимо иметь файлы (.itp, в случае GROMACS) топологий меток. В этих файлах записываются параметры атомов и параметры взаимодействия атомов внутри молекулы. Перечисляются атомы образующие связи, валентные углы, двугранные углы и плоские группы. Кроме этого нужен файл описывающий взаимное расположение атомов в системе (.pdb; .gro).

Для получения корректного файла топологии мы использовали программную библиотеку ACPYPE, которая представляет собой сценарий-оболочку для программного обеспечения ANTECHAMBER, который упрощает создание топологий и параметров малых молекул для различных программ молекулярной динамики, таких как GROMACS, CHARMM и CNS (Sousa da Silva, Vranken, 2012). В качестве входного файла для ACPYPE использовались файлы молекул подготовленные в MarvinSketch и сохраненные в формате .mdl. В качестве результатов расчетов на выход подавались файлы топологий для каждой метки. В нашей работе мы используем свободное программное обеспечение для возможности повторения проведенных исследований. По этой причине, для расчетов парциальных зарядов мы использовали программный пакет PsiRESP.

Для расчетов парциальных зарядов меток мы разделили каждую метку на три части (Рис. 8). Чтобы ограничения зарядов для атомов тимина взятые из силового поля amber14sb_parmbsc1_cufix не влияли на заряды рассчитываемые для линкера. Также чтобы заряд +1 для флуоресцентных меток был локализован только на части метки ей принадлежащей.

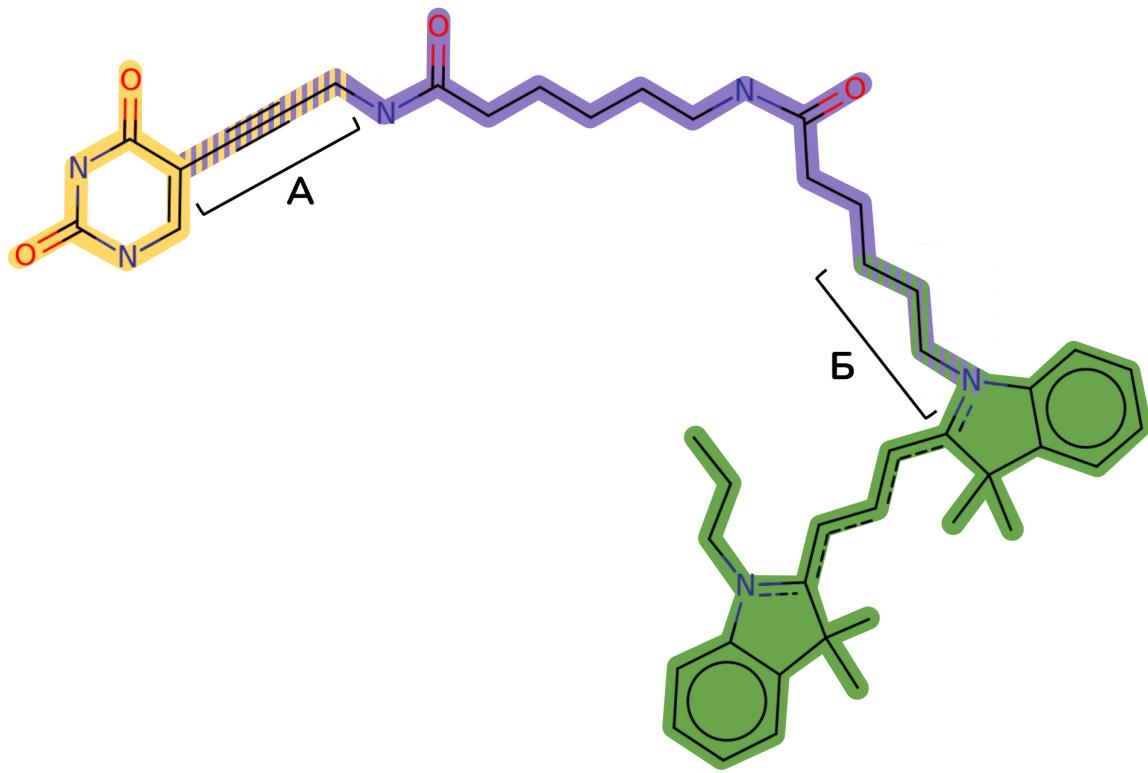


Рисунок 8. Схема разделения модели метки на 3 части, на примере метки Cy3 с линкером от компании Syntol. Каждая часть имеет свой цвет: Тимин — желтый, часть молекулы относящаяся к линкеру — фиолетовая, Cy3 — зеленый. Буквами А и Б отмечены участки используемые для сшивания частей меток после расчета парциальных зарядов.

Для каждой части рассчитывались парциальные заряды. При этом заряд на части соответствующей флуорофору (Cy3, Cy5) приравнивался +1, в силу наличия дополнительной ароматической связи на атоме азота. Заряды остальных частей приравнивались 0. Для расчетов парциальных зарядов мы использовали программный пакет PsiRESP (Alenaizan, Burns, Sherrill, 2020). Данный пакет использует RESP (The restrained electrostatic potential) метод для расчета парциальных зарядов в молекуле (Bayly и др., 1993; Cieplak и др., 1995; Connolly, 1983). Метод RESP основан на квантово-химических расчетах, где используется приближение расчета ограниченного электростатического

потенциала (Restrained ElectroStatic Potential (RESP)) от распределения электронов. Данный потенциал используется для квантово-химического приближения и позволяет рассчитать парциальные заряды на атомах в молекуле для определенной группы конформаций.

Полученные парциальные заряды для каждой части метки объединялись в единый массив, где каждому атому присвоен свой заряд. Для работы с молекулярными данными использовалась программная библиотека RDKit для языка программирования Python.

Полученный массив использовался для получения файла топологии .rtp (residue topology parameter file). Файл топологии формата rtp позволяет создавать молекулярные последовательности. С помощью rtp файлов задаются файлы топологии для оснований в молекулах ДНК, а также топологии аминокислот в молекулах белков. Результатом создания rtp файла является возможность встроить исследуемые метки в любую позицию в последовательности ДНК.

Однако, после получения файла rtp мы проводим его дальнейшую модификацию. Объединяя файлы топологий меток с rtp файлом тимицина. Таким образом мы указывали параметры атомов и их заряды внутри тимицина, взятые из силового поля amber14sb_parmbsc1_cufix (Ivani и др., 2016; Maier и др., 2015; Yoo, Aksimentiev, 2018). В результате нами была разработана процедура создания модифицированных остатков нуклеиновых кислот. Важно упомянуть, что помимо переноса параметров из файла топологии тимицина в файл топологии метки, необходимо исключить дублирование имен атомов из тимицина с именами атомов относящейся к метки. Также необходимо исключить дублирование параметров описывающих взаимодействия соседних атомов, такие как: изменения длин химических связей, изменения валентных углов, изменения двугранных углов и углов выхода из плоских группы.

В результате были созданы 4 файла топологий (Syntol: Cy3, Cy5; Lumiprobe: Cy3, Cy5), описывающие тимицин модифицированный соответствующей меткой с соответствующим анкерным участком метки

Поскольку в файлы топологии мы добавили все атомы из тимицина, в том числе и атомы рибозы и фосфорной группы, следующим шагом было добавление и замена имен атомов тимицина в файлах координат (.pdb) меток. В результате нами были получены как файлы топологии, так и файлы координат атомов для каждой метки. Где имена атомов в файле топологии соответствует именам атомов в файле координат.

2.4 Подготовка системы ДНК-метка для вычислительного эксперимента

Нами были подготовлены 24 системы ДНК с одиночной меткой. При моделировании одиночных меток в качестве модельной ДНК была взята последовательность состоящая из 14 пар нуклеотидов (Рис. 9)

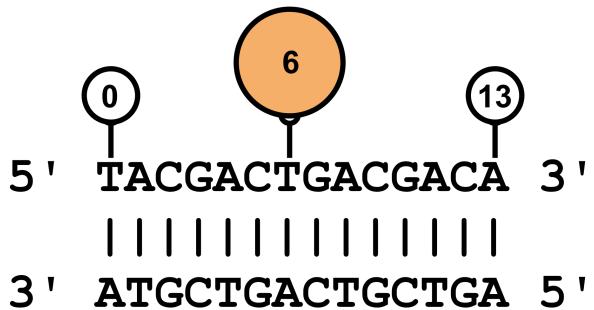


Рисунок 9. Схема иллюстрирующая систему ДНК используемую для моделирования одиночных флуорофоров. Где по позиции 7 вносились модифицированной основание с флуорофором.

Для каждого типа метки (Syntol Cy3, Syntol Cy5, Lumiprobe Cy3, Lumiprobe Cy5) подготавливались системы с концентрацией ионов Na^+ и Cl^- 0,15 М, 0,30 М и 1 М в двух типах воды: TIP3P и OPC (приложение i).

Системы помещались в вычислительную ячейку, которая представляла из себя додекаэдр. Минимальное расстояние от ДНК или метки до края ячейки 1 нм. расчетная ячейка, после помещения в нее системы ДНК-метка, заполнялась

водой. Вода моделировалась либо в виде трехточечной модели TIP3P, либо в виде четырехточечной OPC (Jorgensen и др., 1983). После добавления воды рассчитывалось количество ионов Na^+ и Cl^- , необходимых для достижения в системе концентрации равной 0,15 М, 0,30 М и 1 М. Добавление ионов нейтрализовало суммарный заряд системы и создавало ионную силу.

Также были подготовлены 4 системы с введенными в последовательность ДНК донорно-акцепторными парами флуорофоров (Syntol Cy3-Cy5, Lumiprobe Cy3-Cy5) (Рис. 10.).

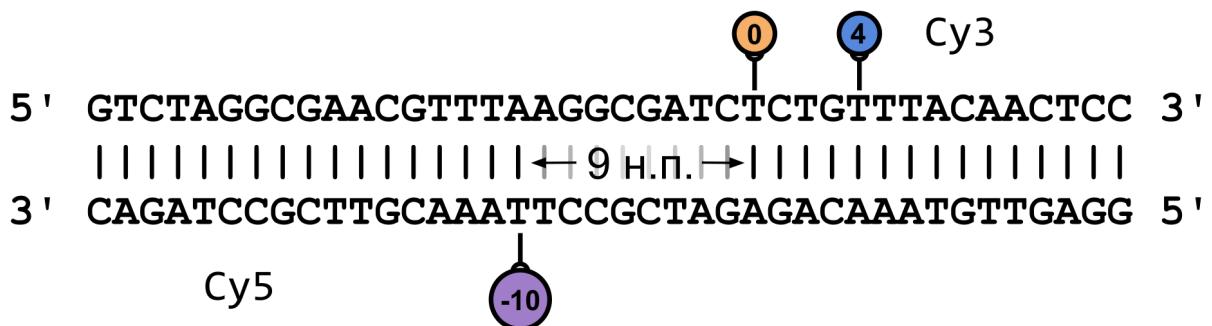


Рисунок 10. Схема введения меток в последовательность ДНК, где в позиции 0 и 4 вводились флуорофор донор Cy3, в позицию -10 вводился флуорофор акцептор Cy5. При этом донорно-акцепторная пара флуорофоров имела линкеры от одной и той же компании.

2.5 Проведение вычислительного эксперимента

Расчеты траекторий молекулярной динамики проводились с использованием программного пакета GROMACS 2021.4 (с ускорением на GPU)(Abraham и др., 2015).

Силовое поле — AMBER ff14SB с parmbsc1 ДНК и с коррекциями параметров ионов CUFIX (Ivani и др., 2016; Maier и др., 2015; Yoo, Aksimentiev, 2018). Расчеты проводились на сервере Newton, на видеокартах Nvidia Geforce RTX

2080. Подготовленные системы проходили этапы минимизации энергии и эквилибрации.

Минимизация энергии проводилась с использованием алгоритма steepest descent, с максимальным количеством шагов минимизации равным 10000. Шаг интегрирования 2 фс. Использовался метод расчета электростатики Fast smooth Particle-Mesh Ewald (PME) electrostatics.

Эквилибрация системы проводилась с использованием алгоритма leap-frog. Длина траектории эквилибрации составляла 10 нс, с шагом интегрирования в 2 фс. Параметры электростатики оставались неизменными.

Система моделировалась в NPT ансамбле с температурой 300 К с использованием метода velocity rescale scheme и с давлением 1 бар с использованием баростата Parrinello-Rahman (Bussi, Donadio, Parrinello, 2007; Parrinello, Rahman, 1981).

Шаг моделирования молекулярной динамики составлял 2 фс. Длина траектории молекулярной динамики составляла 400 нс, кадры траектории молекулярной динамики записывались каждую 20 пс.

2.6 Анализ траекторий

Анализ траекторий проводился при помощи программного пакета Gromacs (Páll и др., 2015) и программных библиотек MDAnalysis (работа с координатами атомов), NGL viewer (визуализация), Matplotlib (построение графиков), Pandas, NumPy (обработка данных), для языка программирования Python 3 (Harris и др., 2020; Michaud-Agrawal и др., 2011; Rose и др., 2018).

2.7 Молекулярное моделирование ФРПЭ

В результате проведения расчетов молекулярной динамики, нами были получены траектории меток при различных условиях окружения. Однако, расчет динамики пары меток в комплексе с В ДНК может занимать больше суток и не позволяет быстро оценить ожидаемую эффективность ФРПЭ. Для решения этой задачи мы использовали полученный траектории одиночных меток и моделировали их в комплексе со статичной моделью В ДНК по позициям указанным на рисунке (Рис. 11.)

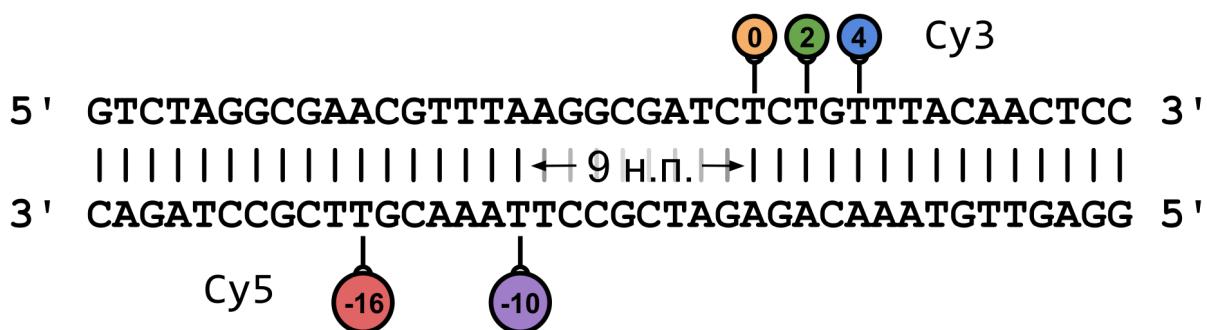


Рисунок 11. Схема введения траекторий меток в последовательность ДНК, где в позиции 0, 2, 4 вводились флуорофор донор Cy3, в позиции -10 и -16 вводились флуорофоры акцептор Cy5.

Было смоделировано 12 систем. Для меток (Су3-Су5) с линкерами от одной из двух компаний (Syntol, Lumiprobe) проводилось 6 моделирование. Где 3 моделирования соответствовали траекториям меток с различными концентрациями ионов 0,15 М, 0,30 М и 1 М в модели растворителя ТIP3Р. И еще 3 моделирования с траекториями тех же концентраций ионов, но полученных в модели растворителя OPC.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Моделирование динамики одиночных меток

В результате нами было получено 24 файла траектории систем с одиночными флуоресцентными метками в комплексе с В ДНК (приложение i). Для полученных траекторий были рассчитаны распределения значений расстояний от точки прикрепления меток до центров флуорофоров (Рис. H)

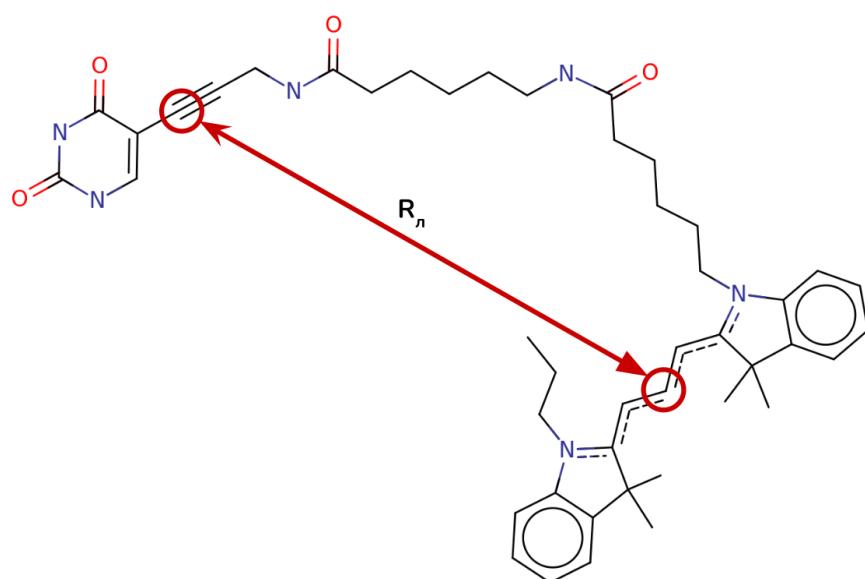


Рисунок. 12. Пример измерения расстояния от точки прикрепления метки до центра флуорофора для метки Syntol Cy3. Красной стрелкой указаны атомы расстояние между которыми считалось как расстояние между точкой прикрепления метки и центром флуорофора (R_n). Полученные распределения значений показаны на Рис. 13.

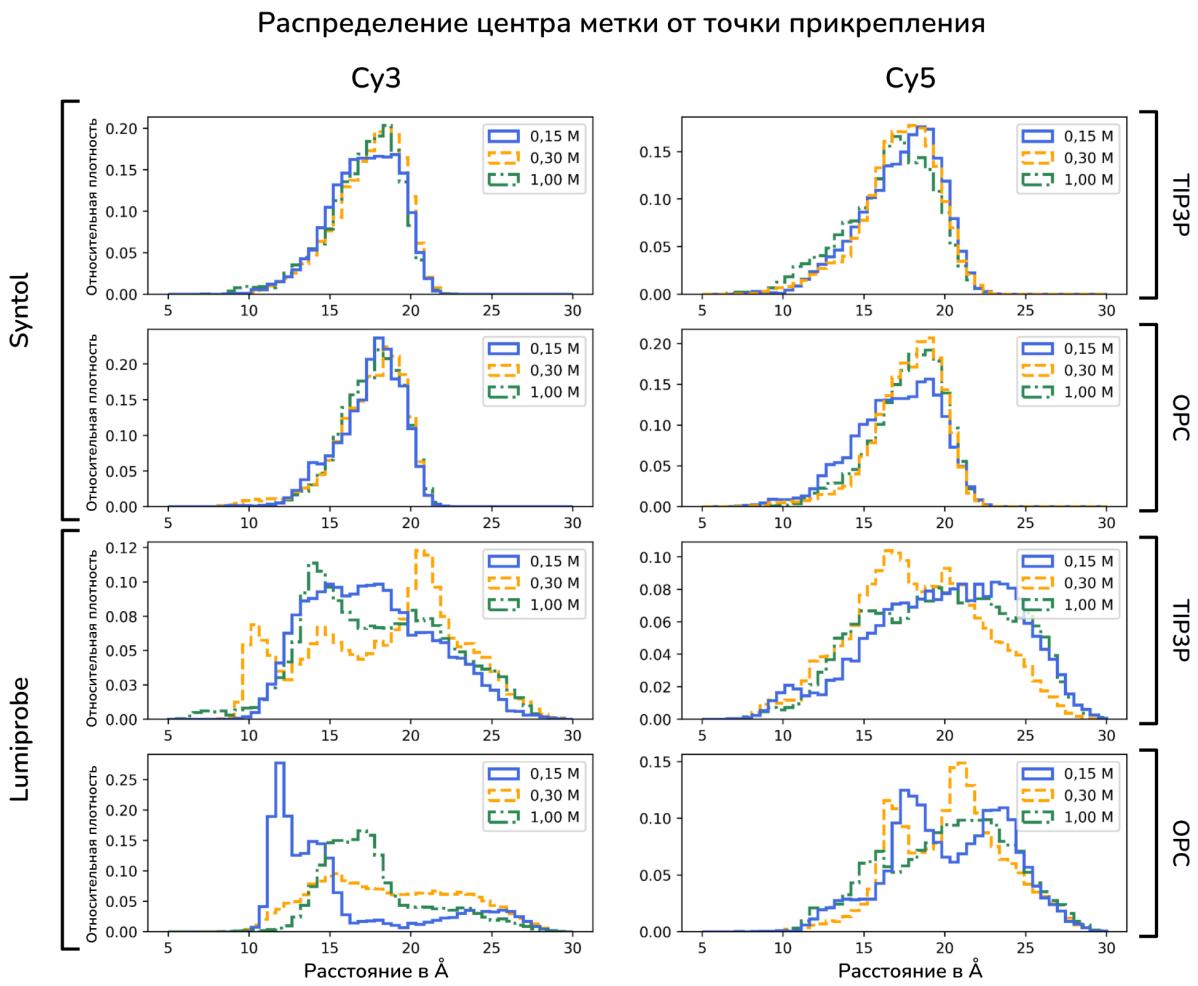


Рисунок 13. Распределения значений расстояний от точки прикрепления метки до центра флуорофора. Значения для траекторий с концентрацией ионов 0,15 М — синий график, с концентрацией ионов 0,30 М — желтый график, с концентрацией 1 М — зеленый график.

Полученные данные не позволяют безоговорочно утверждать, что концентрация ионов, или модель воды в моделируемой системе влияют на распределение значений. Однако, например для меток Lumiprobe-Су5 моделируемых в OPC с увеличением ионной силы видно постепенное угасание пиков распределения расстояний. Эти значения хорошо объясняются действием ионов на заряженные группы как в самих метках, на и на поверхности структуры ДНК. Тем самым они как будто изолируют положительно заряженный флуорофор от отрицательно заряженных фосфатных групп у поверхности ДНК. Однако нельзя

не отметить что для других систем с этим же линкером подобную тенденцию наблюдать сложно. Причины этого будут обсуждены ниже.

Диапазон значений для флуорофоров с линкерами от компании Syntol варьируется от 6 до 23 Å. Если же сравнивать диапазон значений $R_{\text{л}}$ для флуорофоров с линкерами Syntol и Lumiprobe, диапазон значений $R_{\text{л}}$ для меток с линкерами Lumiprobe явно больше, в силу наличия в структуре линкера дополнительных 7 углеродных связей. Таким образом значения расстояний от точки прикрепления до центра флуорофора варьируются от 6 до 30 Å для меток с линкером от компании Syntol. Метка отдаляется дальше от точки прикрепления, что может внести дополнительную ошибку при оценке эффективности ФРПЭ (Agam и др., 2023; Jeschke, 2022; Kalinin и др., 2010; Sindbert и др., 2011b).

Важно отметить, что для всех четырех типов меток (Syntol Cy3, Syntol Cy5, lumiprobe Cy3, Lumiprobe Cy5) движения ароматических группы были ограничены согласно расположению ароматических связей в флуорофорах. Подвижность sp-гибридизированных атомов углерода, соединяющих тимидин и линкер соответствовала параметрам тройной связи между углеродами. Более того, в ходе анализа траекторий наблюдались особенности структур меток описанные ранее для подобных флуорофоров (Iqbal и др., 2008; Liu, Lilley, 2017; Spiriti и др., 2011).

При более тщательном изучении траекторий молекулярной динамики были выявлены контакты флуорофоров с участками структуры В ДНК. Причиной данных взаимодействий может быть распределение положительного заряда по всей части молекулы флуорофора и наличия отрицательно заряженных фосфатных групп находящихся на внешней стороне ДНК. Таким образом при более детальном изучении траекторий меток нами были выявлены следующий типы взаимодействий:

1. Ароматическое взаимодействие (π - π -взаимодействие, или pi stacking) между флуорофором Су3 и триазольным кольцом в структуре линкера

Lumiprobe (Рис. 14, А), где концентрация ионов в моделируемой системе составляла 0,15 М.

2. Контактирование флуорофора Су5 к структуре В ДНК, а конкретно вхождение внутрь малой бороздки (Рис. 14, Б), для системы с концентрацией ионов равной 0,15 М.
3. Ароматическое взаимодействие (π - π -взаимодействие, или pi stacking) между флуорофором Су3 с терминальными нуклеотидами в последовательности ДНК, где флуорофор имел линкер от компании Lumiprobe и моделировался в среде с 0,30 М ионов (Рис. 14, В).

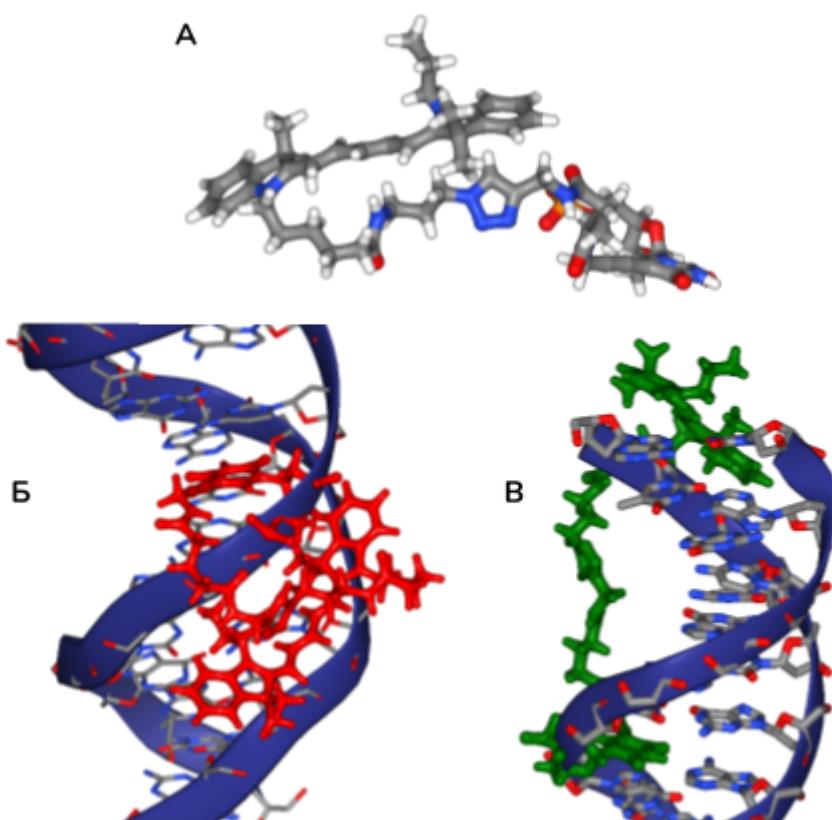


Рисунок 14. Примеры взаимодействий флуоресцентных меток с участками линкера и структурами В ДНК. **А** — притягивание ароматических групп Су3 к тиазольному кольцу внутри структуры линкера компании Lumiprobe. **Б** — взаимодействие Су5 с малой бороздкой В ДНК. **В** — π - π -взаимодействие между Су3 с линкером от компании Lumiprobe и терминальными нуклеотидами в структуре В ДНК.

Эти данные еще раз подтверждают, что повышение ионной силы в моделируемой системе снижает вероятность залипания флуорофоров на моделируемых системах. И опять же, данные примеры показывают повышенное сродство меток с линкерами от компании Lumiprobe к поверхности В ДНК.

Помимо расчета $R_{\text{л}}$ нами было рассчитано распределение значений расстояний от центра метки до ближайшего атома в структуре ДНК (Рис.15).

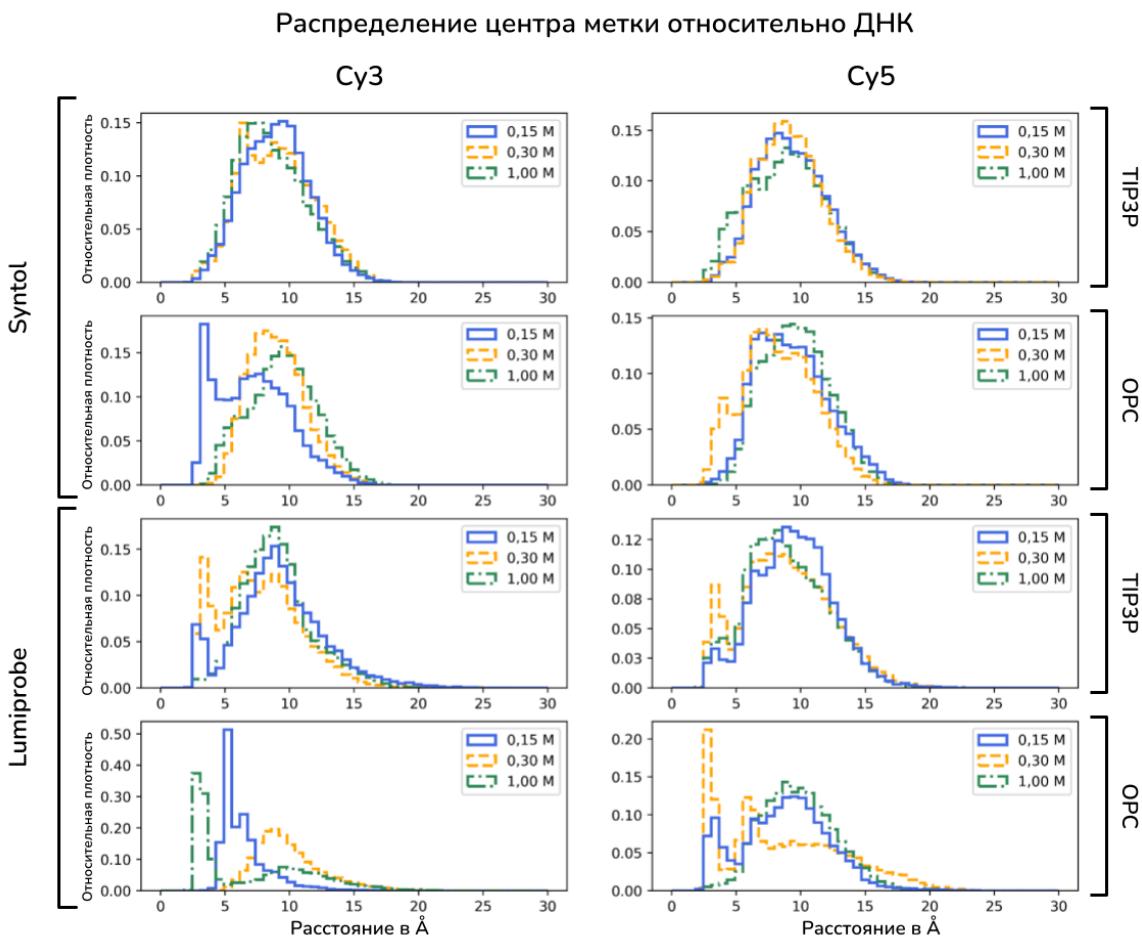


Рисунок 15. Распределения значений расстояний от точки прикрепления метки до центра флуорофора. Значения для траекторий с концентрацией ионов 0,15 М — синий график, с концентрацией ионов 0,30 М — желтый график, с концентрацией 1 М — зеленый график.

Полученные распределения значений показывают, насколько флуорофоры стремятся контактировать с отрицательно заряженной ДНК. Данный график является более показательным в плане иллюстрирования взаимодействия флуорофоров с ДНК. Так, например, для метки Cy3 Syntol OPC заметно смещение распределения в сторону большего расстояния между хлороформом и ДНК при увеличении концентрации ионов. Однако, в целом, для меток с линкерами от компании Syntol в модели воды TIP3P распределения значений схожи. Для меток с линкером Syntol и моделью воды OPC можно заметить, что при увеличении концентрации ионов от 0,15 М до 1 М распределение расстояний в среднем смещается в диапазон больших значений, что согласуется с обсуждаемыми выше примерами. При анализе значений, полученных для меток с линкерами от компании Lumiprobe, стоит учитывать упомянутые выше взаимодействия. По этой причине в распределениях появляются локальные пики, которые сигнализируют о контакте метки с ДНК. Тем не менее, при изучении траекторий моделирования методом молекулярной динамики флуорофоров с линкерами от компании Lumiprobe, возникает ощущение, что полученная зарядовая модель переоценена и, возможно, не совсем корректно описывает электростатические параметры метки.

3.2 Изучение вращательной диффузии

Для траекторий одиночных флуорофоров были рассчитаны функции автокорреляции для оценки влияния ионной силы и типа линкера на вращательную диффузию флуорофоров. Автокорреляционные функции рассчитывались на участках траекторий длинной в 4000 пс (200 кадров траектории). Другими словами, мы смотрели как сильно изменяется направление флуорофора на временах порядка жизни возбужденного состояния. Таким образом мы оценивали как изменяется положение дипольного момента перехода флуорофора с момента возбуждения до момента передачи энергии.

Для оценки данных значений мы рассчитывали автокорреляционную функцию для прямой соединяющие атомы азота в метках Cy3 и Cy5 (Рис. 16)(Deplazes, Jayatilaka, Corry, 2011; Saini, Singh, Bagchi, 2006).

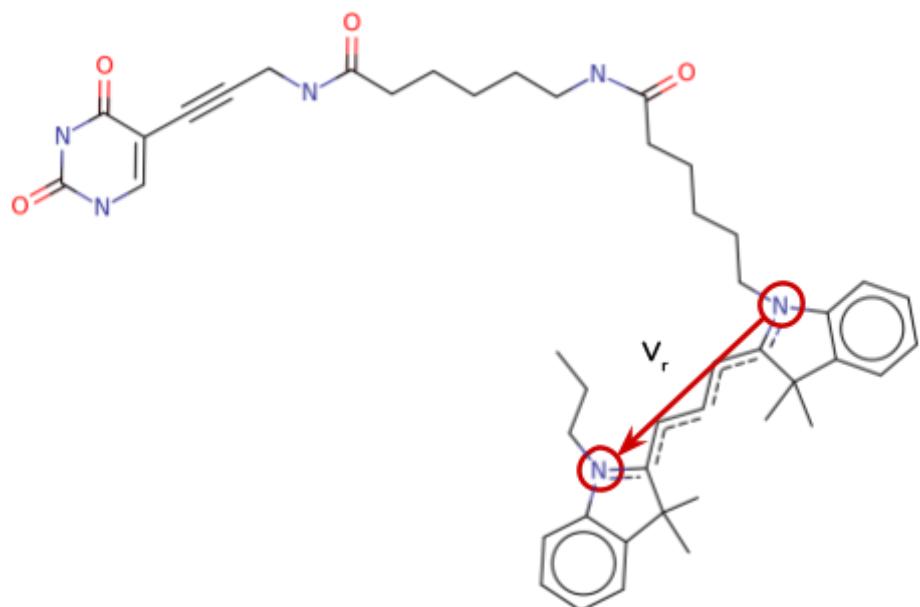


Рисунок 16. Иллюстрирует радиус вектора (V_r), который используют при расчете автокорреляционной функции и значений ориентационного фактора при моделировании донорно-акцепторных пар. (V_r) строится по координатам атомов азотов входящих в состав флуорофоров метках Cy3 и Cy5 (Рис.7)

Нами были получены значения τ , описывающие время необходимое на уменьшение значения автокорреляционной функции на значение равное экспоненте(Рис. 17).

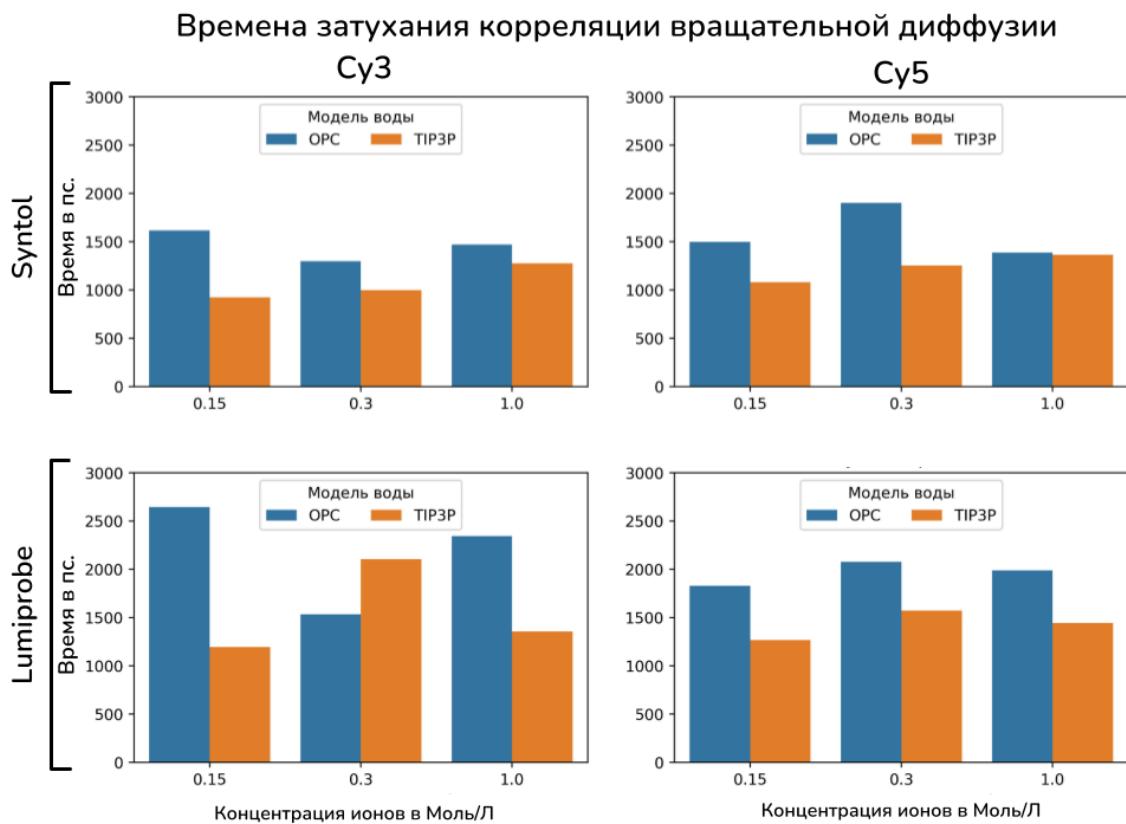


Рисунок 17. Влияние типа растворителя и концентрации ионов на затухание корреляции вращательной диффузии меток.

Как можно видеть из графика, время необходимое на уменьшение значения автокорреляции в e раз не превышает 3 нс. Это время хорошо соотносится со средними временами жизни возбужденного состояния флуорофоров (Berezin, Achilefu, 2010). Таким образом при расчете террористических значений эффективности ФРПЭ будет корректно использовать динамический метод расчета эффективности ФРПЭ. Поскольку флуорофоры могут посетить любую взаимную ориентацию за время жизни возбужденного состояния донора.

Значения τ для модели воды OPC в среднем оказались больше значений для TIP3P. Это можно объяснить свойствами данных типов воды. Исходя из литературных данных модель OPC является более адгезионной (Izadi, Anandakrishnan, Onufriev, 2014). Из-за чего вращательная диффузия флуорофоров в данном типе воды может быть более затруднена по сравнению с моделью воды TIP3P.

Можно заметить, что для систем с моделью воды TIP3P значения τ увеличивается при увеличении концентрации ионов. Причины такого эффекта требуется изучать подробнее. Ниже представлен пример затухания автокорреляционных функций дипольных моментов (Рис. 18).

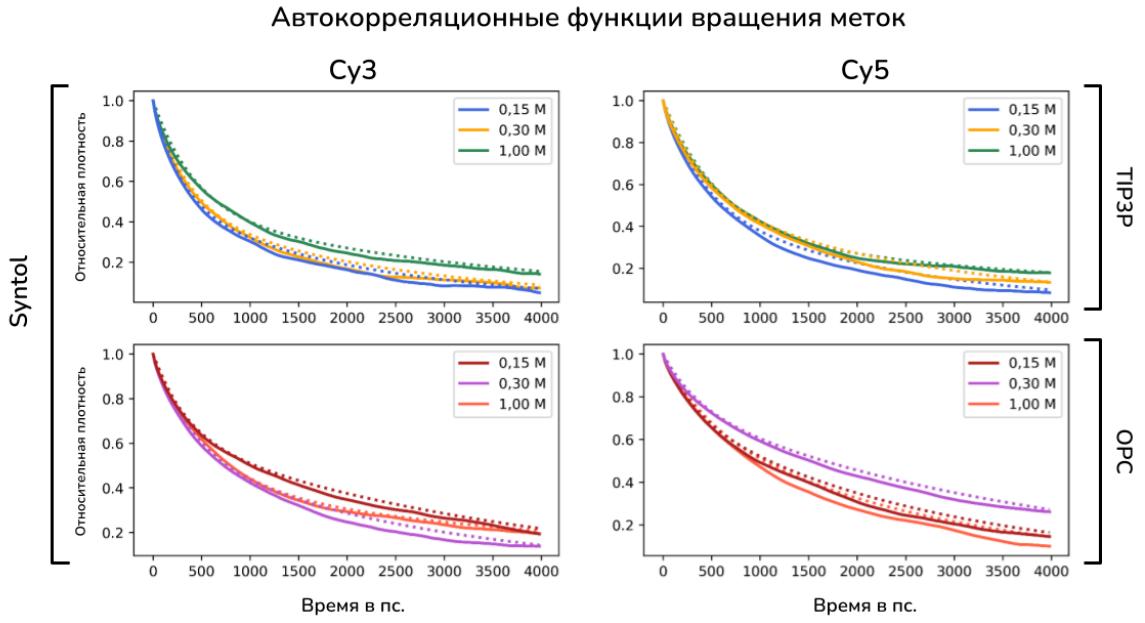


Рисунок 18. Данные полученные при расчете автокорреляционных функций, где непрерывные линии — рассчитанные значения автокорреляции вращения флуорофора, пунктирные линии — аппроксимированные функции двух экспонент.

Для аппроксимации функций автокорреляции нами использовались функция двух экспонент. Где выделялась быстрая экспонента, которая описывала вклад во вращательное движение флуорофора самим флуорофором, и медленная экспонента, описывающая вклад линкера во вращательное движение флуорофора (16) .

$$y = a_1 e^{-\frac{x}{|a_0|}} + (1 - a_1) e^{-\frac{x}{|a_2|}} \text{ где } a_2 > a_0 > 0 \quad (16)$$

Автокорреляционные функции хорошо описываются функцией двух экспонент. Полный диапазон значений автокорреляционных функций представлен в приложении ii.

3.3 Моделирование динамики донорно-акцепторных пар

Нами было запущено 4 расчета молекулярной динамики донорно-акцепторных пары флуорофоров. С концентрацией ионов 0,15 М, по позициям 0-10 и 4-10, для каждого типа линкера. Во время моделирования меток с линкерами от компании Lumiprobe по позициям 0-10 выло выявлено взаимное контактирование флуорофоров (Рис. 19).

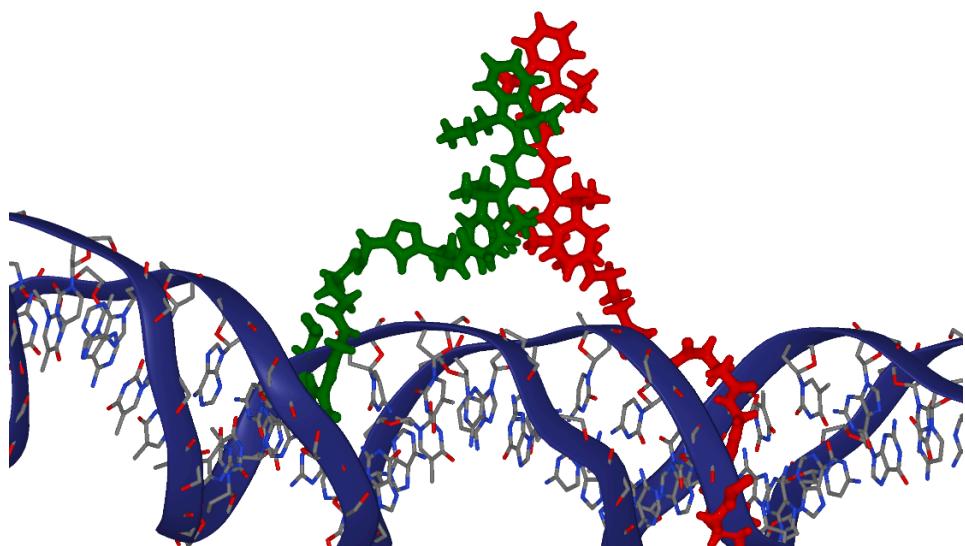


Рисунок 19. Кадр иллюстрирующий π - π -взаимодействие между Cy3-Cy5, полученный из молекулярной динамики для меток с линкерами от компании Lumiprobe, которые были введены в позиции 0-10.

Наблюдение такого типа взаимодействий говорит о конкретных параметрах топологии для ароматических участков флуорофоров Cy3 и Cy5. А также является хорошей иллюстрацией необходимости учитывать длины линкеров при планировании эксперимента. Кроме этого, контактирование флуорофоров

приводит к появлению изгиба структуры В ДНК. Угол кривизны составлял 25 градусов. Для систем состоящих из донорно-акцепторной пары введенной в позиции 0-10 или 4-10 были рассчитаны траектории молекулярных динамик, в условиях концентрации ионов 0,15 М и модели воды TIP3P (Рис.20).

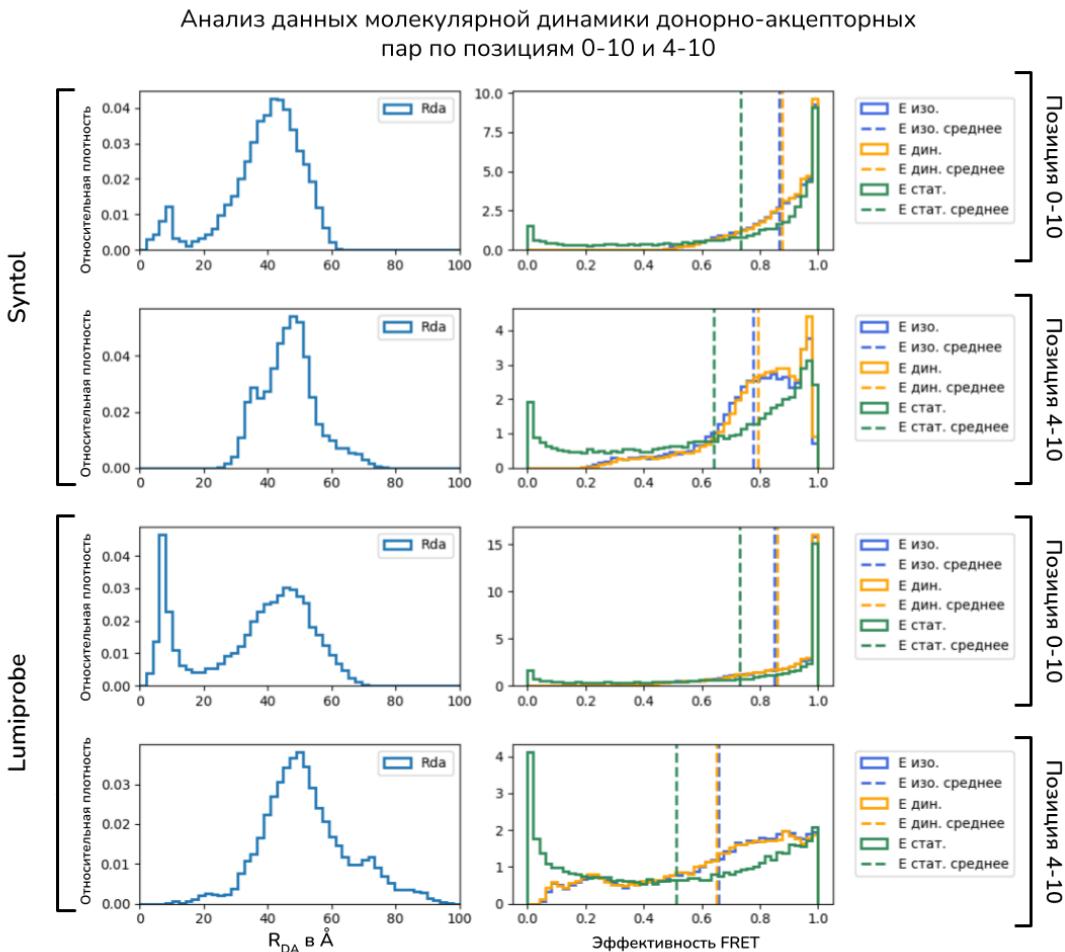


Рисунок 20. Где левый столбец гистограмм — распределение R_{DA} , правый столбец — распределения значений эффективности ФРПЭ рассчитанных по формулам (6, 8, 9).

Видно, что в позициях 0-10 метки расположены достаточно близко, чтобы взаимодействовать друг с другом. При увеличении расстояния между точками введения меток в последовательность ДНК область доступных объемов для донора и акцептора перестают контактировать. Значение при анализе значений эффективности можно заметить, что $E_{\text{стат.}}$ вне зависимости от позиций ввода

меток варьируется от 0 до 1. Причиной этого является использование моментального значения ориентационного фактора (k^2), находящегося в диапазоне от 0 до 4.

При сравнении значений эффективности в позиции 4-10 для двух типов линкеров видно, что за счет большей длины линкера, для меток Lumiprobe $E_{дин.}$ принимает значение 0,65. Когда для меток Syntol $E_{дин.} = 0.78$. Что довольно близко к значениям эффективности, где в качестве координат донорно-акцепторной пары берутся координаты оснований к которым присоединены метки ($E_{теор} = 0.82$).

Кроме того, хорошо видно, что значения $E_{стат.}$ далеки от теоретического в силу того, что константы скорости диффузии флуорофора сопоставимы с константами скорости перехода возбужденного состояния с донора на акцептор. А использование статического усреднения верно только для случая когда константа скорости диффузии флуорофор намного меньше константами скорости перехода возбужденного состояния с донора на акцептор.

3.4 Молекулярное моделирование ФРПЭ

Метод молекулярной динамики позволяет оценивать множество факторов в исследуемой системе, в том числе оценивать значения констант скоростей диффузии флуорофоров. Однако данный метод требует больших вычислительных мощностей, потребность в которых только увеличивается при увеличении моделируемых атомов в системе. Также при моделировании молекулярной динамики в модели воды ОРС время расчета также увеличивается. Чтобы не запускать расчет для каждой возможной пары флуоресцентных меток, можно выравнивать парные траектории одиночных меток в качестве донорно-акцепторных пар молекулярных моделях, в нашем случае на модели ДНК используемой в разделе 3.3. (Рис 11).

В итоге используя полученных нами ранее траекторий одиночных меток (раздел 3.1), было рассчитано молекулярное моделирование. Для донорно-акцепторных пар с идентичными типами растворителя (TIP3P, OPC) и концентрациями ионов (0,15 М, 0,30 М, 1 М) по позициям указанным в таблице 1.

Таблица 1. Позиции, введения флуорофоров в последовательность ДНК.

Позиции	Расстояние в н. п.	Расстояние в Å
0-10	10	32.43
2-10	12	39.89
4-10	14	46.3
0-16	16	52.19
2-16	18	58.6
4-16	20	65.75

В ходе молекулярного моделирования дальнейшие расчеты проводились только с теми кадрами траекторий, где не наблюдалось пересечение структур меток с В ДНК. В ходе каждого моделирования мы рассчитывали значения эффективности ФРПЭ исходя из формул (6, 8, 9). Для этого из данных траекторий мы брали координаты флуорофоров каждую вторую нс. (до 200 кадров для траектории одной метки). Таким образом мы получали значения координат для донора и для акцептора. После чего для каждого значения координаты донора рассчитывались эффективности ФРПЭ ко всем возможным выровненным координатам акцептора. В итоге нами было получено в среднем 40000 значение эффективности ФРПЭ, для каждой донорно-акцепторной пары в своей модели воды и концентрации ионов(Рис. 21.) (приложение iii-v.)

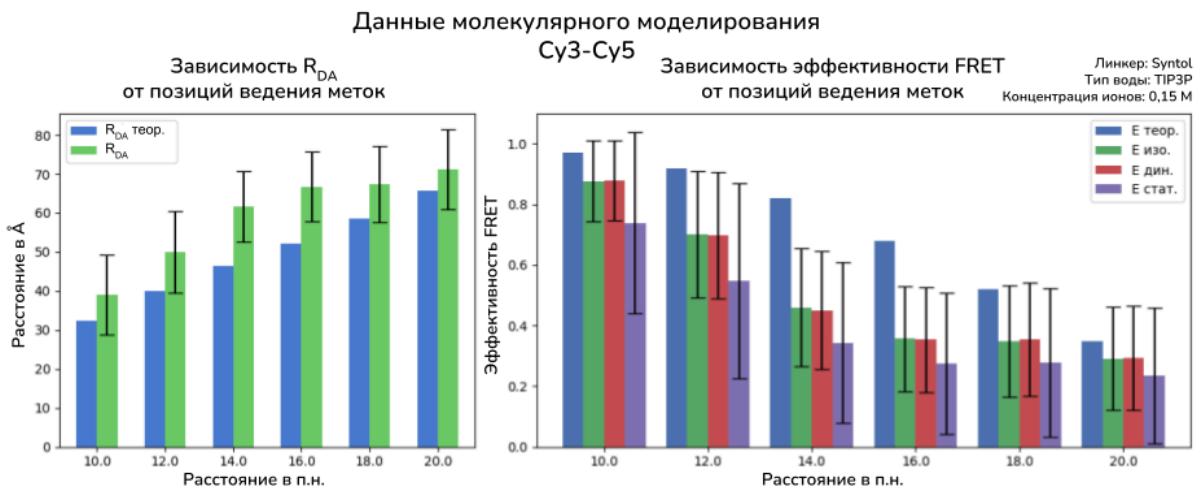


Рисунок 21. Пример данных полученных в результате молекулярного моделирования. Где на левом графике R_{DA} теор. — расстояния между нуклеотидами, R_{DA} — расстояния между центрами флуорофоров. На правом графике: E теор. — эффективность ФРПЭ рассчитанная с использованием расстояний R_{DA} теор. Значения эффективности E изо., E дин., E стат. рассчитаны для расстояний R_{DA} с использованием соответствующих формул, (разделе 1.2, формулы 6, 8, 9).

Полученные данные показывают, что средние значения эффективности ФРПЭ нельзя интерпретировать, как непосредственно расстояние между точками прикрепления, в силу наличия таких факторов, как длина линкера и подвижность флуорофора. Можно заметить что значения эффективности ФРПЭ рассчитанные динамическим методом хорошо согласуются со значениями рассчитанными изотропным методом. Это еще раз показывает, что значения фактора ориентации полученные из траекторий близки к $\frac{2}{3}$, ведь в изотропном методе $k^2 = \frac{2}{3}$.

При сравнении значений эффективности ФРПЭ для всех смоделированных систем по одной выбранной позиции, например 4-16 (Рис. 22)

Значения эффективности FRET для позиции 4-16

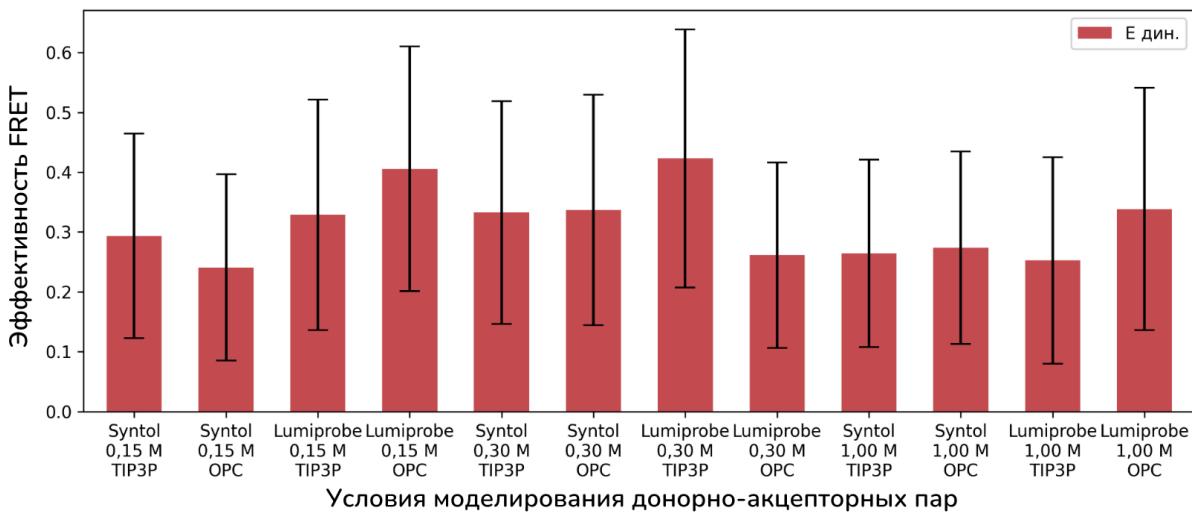


Рисунок 22. Сравнение значений эффективностей для данных полученных в результате молекулярного моделирования. Значения эффективности рассчитаны по формуле 8.

Из полученных значений можно видеть что при концентрации ионов 1 М, эффективность принимает наименьшие значения. Это оправдано, поскольку при увеличении ионной силы флуорофоры меньше взаимодействуют с отрицательно заряженной структурой ДНК, тем самым больше диффундирует в пространстве и все больше увеличивая пространство доступного объема. В примерах выше мы не раз фиксировали влияние ионной силы на локализацию флуорофора в доступном объеме.

3.5 Сравнение методов молекулярной динамики и молекулярного моделирования.

По результатом молекулярного моделирования донорно-акцепторных пар флуорофоров в комплексе со структурой В ДНК были получены значения эффективности Ферстеровского переноса энергии по позициям (раздел 3.4. приложения ii-v). Здесь мы сравниваем данные молекулярной динамики (раздел 3.3) с данными молекулярного моделирования (Рис. 23).

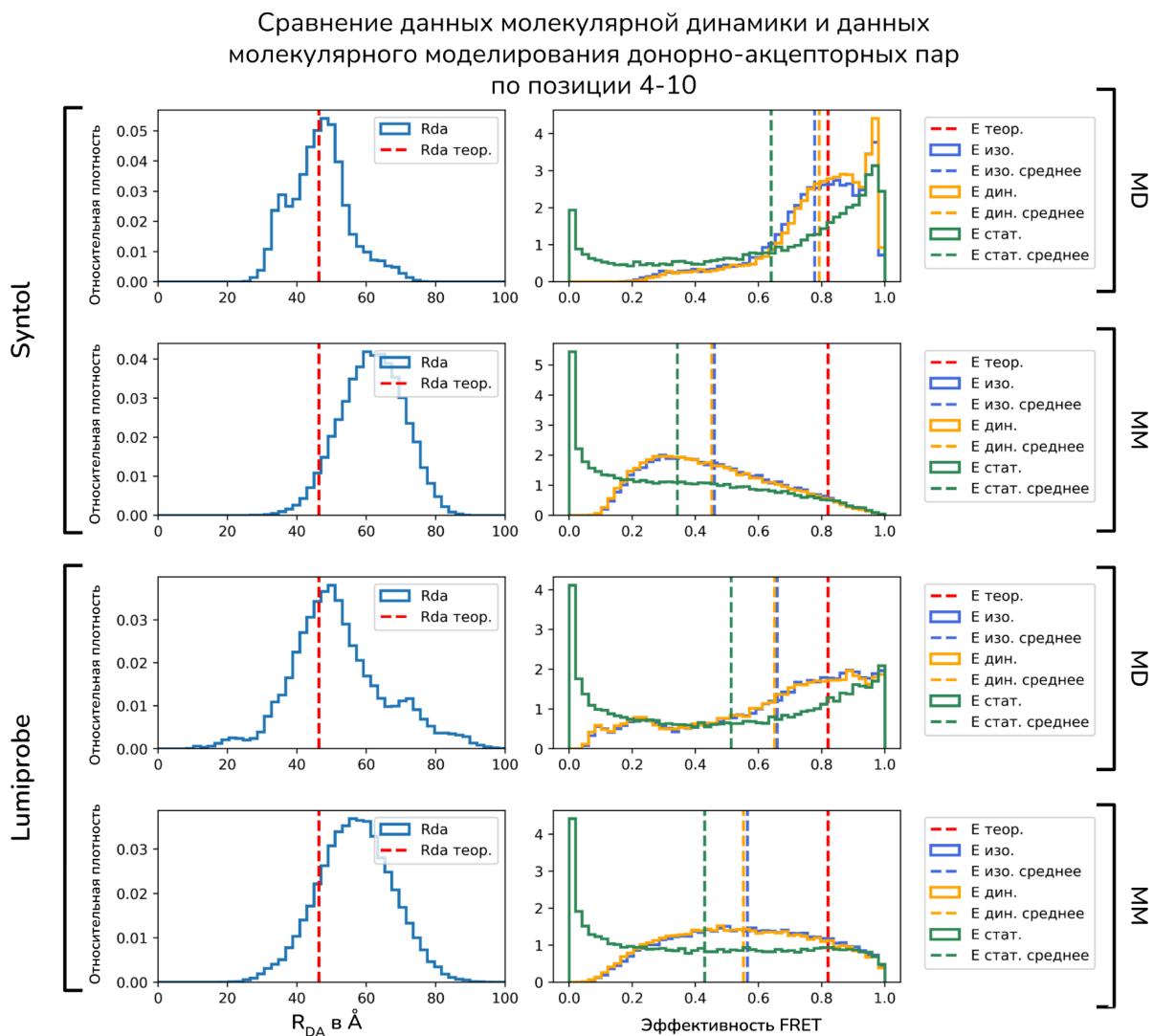


Рисунок 23. Где левый столбец графиков — значения R_{DA} , правый столбец графиков — эффективности ФРПЭ , полученных из траекторий молекулярной динамики системы (MD), и из моделирования траекторий одиночных меток в

комплексе с В ДНК (ММ). R_{DA} теор. — расстояния между нуклеотидами, R_{DA} — расстояния между центрами флуорофоров. На правом графике: Е теор. — эффективность ФРПЭ рассчитанная с использование расстояний R_{DA} теор. Значения эффективности Е изо., Е дин., Е стат. рассчитаны с для расстояний R_{DA} с использованием соответствующих формул, (разделе 1.2, формулы 6, 8, 9).

Как хорошо видно из графиков, значения полученные методом молекулярного моделирования не соответствуют значениям из траекторий молекулярной динамики. В первую очередь за счет смещенного распределения значений R_{DA} , из которых в дальнейшем рассчитывались значения эффективности ФРПЭ. Основная причина подобного несоответствия является отсутствие учета электростатических взаимодействий меток с системой. Также в литературе уже описывалось влияние последовательности ДНК на значения эффективности ФРПЭ(Kekić, Lietard, 2022b; Lee, Hippel von, Marcus, 2014; Moreira, You, Owczarzy, 2015).

Теоретические значения R_{DA} теор. и Е теор. входят в диапазон значений полученных при помощи молекулярного моделирования, но не попадают в пики распределений. Это показывает, что при помощи метода молекулярного моделирования возможно получить значения параметров, которые корректно бы описывали структуру молекулярной системы. Однако, для этого необходима их дополнительная обработка.

При сравнении значений эффективности для двух типов линкеров видно, что за счет большей длины линкера, для меток Lumiprobe $E_{дин.}$ принимает значение 0,65. Когда для меток Syntol $E_{дин.} = 0.78$. Что довольно близко к значениям эффективности, где в качестве координат донорно-акцепторной пары берутся координаты оснований к которым присоединены метки (E теор. = 0.82). При этом максимумы распределений R_{DA} , как для меток Syntol, так и для меток Lumiprobe попадают ровно на значения R_{DA} теор. Это показывает, что полученные расчеты эффективности ФРПЭ хорошо описывают динамику ДНК.

Заключение

Нами были составлены протоколы по созданию файлов топологии, которые содержат информацию о структуре молекул флуорофоров и их связях. Мы применили составленный протокол при параметризации флуоресцентных меток, где в качестве флуорофоров выступали Су3 и Су5, а в качестве линкеров использовались варианты, доступные на российском рынке от компаний Syntol и Lumiprobe. С использованием полученных файлов были подготовлены и запущены расчеты молекулярной динамики для систем, различающихся по типам флуорофоров, параметрам ионной силы и моделям воды. Из полученных траекторий мы смогли описать характер взаимодействия меток со структурой ДНК, что является важной частью работы, поскольку данные метки используются, в том числе, в нашей лаборатории. Кроме того, в нашей работе мы подтверждаем корректность полученных файлов топологии по характерным взаимодействиям между структурой ДНК и флуорофоров. Тем не менее некоторые данные сложно объяснить, в частности, распределения значений эффективности для флуорофоров с линкерами Lumiprobe. Мы оценили параметры вращательной диффузии для флуорофоров и использовали полученные траектории для молекулярного моделирования эффективности ФРПЭ для 6 позиций в последовательности ДНК, которые показали преимущество метода молекулярной динамики перед методом молекулярного моделирования при оценке значений эффективности Ферстеровского резонансного переноса энергии.

Результаты и выводы

1. Составлен протокол генерации файлов (топологии) описывающих движения атомов внутри молекулы и распределение парциальных зарядов. Разработанные наборы параметров не противоречат литературным данным.
2. Метод молекулярной динамики позволяет выявить влияние молекулярного окружения и типа прикрепления меток на эффективность ФРПЭ.
3. Моментальные значения эффективности ФРПЭ значительно зависят от способа введения флуоресцентной метки в ДНК. Такие значения нельзя использовать для прямой интерпретации распределения расстояний между точками прикрепления донорно-акцепторной пары.
4. Концентрации ионов в моделируемых системах могут уменьшить времена контактирования флуорофоров со структурой В ДНК, но не влияют на значения вращательной диффузии флуорофоров.
5. Константа скорости вращательной диффузии флуоресцентных меток Су3 и Су5 сопоставима с константой скорости переноса энергии и зависит от модели воды при моделировании молекулярной динамики.

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю Г.А. Армеееву и коллективу кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ.

Список Литературы

1. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., и др. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // SoftwareX. 2015. Т. 1–2. С. 19–25.
2. Agam G., Gebhardt C., Popara M., и др. Reliability and accuracy of single-molecule FRET studies for characterization of structural dynamics and distances in proteins // Nat. Methods. 2023. Т. 20. № 4. С. 523–535.
3. Alenaizan A., Burns L. A., Sherrill C. D. Python implementation of the restrained electrostatic potential charge model // Int. J. Quantum Chem. 2020. Т. 120. № 2. С. e26035.
4. Algar W. R., Hildebrandt N., Vogel S. S., и др. FRET as a biomolecular research tool — understanding its potential while avoiding pitfalls // Nat. Methods. 2019. Т. 16. № 9. С. 815–829.
5. Barth A., Opanasyuk O., Peulen T.-O., и др. Unraveling multi-state molecular dynamics in single-molecule FRET experiments. I. Theory of FRET-lines // J. Chem. Phys. 2022. Т. 156. № 14. С. 141501.
6. Bayly C. I., Cieplak P., Cornell W., и др. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model // J. Phys. Chem. 1993. Т. 97. № 40. С. 10269–10280.
7. Beletskaya I. P., Cheprakov A. V. The Heck Reaction as a Sharpening Stone of Palladium Catalysis // Chem. Rev. 2000. Т. 100. № 8. С. 3009–3066.
8. Berezin M. Y., Achilefu S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging // Chem. Rev. 2010. Т. 110. № 5. С. 2641–2684.
9. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling // J. Chem. Phys. 2007. Т. 126. № 1. С. 014101.
10. Cieplak P., Cornell W. D., Bayly C., и др. Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to biopolymers: Charge derivation for

- DNA, RNA, and proteins // J. Comput. Chem. 1995. T. 16. № 11. C. 1357–1377.
11. Connolly M. L. Analytical molecular surface calculation // J. Appl. Crystallogr. 1983. T. 16. № 5. C. 548–558.
12. Corry B., Jayatilaka D. Simulation of Structure, Orientation, and Energy Transfer between AlexaFluor Molecules Attached to MscL // Biophys. J. 2008. T. 95. № 6. C. 2711–2721.
13. Corry B., Jayatilaka D., Martinac B., и др. Determination of the Orientational Distribution and Orientation Factor for Transfer between Membrane-Bound Fluorophores using a Confocal Microscope // Biophys. J. 2006. T. 91. № 3. C. 1032–1045.
14. Dale R. E., Eisinger J. Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor // Biopolymers. 1974. T. 13. № 8. C. 1573–1605.
15. Dale R. E., Eisinger J. Intramolecular Energy Transfer and Molecular Conformation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1976. T. 73. № 2. C. 271–273.
16. Deplazes E., Jayatilaka D., Corry B. Testing the use of molecular dynamics to simulate fluorophore motions and FRET // Phys. Chem. Chem. Phys. 2011. T. 13. № 23. C. 11045–11054.
17. Dolghih E., Roitberg A. E., Krause J. L. Fluorescence resonance energy transfer in dye-labeled DNA // J. Photochem. Photobiol. Chem. 2007. T. 190. № 2. C. 321–327.
18. El-Sagheer A. H., Brown T. Click chemistry with DNA // Chem. Soc. Rev. 2010. T. 39. № 4. C. 1388–1405.
19. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz // Ann. Phys. 1948. T. 437. № 1–2. C. 55–75.
20. Forster Th. Energiewanderung und Fluoreszenz // Naturwissenschaften. 1946. T. 33. № 6. C. 166–175.
21. Gazvoda M., Virant M., Pinter B., и др. Mechanism of copper-free Sonogashira reaction operates through palladium-palladium transmetallation // Nat. Commun.

2018. Т. 9. № 1. С. 4814.

22. Harris C. R., Millman K. J., Walt S. J. van der, и др. Array programming with NumPy // Nature. 2020. Т. 585. № 7825. С. 357–362.
23. Hoefling M., Lima N., Haenni D., и др. Structural Heterogeneity and Quantitative FRET Efficiency Distributions of Polyprolines through a Hybrid Atomistic Simulation and Monte Carlo Approach // PLOS ONE. 2011. Т. 6. № 5. С. e19791.
24. Huff J. S., Turner D. B., Mass O. A., и др. Excited-State Lifetimes of DNA-Templated Cyanine Dimer, Trimer, and Tetramer Aggregates: The Role of Exciton Delocalization, Dye Separation, and DNA Heterogeneity // J. Phys. Chem. B. 2021. Т. 125. № 36. С. 10240–10259.
25. Huynh M. T., Yadav S. P., Reese J. C., и др. Nucleosome Dynamics during Transcription Elongation // ACS Chem. Biol. 2020. Т. 15. № 12. С. 3133–3142.
26. Iqbal A., Arslan S., Okumus B., и др. Orientation dependence in fluorescent energy transfer between Cy3 and Cy5 terminally attached to double-stranded nucleic acids // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. Т. 105. № 32. С. 11176–11181.
27. Ivani I., Dans P. D., Noy A., и др. Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations // Nat. Methods. 2016. Т. 13. № 1. С. 55–58.
28. Ivanov V., Li M., Mizuuchi K. Impact of Emission Anisotropy on Fluorescence Spectroscopy and FRET Distance Measurements // Biophys. J. 2009. Т. 97. № 3. С. 922–929.
29. Izadi S., Anandakrishnan R., Onufriev A. V. Building Water Models: A Different Approach // J. Phys. Chem. Lett. 2014. Т. 5. № 21. С. 3863–3871.
30. Jeschke G. Integration of Nanometer-Range Label-to-Label Distances and Their Distributions into Modelling Approaches // Biomolecules. 2022. Т. 12. № 10. С. 1369.
31. Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., и др. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // J. Chem. Phys. 1983. Т. 79. № 2. С. 926–935.
32. Kalinin S., Peulen T., Sindbert S., и др. A toolkit and benchmark study for

- FRET-restrained high-precision structural modeling // Nat. Methods. 2012. Т. 9. № 12. С. 1218–1225.
33. Kalinin S., Sisamakis E., Magennis S. W., и др. On the origin of broadening of single-molecule FRET efficiency distributions beyond shot noise limits // J. Phys. Chem. B. 2010. Т. 114. № 18. С. 6197–6206.
34. Kekić T., Lietard J. Sequence-dependence of Cy3 and Cy5 dyes in 3' terminally-labeled single-stranded DNA // Sci. Rep. 2022a. Т. 12. № 1. С. 14803.
35. Kekić T., Lietard J. Sequence-dependence of Cy3 and Cy5 dyes in 3' terminally-labeled single-stranded DNA // Sci. Rep. 2022b. Т. 12. С. 14803.
36. Khrenova M., Topol I., Collins J., и др. Estimating Orientation Factors in the FRET Theory of Fluorescent Proteins: The TagRFP-KFP Pair and Beyond // Biophys. J. 2015. Т. 108. № 1. С. 126–132.
37. Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions // Angew. Chem. Int. Ed. 2001. Т. 40. № 11. С. 2004–2021.
38. König S. L. B., Hadzic M., Fiorini E., и др. BOBA FRET: bootstrap-based analysis of single-molecule FRET data // PloS One. 2013. Т. 8. № 12. С. e84157.
39. Lee W., Hippel P. H. von, Marcus A. H. Internally labeled Cy3/Cy5 DNA constructs show greatly enhanced photo-stability in single-molecule FRET experiments // Nucleic Acids Res. 2014. Т. 42. № 9. С. 5967–5977.
40. Liu Y., Lilley D. M. J. Crystal Structures of Cyanine Fluorophores Stacked onto the End of Double-Stranded RNA // Biophys. J. 2017. Т. 113. № 11. С. 2336–2343.
41. Maier J. A., Martinez C., Kasavajhala K., и др. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB // J. Chem. Theory Comput. 2015. Т. 11. № 8. С. 3696–3713.
42. Michaud-Agrawal N., Denning E. J., Woolf T. B., и др. MDAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations // J. Comput. Chem. 2011. Т. 32. № 10. С. 2319–2327.
43. Moreira B. G., You Y., Owczarzy R. Cy3 and Cy5 dyes attached to

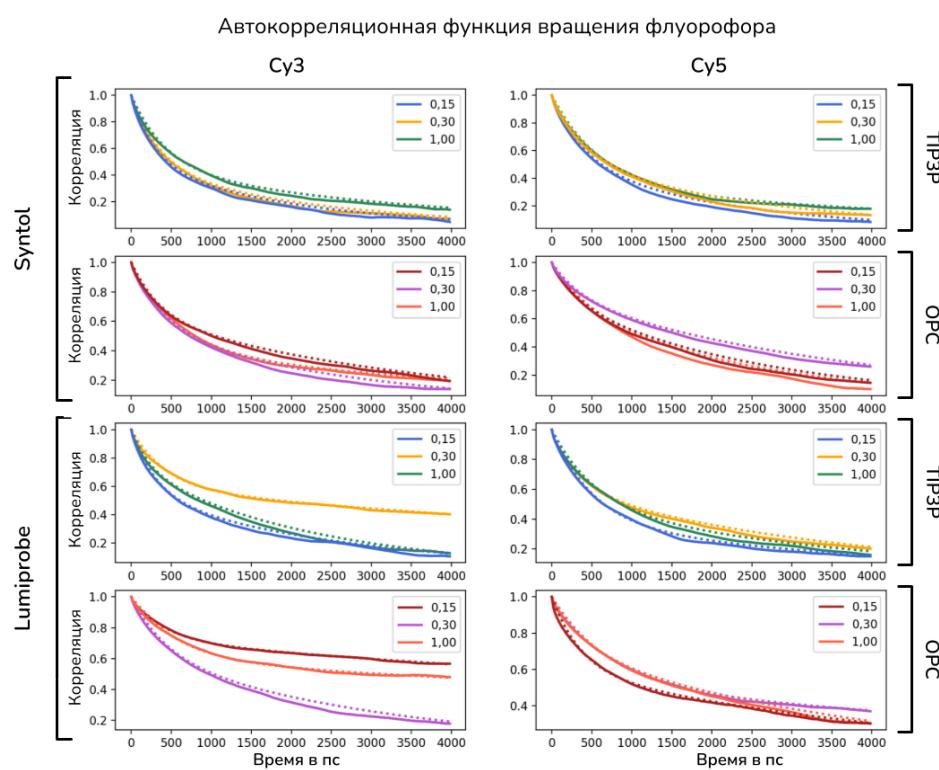
- oligonucleotide terminus stabilize DNA duplexes: Predictive thermodynamic model // Biophys. Chem. 2015. T. 198. C. 36–44.
44. Páll S., Abraham M. J., Kutzner C., и др. Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS // Solving Software Challenges for Exascale Lecture Notes in Computer Science. / под ред. S. Markidis, E. Laure. Cham: Springer International Publishing, 2015. C. 3–27.
45. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method // J. Appl. Phys. 1981. T. 52. № 12. C. 7182–7190.
46. Phillips J. C., Braun R., Wang W., и др. Scalable molecular dynamics with NAMD // J. Comput. Chem. 2005. T. 26. № 16. C. 1781–1802.
47. Rahman A. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon // Phys. Rev. 1964. T. 136. № 2A. C. A405–A411.
48. Remedios C. G. dos, Moens P. D. J. Fluorescence Resonance Energy Transfer Spectroscopy Is a Reliable «Ruler» for Measuring Structural Changes in Proteins: Dispelling the Problem of the Unknown Orientation Factor // J. Struct. Biol. 1995. T. 115. № 2. C. 175–185.
49. Rose A. S., Bradley A. R., Valasatava Y., и др. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes // Bioinforma. Oxf. Engl. 2018. T. 34. № 21. C. 3755–3758.
50. Rueda D., Walter N. G. Fluorescent Energy Transfer Readout of an Aptazyme-Based Biosensor // Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols Methods in Molecular BiologyTM. / под ред. V. V. Didenko. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. C. 289–310.
51. Saini S., Singh H., Bagchi B. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) in chemistry and biology: Non-Förster distance dependence of the FRET rate // J. Chem. Sci. 2006. T. 118. № 1. C. 23–35.
52. Sindbert S., Kalinin S., Nguyen H., и др. Accurate Distance Determination of Nucleic Acids via Förster Resonance Energy Transfer: Implications of Dye Linker Length and Rigidity // J. Am. Chem. Soc. 2011a. T. 133. № 8. C. 2463–2480.

53. Sindbert S., Kalinin S., Nguyen H., и др. Accurate Distance Determination of Nucleic Acids via Förster Resonance Energy Transfer: Implications of Dye Linker Length and Rigidity // *J. Am. Chem. Soc.* 2011b. Т. 133. № 8. С. 2463–2480.
54. Sousa da Silva A. W., Vranken W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE // *BMC Res. Notes.* 2012. Т. 5. С. 367.
55. Spiriti J., Binder J. K., Levitus M., и др. Cy3-DNA Stacking Interactions Strongly Depend on the Identity of the Terminal Basepair // *Biophys. J.* 2011. Т. 100. № 4. С. 1049–1057.
56. Takanishi C. L., Bykova E. A., Cheng W., и др. GFP-based FRET analysis in live cells // *Brain Res.* 2006. Т. 1091. № 1. С. 132–139.
57. Walter N. G. Probing RNA Structural Dynamics and Function by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 2002. Т. 11. № 1. С. 11.10.1-11.10.23.
58. Wang D.-W., Wang T., Du L., и др. Four supramolecular transition metal(II) complexes based on triazole-benzoic acid derivatives: crystal structure, Hirshfeld surface analysis, and spectroscopic and thermal properties // *Struct. Chem.* 2018. Т. 29. № 4. С. 1013–1023.
59. Wood S., Rueda D. Fluorescence Labeling of Nucleic Acids // *Encyclopedia of Biophysics* / под ред. G. C. K. Roberts. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. С. 809–812.
60. Woźniak A. K., Schröder G. F., Grubmüller H., и др. Single-molecule FRET measures bends and kinks in DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Т. 105. № 47. С. 18337–18342.
61. Yilmaz V. T., Kazak C., Ağar E., и др. Three 1,2,4-triazole derivatives containing substituted benzyl and benzylamino groups // *Acta Crystallogr. C.* 2005. Т. 61. № Pt 2. С. o101-104.
62. Yoo J., Aksimentiev A. New tricks for old dogs: improving the accuracy of biomolecular force fields by pair-specific corrections to non-bonded interactions // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. Т. 20. № 13. С. 8432–8449.

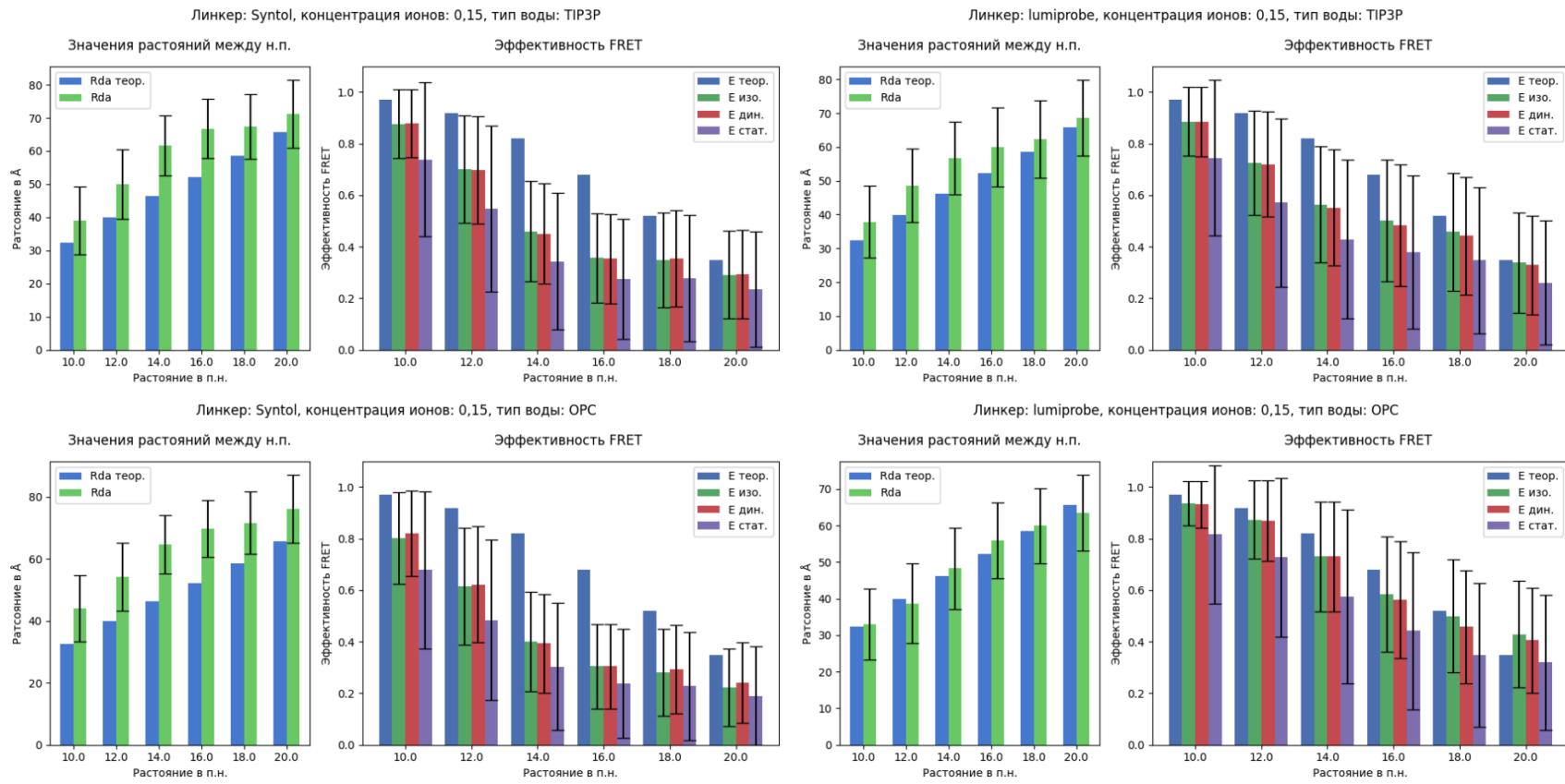
63. Zhao R., Rueda D. RNA folding dynamics by single-molecule fluorescence resonance energy transfer // Methods. 2009. T. 49. № 2. C. 112–117.

Приложение

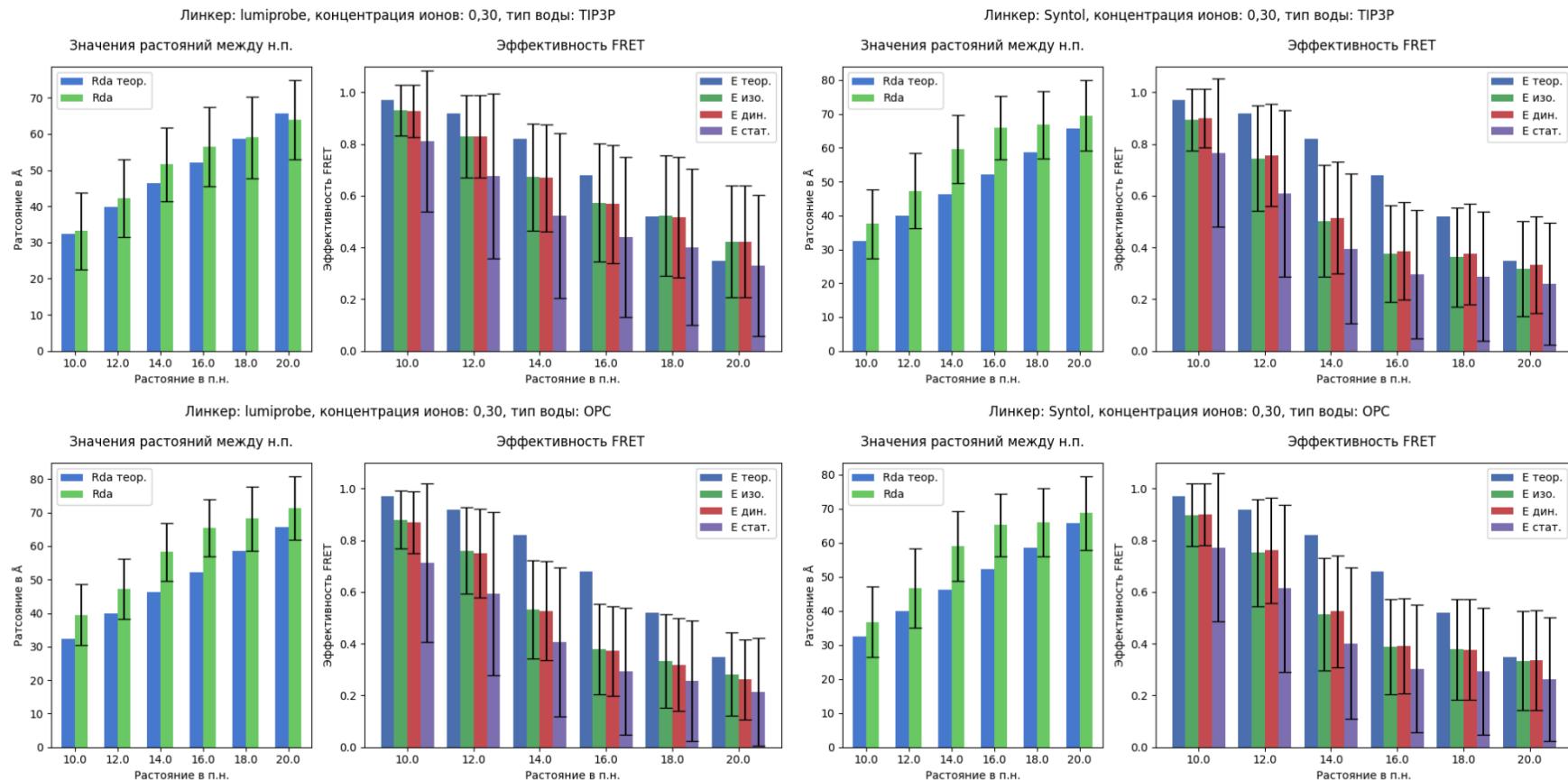
Приложение i. Таблица с перечислением параметров траекторий запущенных для одиночных меток в комплексе с ВДНК.



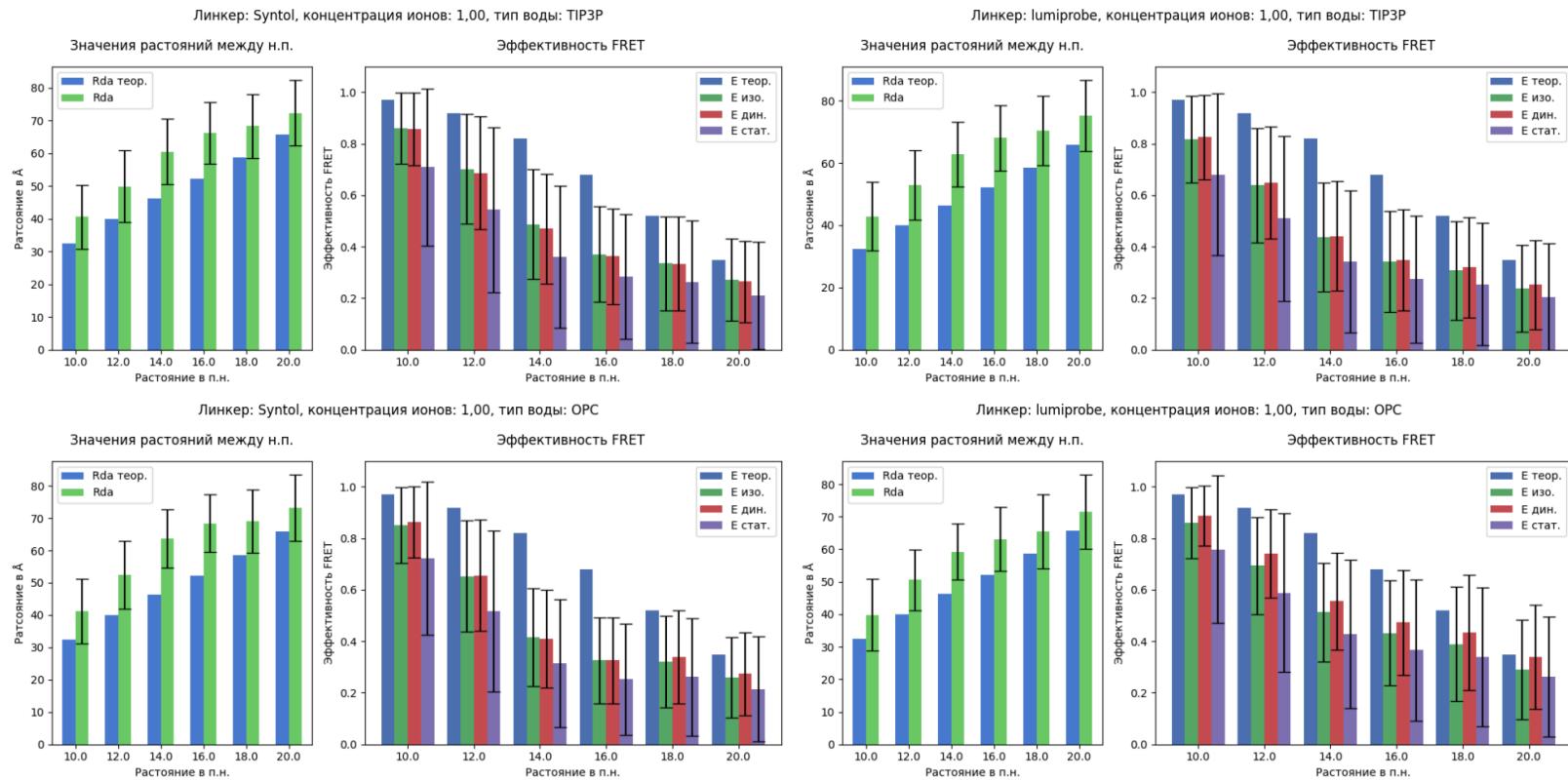
Приложение ii. Затухания автокорреляционных функций, рассчитанных для траекторий одиночных меток введенных в последовательность В ДНК.



Приложение iii. Пример данных полученных в результате молекулярного моделирования траекторий меток с концентрацией ионов 0,15 М. Где R_{DA} теор. — расстояния между нуклеотидами, R_{DA} — расстояния между центрами флуорофоров, E теор. — эффективность ФРПЭ рассчитанная с использованием расстояний R_{DA} теор. Значения эффективности E изо., E дин., E стат. рассчитаны с для расстояний R_{DA} с использованием соответствующих формул, (разделе 1.2, формулы 6, 8, 9).



Приложение iv. Пример данных полученных в результате молекулярного моделирования траекторий меток с концентрацией ионов 0,30 М. Где R_{DA} теор. — расстояния между нуклеотидами, R_{DA} — расстояния между центрами флуорофоров, Е теор. — эффективность ФРПЭ рассчитанная с использованием расстояний R_{DA} теор. Значения эффективности Е изо., Е дин., Е стат. рассчитаны с для расстояний R_{DA} с использованием соответствующих формул, (разделе 1.2, формулы 6, 8, 9).



Приложение v. Пример данных полученных в результате молекулярного моделирования траекторий меток с концентрацией ионов 1,00 М. Где R_{DA} теор. — расстояния между нуклеотидами, R_{DA} — расстояния между центрами флуорофоров, Е теор. — эффективность ФРПЭ рассчитанная с использование расстояний R_{DA} теор. Значения эффективности Е изо., Е дин., Е стат. рассчитаны с для расстояний R_{DA} с использованием соответствующих формул, (разделе 1.2, формулы 6, 8, 9, формулы 6, 8, 9).