

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра биоинженерии

Фескин Павел Григорьевич

ДИЗАЙН ПРОГРАММИРУЕМЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научный руководитель:

профессор, д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН

А.К. ШАЙТАН

Москва – 2025 г.

Оглавление

1. Введение.....	4
2. Обзор литературы.....	6
2.1. Механизмы кооперативности в молекулярных взаимодействиях	6
2.2. Кооперативные взаимодействия нуклеиновых кислот	15
2.3. Подавление экспрессии генов посредством комплементарного связывания олигонуклеотидов с мРНК.....	20
2.4. Кооперативные эффекты в механизмах регуляции экспрессии.. ..	25
3. Материалы и методы.....	27
3.1. Анализ кинетики равновесных взаимодействий молекулярных систем олигонуклеотидов.....	27
3.2. Дизайн олигонуклеотидов, предсказание вторичной структуры и термодинамических параметров	28
3.3. Метод гель-электрофореза для исследования поведения системы олигонуклеотидов	29
3.4. Получение кривых плавления систем олигонуклеотидов с использованием SYBR green.....	31
3.5. Анализ кривых связывания олигонуклеотидов посредством измерения флуоресценции меченных олигонуклеотидов.....	32
3.6. Анализ кривых связывания олигонуклеотидов методом сдвига электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле	33
4. Результаты.....	35
4.1. Теоретический анализ методами молекулярного моделирования и химической кинетики поведения молекулярных	

систем на основе олигонуклеотидов, при взаимодействии которых проявляются кооперативные эффекты	35
4.2. Разработка системы взаимодействующих олигонуклеотидов, проявляющих эффект кооперативности в заданных диапазонах концентраций и при заданных условиях	39
4.3. Экспериментальный анализ поведения молекулярной системы на основе олигонуклеотидов.....	42
4.4. Проверка способности спроектированных олигонуклеотидов к кооперативному взаимодействию	45
5. Обсуждение.....	48
6. Выводы	54
7. Список литературы	55
8. Приложения	59

1. Введение

Современная биология стремится не только к изучению существующих природных систем, но и к созданию новых биологических конструкций с заданными функциями. Одной из ключевых задач в этой области является программирование молекулярных взаимодействий для точного контроля клеточных процессов, таких как регуляция экспрессии генов. Работа над подобными задачами лежит в основе синтетической биологии, которая использует инженерные подходы для проектирования и создания новых биологических систем или модификации существующих.

Синтетическая биология имеет огромный потенциал в решении широкого спектра задач: от разработки новых методов терапии и диагностики до создания биокомпьютеров и усовершенствованных биотехнологий. Управление экспрессией генов, являющееся одной из центральных целей этой науки, позволяет не только настраивать клеточные функции, но и создавать молекулярные системы для выполнения сложных логических операций, которые могут применяться в медицинских и промышленных технологиях.

Особую роль в этой области играют ДНК/РНК-нанотехнологии, которые используют свойства нуклеиновых кислот для конструирования программируемых молекулярных устройств. Благодаря способности ДНК и РНК образовывать стабильные и предсказуемые структуры за счёт комплементарного спаривания оснований, стало возможным создание сложных наноструктур, молекулярных машин и регуляторных элементов. Эти технологии демонстрируют высокую специфичность, что делает их важным инструментом для реализации систем доставки лекарств, регуляции генов и диагностики заболеваний.

Одной из ключевых задач при создании таких систем является повышение их специфичности и эффективности. Принцип кооперативности, заключающийся в том, что взаимодействие одного компонента с мишенью усиливает вероятность связывания других компонентов, позволяет достичь высокой точности и устойчивости молекулярных конструкций. Однако существующие кооперативные системы требуют дальнейшей оптимизации, чтобы раскрыть их полный потенциал.

Цель данной работы состоит в разработке и исследовании усовершенствованных систем регуляции экспрессии генов на основе олигонуклеотидных последовательностей, способных к кооперативным взаимодействиям, и тестирование таких систем экспериментальными методами. В рамках исследования были поставлены следующие 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.

Разработанная система базируется на кооперативном связывании синтетических олигонуклеотидов с матрицей, что может обеспечить высокую специфичность и эффективность регуляции. Предложенный подход открывает новые возможности для программирования молекулярных взаимодействий и разработки высокоточных систем контроля экспрессии генов.

2. Обзор литературы

2.1. Механизмы кооперативности в молекулярных взаимодействиях

Аллостерическая регуляция является основополагающим механизмом контроля активности многих биологических макромолекул, включая ферменты, неферментативные белки и рибозимы. Связывание эффекторных молекул в аллостерических сайтах приводит к изменению конформации макромолекулы, что, в свою очередь, модифицирует ее активность. Такой механизм позволяет гибко и точно регулировать функциональное состояние макромолекул, обеспечивая адаптивное управление биохимическими процессами. Аллостерическая регуляция делится на два типа:

- Гетеротропная аллостерия — взаимодействие молекулы с эффектором, отличным от основного субстрата. Например, связывание АТФ или ионов с ферментом, что меняет его конформацию и активность.
- Гомотропная аллостерия — регуляция, при которой сам субстрат выступает эффектором, связываясь с несколькими сайтами и влияя на их взаимную активность. Именно этот тип аллостерии обычно называют кооперативностью.

Кооперативность возникает, когда связывание одной молекулы лиганда с биополимером изменяет его структуру, усиливая (положительная кооперативность) или ослабляя (отрицательная кооперативность) сродство к последующим лигандам. Классический пример — гемоглобин: присоединение кислорода к одной из четырёх субъединиц белка индуцирует конформационные изменения, повышающие сродство остальных субъединиц к кислороду. Это позволяет гемоглобину эффективно насыщаться кислородом в лёгких и высвобождать его в тканях.

Механизмы аллостерической регуляции позволяют живым организмам обеспечивать динамический контроль — быстрый ответ на изменения концентрации лигандов (например, кислорода, метаболитов), амплификацию

сигнала, когда слабые взаимодействия в аллостерических сайтах могут вызывать значительные изменения активности всей молекулы и высокую селективность.

История явления кооперативности начинается с изучения кривых насыщения гемоглобина кислородом в начале XX-го века датским ученым Кристианом Бором (Bohr, 1904). Результатом его работы стало открытие эффекта, названного его именем — эффекта Бора. Он обнаружил, что сродство гемоглобина к кислороду зависит от кислотно-основного состояния среды: при повышении концентрации углекислого газа (CO_2) и снижении pH (увеличении кислотности) гемоглобин менее эффективно связывает кислород. Это означает, что в тканях, где происходит активный метаболизм и выделяется CO_2 , гемоглобин легче отдаёт кислород, обеспечивая его доставку к клеткам. В лёгких же, где концентрация CO_2 ниже и pH выше, гемоглобин связывает кислород более эффективно. Одним из результатов его исследований был нетипичный вид кривых связывания кислорода с гемоглобином, имеющих сигмоидальную форму, в отличие от предполагаемой гиперболической функции, характерной для родственного белка миоглобина, также способного к связыванию кислорода (Рис. 2.1.1).

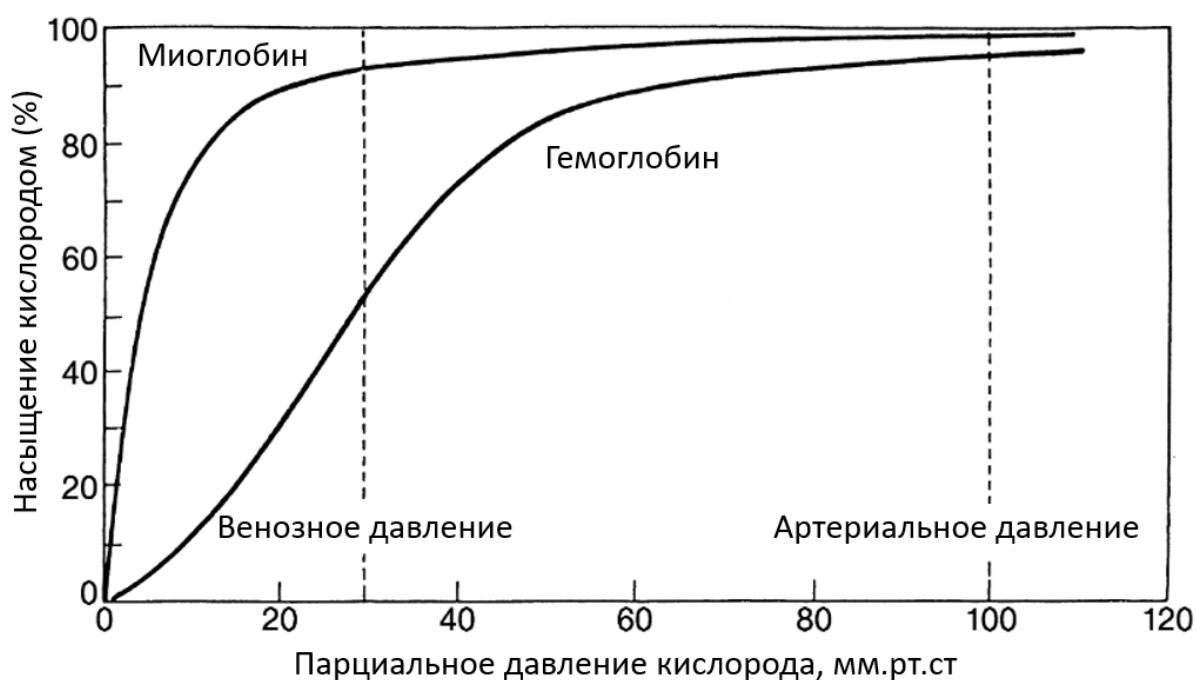
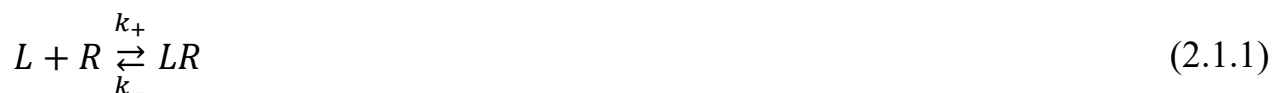


Рис. 2.1.1. Кривые насыщения кислородом гемоглобина и миоглобина.

Переведено и адаптировано (Perutz, 1978).

Для объяснения данного феномена необходимо прибегнуть к математическому описанию связывания лигандов с макромолекулами. Связывание лиганда (L) с рецептором (R) является обратимым, описываемое следующим уравнением:



где

k_+ – константа скорости прямой реакции;

k_- – константа скорости обратной реакции;

LR – комплекс лиганда и субстрата.

Применяя закон действующих масс, константа диссоциации (K_d) будет равна:

$$K_d = \frac{k_-}{k_+} = \frac{[L][R]}{[LR]} \quad (2.1.2)$$

где

$[L]$ – концентрация свободного лиганда L;

$[R]$ – концентрация свободного рецептора R;

$[LR]$ – концентрация комплекса лиганда и рецептора LR.

Константа диссоциации (K_d) в данной реакции имеет размерность концентрации (М), причем чем меньше K_d , тем больше сродство лиганда к рецептору.

Так как в эксперименте известны только изначальные концентрации веществ, согласно закону сохранения масс, они связываны со свободными концентрациями следующим образом:

$$\begin{aligned} [L]_0 &= [L] + [LR] \\ [R]_0 &= [R] + [LR] \end{aligned} \quad (2.1.3)$$

где

$[L]_0$ – начальная концентрация лиганда;

$[R]_0$ – начальная концентрация рецептора.

Удобным параметром измерения является доля связанного лиганда с рецептором (F), используя уравнения (2.1.2) и (2.1.3) получают выражение для F:

$$F = \frac{[LR]}{[R]_0} = \frac{[L]}{K_d + [L]} \quad (2.1.4)$$

Данное уравнение (2.1.4) было создано для случая связывания лиганда с макромолекулой, имеющей только один сайт связывания. Оно описывает зависимость концентрации F от свободной концентрации лиганда. При увеличении $[L]$ доля связанного лиганда увеличивается, пока не выходит на плато, достигая максимума, соответствующего числу сайтов связывания макромолекулы (Рис. 2.1.2А). Обратим внимание, что согласно формуле (2.1.4) K_d будет равно концентрации, при которой происходит полунасыщение рецептора, что может быть определено графическим путем.

Если на макромолекуле расположено более одного сайта связывания, причем связывание одного лиганда никак не влияет на связывания следующих, иными словами они связываются с макромолекулой независимо, то в случае равенства K_d лигандов с каждым из сайтов связывания имеет место следующая формула (Langmuir, 1916):

$$F = \frac{[L]_{bound}}{n[R]_0} = \frac{[L]}{K_d + [L]} \quad (2.1.5)$$

$$[L]_{bound} = [LR] + 2[L_2R] + 3[L_3R] + n[L_nR] \quad (2.1.6)$$

где

n – число сайтов связывания на одной макромолекуле;

$[L]_{bound}$ – концентрация связанного лиганда.

В данном случае $[L]_{bound} \neq [LR]$, так как необходимо учесть все имеющиеся сайты связывания.

Прямое представление данных связывания (Рис. 2.1.2А) является важным первым шагом в анализе, поскольку оно позволяет избежать искажений, связанных с пересчётом данных, как это происходит в линейных диаграммах. Однако при таком подходе возникают сложности с определением насыщения, которое часто недооценивается, так как теоретически насыщение достигается только при бесконечной концентрации лиганда. Так как в экспериментальных данных всегда есть некоторый разброс, это затрудняет точное определение константы связывания и числа сайтов связывания, особенно если насыщение не достигается. Нелинейный регрессионный анализ позволяет улучшить точность расчётов, но даже в этом случае слабые отклонения от ожидаемой функции могут быть скрыты за разбросом данных, что затрудняет выявление альтернативных механизмов связывания.

Одним из альтернативных нелинейных методов является построение в полулогарифмической шкале, в которой степень насыщения F строится в зависимости от логарифма концентрации лиганда, что позволяет лучше визуализировать данные при работе с широким диапазоном концентраций (Рис. 2.1.2Б). В таком представлении кривая имеет сигмоидальную форму.

Для анализа данных связывания часто используется график Скатчарда (Scatchard, 1949), который строится путём преобразования уравнения (2.1.5) и представления зависимости (2.1.7).

$$\frac{\bar{F}}{[L]} = \frac{n}{K_d} - \frac{\bar{F}}{K_d} \quad (2.1.7)$$

где

\bar{F} – доля связанного лиганда, ненормированная на n .

Этот график представляет собой прямую линию, пересекающую ось абсцисс в точке n и ось ординат в точке $\frac{n}{K_d}$, что делает его удобным для определения этих параметров (Рис. 2.1.2В). С помощью графика Скатчарда также хорошо видны девиации от линейного поведения переменных, таким образом позволяя определять иные механизмы связывания, которые не так хорошо видны в прямых координатах.

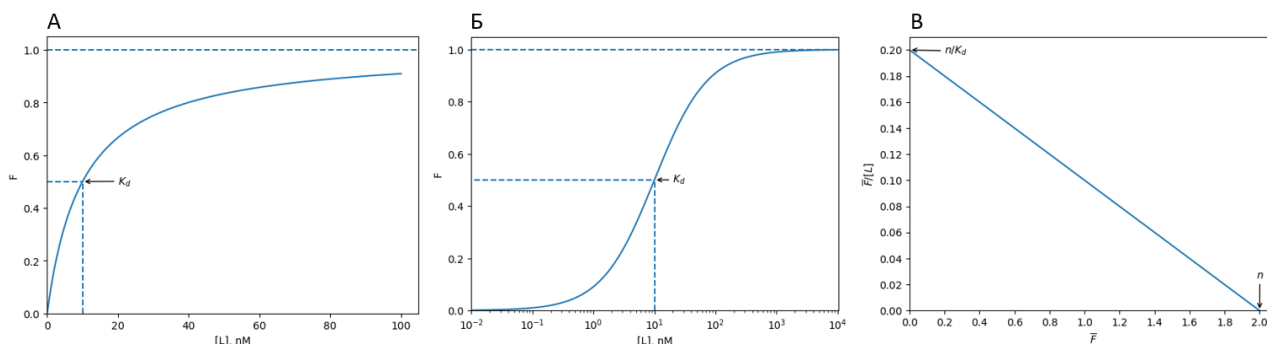


Рис. 2.1.2. Кривые связывания лигандов в различных координатах.

Используемые параметры: $n = 2$, $K_d = 10$ nM, $[R]_0 = 1$ nM. А) Прямые координаты. Б) Полулогарифмическая шкала. Верхняя пунктирная линия обозначает максимальное насыщение рецептора. Стрелкой показаны координаты положения K_d . В) Координаты Скатчарда. Стрелками указаны точки пересечения линии с осями абсцисс и ординат, соответствующие значениям указанных параметров.

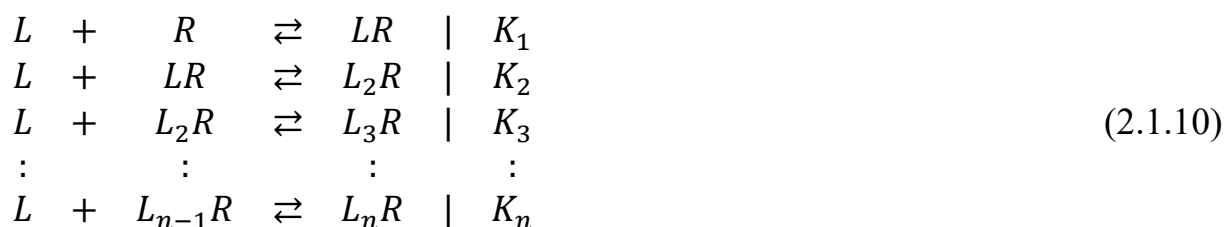
Возвращаясь к кривым связывания кислорода гемоглобином (Рис. 2.1.1) первую попытку объяснить сигмоидальный вид кривой, в отличие от ожидаемой гиперболической, как в случае миоглобина, согласно вышеупомянутому изложению, предпринял Арчибальд Хилл (Hill, 1910). Он предположил, что с гемоглобином может связаться не одна, а несколько молекул кислорода одновременно (структура гемоглобина тогда еще не была известна). Тогда уравнения (2.1.1) и (2.1.5) можно преобразовать следующим образом:



$$F = \frac{[L]_{bound}}{n[R]_0} = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n} \quad (2.1.9)$$

Данное уравнение действительно объясняет сигмоидальную форму кривой насыщения (Рис. 2.1.1), но попытки определить число сайтов связывания давали нецелые числа, что поставило под сомнение верность данной формулы .

Следующим шагом в развитии теории кооперативности стали открытия структуры гемоглобина Эдером (Adair, 1925). Он предположил, что гемоглобин имеет 4 сайта связывания ($n = 4$). В отличие от уравнения (2.1.8), Эдер установил, что молекулы кислорода связываются с гемоглобином последовательно, а их одновременное связывание – чрезмерное упрощение. Таким образом, в данном случае речь идет о наборе уравнений:



Из определения кооперативности следует, что связывание одного лиганда облегчает присоединение следующего. В системе уравнений (2.1.10) это обеспечивается за счет того, что K_d каждой последующей реакции уменьшается по сравнению с предыдущей. Уравнение Хилла представляет собой предельный случай кооперативности, в котором связывание одного лиганда моментально

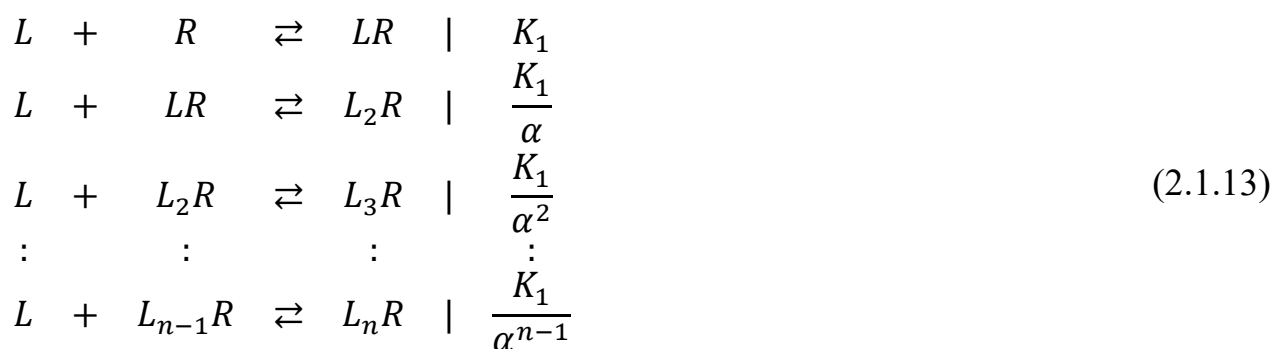
позволяет связаться следующему. Так как в природе практически не встречается случаев «идеальной кооперативности», связывание одного лиганда лишь незначительно повышает шансы связаться следующему, то в ходе фиттирования экспериментальных кривых уравнением Хилла получаются дробные n , не достигающие истинного количества сайтов связывания. Уравнение Эдера (2.1.11) по сути представляет из себя обобщенный случай уравнения (2.1.5), причем для K_d каждой реакции свойственно следующее выражение (2.1.12):

$$\bar{F} = \frac{\frac{[L]}{K_1} + \frac{2[L]^2}{K_1 K_2} + \frac{3[L]^3}{K_1 K_2 K_3} + \dots + \frac{n[L]^n}{K_1 K_2 K_3 \dots K_n}}{1 + \frac{[L]}{K_1} + \frac{[L]^2}{K_1 K_2} + \frac{[L]^3}{K_1 K_2 K_3} + \dots + \frac{[L]^n}{K_1 K_2 K_3 \dots K_n}} \quad (2.1.11)$$

$$K_1 > K_2 > K_3 > \dots > K_n \quad (2.1.12)$$

Несмотря на то, что формально данные уравнения описывают поведение кривых связывания, механизм кооперативности из них ясен не до конца.

В 1935 году Полинг усовершенствовал данную модель (Pauling, 1935). Он принял, что сайты связывания макромолекулы идентичны и имеют одинаковую K_d (причем $K_1 = \frac{K_d}{2}$, т.к. оба сайта связывания доступны для лиганда), но связывание лиганда обеспечивает стабилизирующий эффект на оставшиеся сайты, усиливая их аффинность к лиганду. Данный эффект он обозначил как фактор взаимодействия α , одинаковый для каждой стадии реакции. Тогда реакцию можно записать следующим образом:



а уравнение (2.1.11) значительно упрощается (2.1.14).

$$\bar{F} = \frac{\frac{[L]}{K_1} + \frac{2\alpha[L]^2}{K_1^2} + \frac{3\alpha^3[L]^3}{K_1^3} + \dots + \frac{n\alpha^{n!}[L]^n}{K_1^n}}{1 + \frac{[L]}{K_1} + \frac{\alpha[L]^2}{K_1^2} + \frac{\alpha^3[L]^3}{K_1^3} + \dots + \frac{\alpha^{n!}[L]^n}{K_1^n}} \quad (2.1.14)$$

При $\alpha = \frac{1}{4}$ кооперативность отсутствует, так как уравнение будет эквивалентно формуле (2.1.5) при замене $K_1 = \frac{K_d}{2}$. При $\alpha > \frac{1}{4}$ наблюдается положительная кооперативность – каждая последующая константа диссоциации стадии реакции меньше предыдущей, связывание одного лиганда облегчает связывание следующих. При $\alpha < \frac{1}{4}$ характерная отрицательная кооперативность, такой случай, когда связывание лиганда мешает связываться следующим. Визуализация эффектов кооперативности при разных α представлена на Рис. 2.1.3.

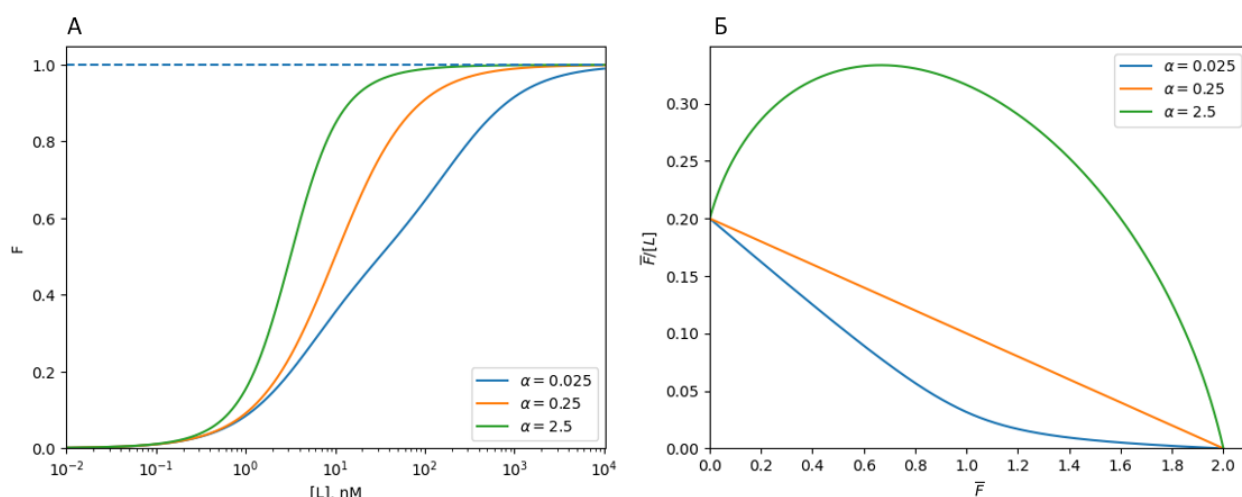


Рис. 2.1.3. Эффекты кооперативности на полулогарифмическом шкале (А) и графике Скэтчарда (Б). Используемые параметры: $n = 2$, $K_d = 10$ nM, $[R]_0 = 1$ nM.

В этой главе мы рассмотрели кооперативность как важный механизм, регулирующий взаимодействия между макромолекулами. Кооперативные процессы позволяют живым системам динамически адаптироваться к изменениям в среде, обеспечивая эффективную передачу сигнала и оптимизацию метаболических функций. Пример гемоглобина демонстрирует, как кооперативность способствует повышению селективности и эффективности

молекулярных взаимодействий. Таким образом, понимание кооперативности раскрывает перспективы для разработки новых молекулярных решений в различных областях науки.

2.2. Кооперативные взаимодействия нуклеиновых кислот

Кооперативность в контексте ДНК и РНК проявляется через согласованные взаимодействия между нуклеиновыми кислотами, которые обеспечивают стабильность, динамику и функциональность биомолекулярных систем. Эти принципы легли в основу развития нанотехнологий, где программируемость ДНК/РНК позволяет создавать сложные структуры с точностью до нанометра. В данной главе рассматриваются ключевые аспекты кооперативности, их применение в нанотехнологиях, а также перспективы этой области.

В отличие от белковых молекул, специфичные взаимодействия между нуклеиновыми кислотами обеспечиваются за счет образования водородных связей между азотистыми основаниями нуклеотидов и π -стэкинга, за счет перекрывания π -орбиталей соседних оснований, стабилизирующих двойную спираль. Эти взаимодействия носят кооперативный характер: разрыв одной пары оснований ослабляет соседние, что объясняет резкое «плавление» ДНК при денатурации, а не постепенное расплетание (Zeng, Montrichok, Zocchi, 2004). Термодинамика и кинетика процессов гибридизации также отражают кооперативность. Формирование дуплекса экзотермично, но требует преодоления энтропийных потерь, связанных с упорядочиванием цепей. Интересно, что гибридизация часто начинается с образования коротких «затравочных» участков, которые служат ядрами для последующего быстрого спаривания цепей (Hertel и др., 2022; Ashwood и др., 2023).

В отличие от белков, чья пространственная организация определяется сложными взаимодействиями аминокислотных остатков и трудно поддается точному прогнозированию, нуклеиновые кислоты подчиняются принципу однозначной комплементарности. Это позволяет заранее проектировать и

моделировать их структуру с высокой точностью, используя программные инструменты, такие как NUPACK (Zadeh и др., 2011). Кроме того, ДНК и РНК могут образовывать стабильные шпильки, петли, псевдоузлы и другие более сложные наноструктуры, что делает их удобными строительными блоками для создания молекулярных машин, биосенсоров и систем программируемого контроля над генетическими процессами. Еще одним преимуществом является их химическая модифицируемость, позволяющая вводить дополнительные функциональные группы для повышения стабильности, связываемости или специфичности взаимодействий.

Наглядным примером применения кооперативности являются ДНК-сенсоры. (Simon и др., 2014a). ДНК-сенсор представляет из себя шпильку, содержащую два одинаковых сайта связывания, на концах которой пришиты флуорофор и гаситель соответственно. В зависимости от расположения сайтов связывания были предложены два типа дизайна: асимметричный и симметричный (Рис. 2.2.1). В первом случае один сайт связывания находится в петле и ножке, а второй частично захватывает и ножку, и хвост. Во втором случае сайты связывания находятся симметрично относительно середины петли и захватывают оставшуюся область половины петли и ножки. Оба дизайна показали большую чувствительность по сравнению с сенсором, имеющим один сайт связывания.

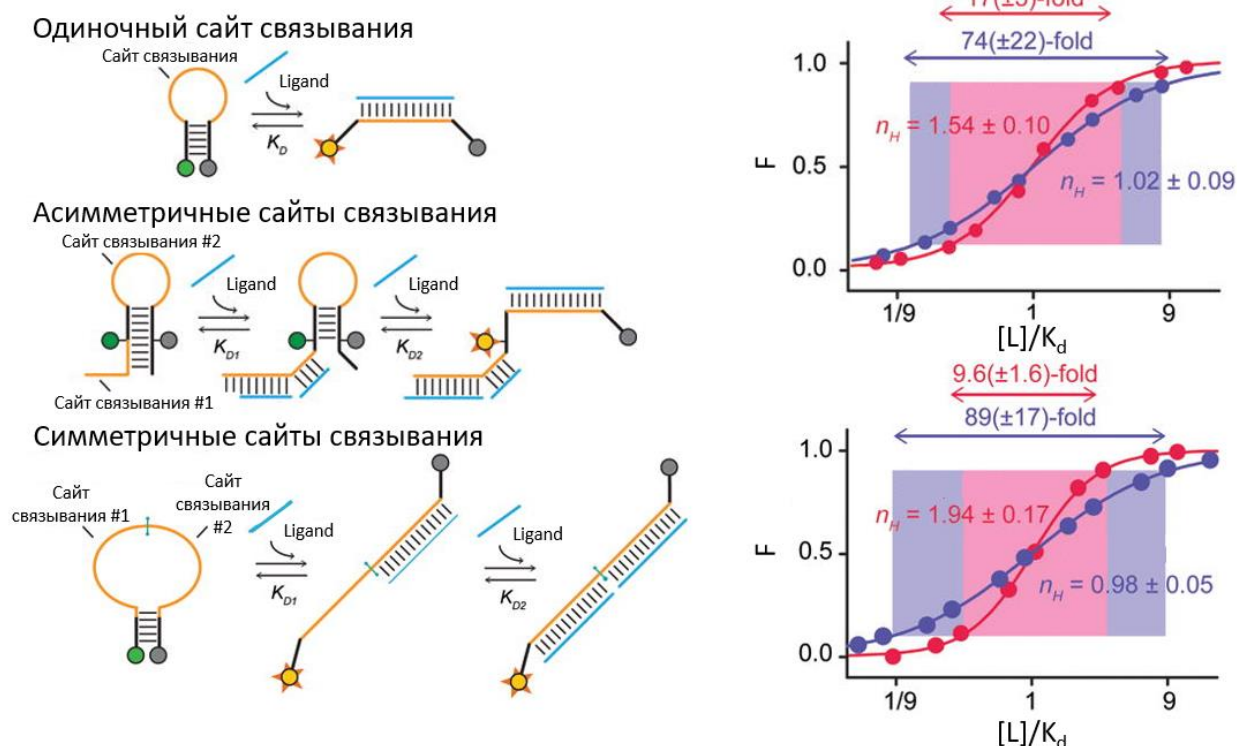


Рис. 2.2.1. Эффекты кооперативности в разработке ДНК-сенсоров. (Сверху слева). Дизайн ДНК-сенсора с одиночным сайтом связывания. (Посередине слева). Асимметричный дизайн ДНК-сенсора с двумя сайтами связывания. (Снизу слева). Симметричный дизайн ДНК-сенсора с двумя сайтами связывания. (Сверху справа) сравнение кривых связывания ДНК-сенсора с одиночным сайтом связывания (синий) и ДНК-сенсора с двумя асимметричными сайтами связывания (красный). (Снизу справа) сравнение кривых связывания ДНК-сенсора с одиночным сайтом связывания (синий) и ДНК-сенсора с двумя симметричными сайтами связывания (красный). На графиках показаны значения коэффициентов Хилла. Переведено и адаптировано (Simon и др., 2014a).

Та же группа исследователей предложила обобщенную стратегию кооперативного ДНК-сенсора, основанного на переходах от неупорядоченного к упорядоченному состоянию одноцепочечного ДНК-сенсора (Simon и др., 2014b). Сенсор имеет два тандемных сайта связывания лиганда, разделенных пополам, но связанных между собой длинной неупорядоченной петлей (Рис. 2.2.2А). Сенсор может находиться в состояниях Т (Tensed) – когда молекула находится в

клубковой конформации и полностью неупорядочена, или же в состоянии R (Relaxed), когда части сайтов связывания сближены друг с другом. В состоянии T связывание первого лиганда энергетически невыгодно, так как требует сближения в пространстве частей сайтов узнавания, но после связывание первого лиганда, связывание второго значительно упрощается, так как половины свободного сайта связывания уже сближены друг с другом (состояние R). Увеличивая длину неупорядоченной петли (таким образом уменьшая долю R-состояния за счет уменьшения K_S) исследователи добились увеличения чувствительности сенсора. Причем авторы продемонстрировали, что данный подход может быть использовать для любого типа ДНК-сенсоров (Рис. 2.2.2Б).

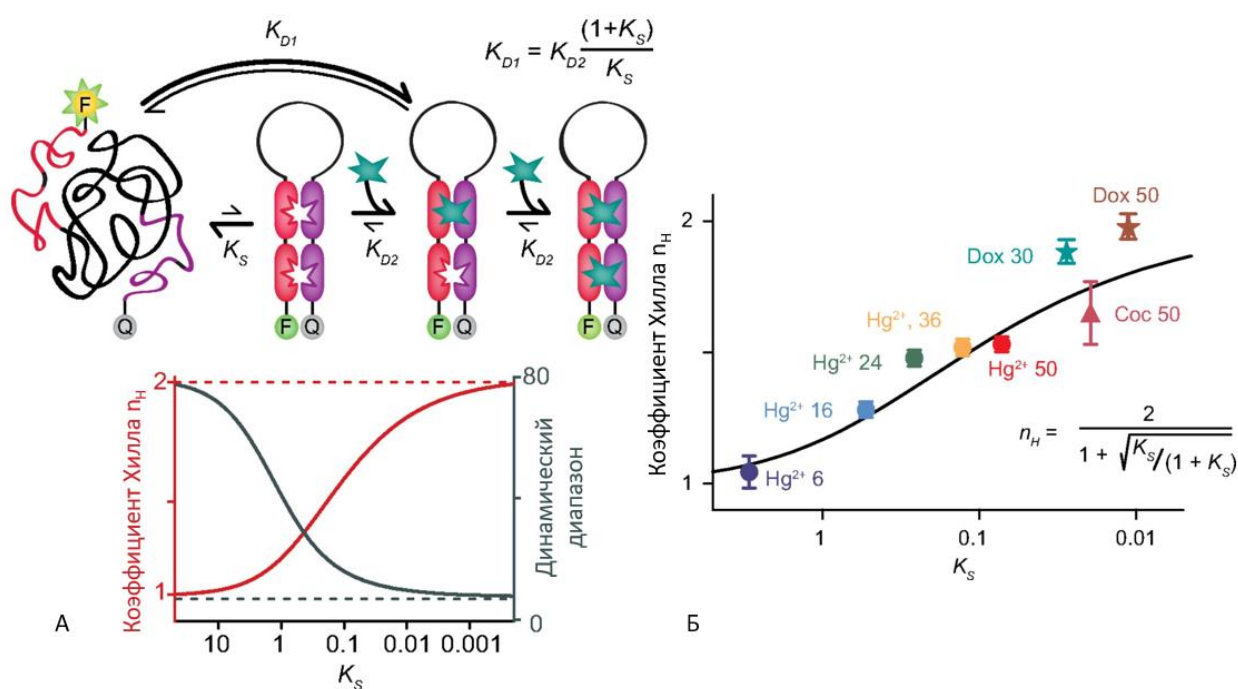
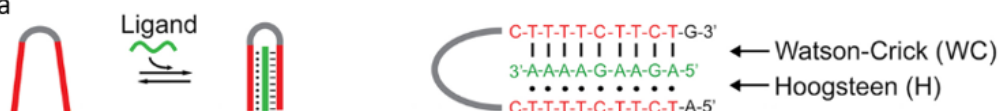


Рис. 2.2.2. (А) Обобщенная стратегия для дизайна кооперативного ДНК сенсора. (Б) Зависимость коэффициента Хилла в зависимости от величины K_S , отражающей долю сенсора в R-состоянии. Данные приведены для различных мишеней, цифра справа от названия мишени обозначает длину неупорядоченной петли в нуклеотидах. Переведено и адаптировано (Simon и др., 2014b).

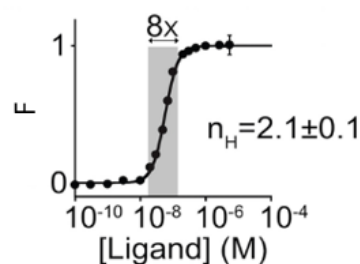
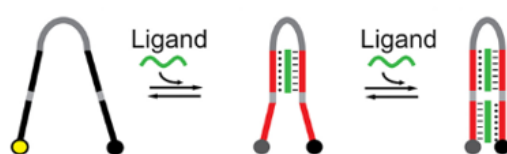
Вдохновившись традиционным примером кооперативности гемоглобина, Mariottini и др. решили повторить основные свойства данного белка, но

используя ДНК (Mariottini и др., 2017). Авторы разработали сенсор, состоящий из двух тандемных сайтов связывания, разделенных небольшой петлей, представляющий из себя своего рода зажим. Последовательность сайта узнавания является триплекс-образующий, поэтому при наличии комплементарного лиганда образуется триплекс. Механизм связывания сходен с примером Simon и др, также присутствуют Т и R состояния сенсора, доли которых меняются после связывание первого лиганда с сенсором (Рис. 2.2.3). Авторам также удалось продемонстрировать эффекты Бора и Холдейна, характерные для гемоглобина, так как формирование триплекса является рН-зависимым. Так, кооперативность и наивысшая чувствительность проявлялась при щелочных рН. Работа сенсора также является температурно-зависимым в силу денатурации триплекса в диапазоне 25-45°C. Помимо этого, для нанойстройства возможно управление через гетеротропную аллостерию, при связывании адаптера с петлевой частью сенсора, наноустройство теряет свою афинность к лиганду.

Механизм формирования зажим-подобного триплекса



Кооперативное ДНК-наноустройство



Некооперативное ДНК-наноустройство

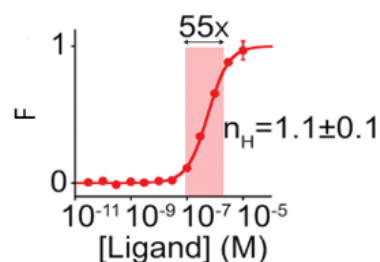


Рис. 2.2.3. Сверху показана структура ДНК-сенсора. Снизу сравнение кривых связывания кооперативного (2 сайта связывания) и некооперативного (1 сайт связывания) ДНК-нанопустройств. Переведено и адаптировано (Mariottini и др., 2017).

Таким образом, кооперативные взаимодействия играют важную роль в гибридизации нуклеиновых кислот, обеспечивая прочные комплементарные взаимодействия. Причем природные свойства полимеров нуклеиновых кислот позволяют разрабатывать нанопустройства на их основе со свойствами повышенной кооперативности.

2.3. Подавление экспрессии генов посредством комплементарного связывания олигонуклеотидов с мРНК

Подавление экспрессии генов с помощью олигонуклеотидов является одним из подходов направленной регуляции биосинтеза белка. Данный подход основан на принципе комплементарного взаимодействия дезоксирибо/рибоолигонуклеотидов с матричной РНК (мРНК), что приводит к блокированию трансляции или деградации целевой мРНК. В зависимости от типа участвующих олигонуклеотидов механизм ингибирования может различаться, однако ключевым этапом всегда является специфическое связывание с мРНК. К естественным механизмам клеточного посттранскрипционного контроля относится РНК-интерференция – подавление экспрессии генов за счет образования смысл-антисмысловых пар РНК. В РНК-интерференции участвует два типа некодирующих РНК:

1. Микро-РНК (миРНК). Представляют из себя одноцепочечные малые некодирующие РНК-цепи, длиной обычно 21-23 нуклеотида;
2. Короткие интерферирующие РНК (киРНК) – двуцепочечные некодирующие РНК молекулы длиной 20-24 п.н с выступающими двумя нуклеотидами на каждом конце.

Функциональные пути РНК-интерференции показан на рис. 2.3.1. РНК-интерференция инициируется белком Dicer, нарезающим длинные фрагменты дцРНК на короткие фрагменты, которые расплетаются на антисмысловую и смысловую цепи. Антисмысловая цепь внедряется в комплекс RISC, который впоследствии связывается с мРНК. Последовательность миРНК обычно закодирована в геноме и синтезируется в виде шпилечного прекурсора, который перед выходом из ядра процессируется белком Drosha (MacFarlane, Murphy, 2010). В отличие от миРНК, киРНК имеет экзогенное происхождение и поступает в клетки в виде длинной дцРНК, которая уже в цитоплазме нарезается на короткие фрагменты с помощью белка Dicer (Dana и др., 2017). МиРНК имеет неполную комплементарность к таргетной мРНК и часто вовлечена в регуляцию сразу нескольких мишеней, в то время как киРНК полностью комплементарна одной мишени и вызывает ее каталитическое разрезание.

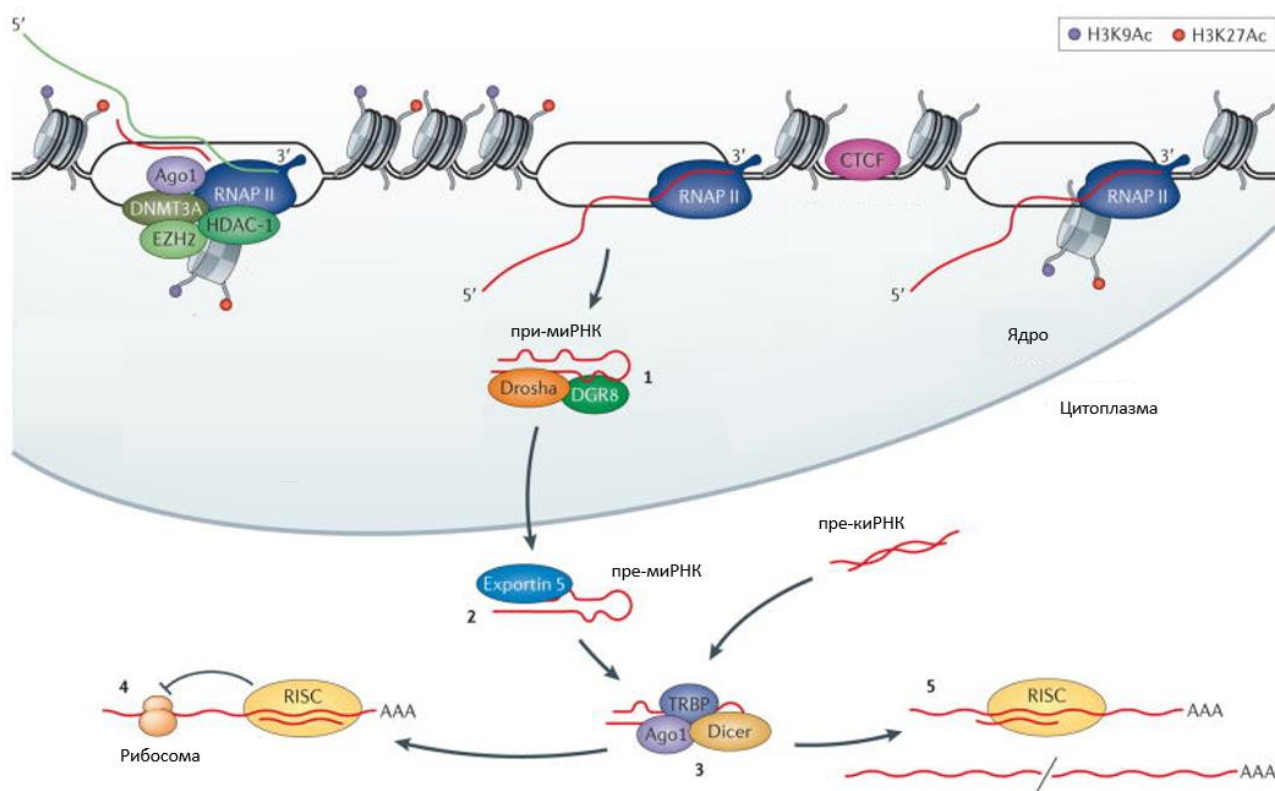


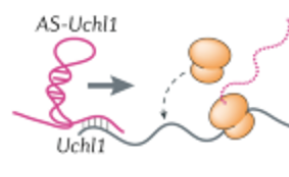
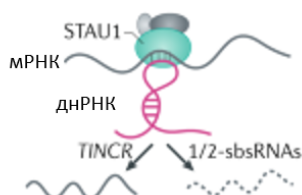
Рис. 2.3.1. Функциональные пути РНК-интерференции. 1. Синтез прекурсора миРНК в виде шпилечной структуры и ее взаимодействие с белками Drosha и DGR8. 2. Транспорт процессированной пре-миРНК в цитоплазму с помощью белка Exportin 5. 3. Связывание пре-миРНК или пре-киРНК с комплексом

белков Ago1, TRBP и Dicer и нарезание предшественников на короткие двуцепочечные фрагменты нужного размера. 4. Загрузка одноцепочечного антисенсового фрагмента миРНК в комплекс RISC, его связывание с таргетной мРНК и подавление трансляции. 5. Загрузка одноцепочечного антисенсового фрагмента киРНК в комплекс RISC, его связывание с таргетной мРНК и разрезание транскрипта. Переведено и адаптировано (Morris, Mattick, 2014).

В контексте РНК-интерференции следует упомянуть длинные некодирующие РНК (днРНК), также играющие роль в регуляции экспрессии генов. К днРНК относятся некодирующие РНК длиной больше 200 нуклеотидов. В отличие от коротких некодирующих РНК, днРНК также как мРНК могут быть кэпированы, полиаденилированы и сплайсированы. Большая часть днРНК функционирует и остается в ядре, тем не менее, часть поступает в цитоплазме сходным с мРНК путем. Механизмы регуляции экспрессии с помощью днРНК показаны на рис. 2.3.2.

А. Регуляция экспрессии через комплементарное связывание с таргетной РНК

А1. Staufen-опосредованная мРНК деградация



А2. Модуляция мРНК трансляции

Б. Регуляция экспрессии посредством конкурентного связывания

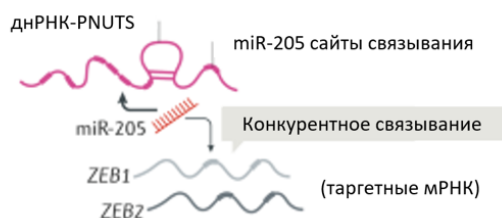


Рис. 2.3.2. Роль днРНК в регуляции экспрессии. А. днРНК могут напрямую взаимодействовать с РНК через комплементарное связывание. А1. ДнРНК влияют на устойчивость мРНК посредством формирования дуплекса при связывании с мРНК, что рекрутирует белок STAU1, основной компонент Staufen-опосредованной мРНК деградации. А2. ДнРНК при связывании с мРНК

обеспечивает ассоциацию полисомы с мРНК и трансляцию. Б. Некоторые многочисленные днРНК действуют как конкурентные ингибиторы. Такие днРНК имеют сайты связывания миРНК, тем самым уменьшая их связывание с целевой мРНК. Переведено и адаптировано (Statello и др., 2021).

Другим примером подавления экспрессии генов является система CRISPR-Cas. Сгруппированные короткие палиндромные повторы с регулярными промежутками (CRISPR) и ассоциированные с ними белки (Cas) представляют адаптивную иммунную систему прокариот, которая запоминает предыдущие инфекции путем интеграции коротких последовательностей вторгшихся геномов — так называемых спейсеров, в локус CRISPR. Спейсеры, чередующиеся с повторами, экспрессируются в виде небольших направляющих CRISPR-РНК (crRNA), которые используются белками Cas для таргетирования наследственного материала вирусов и др. инфекций. Механизм разрезания мРНК на примере CRISPR-Cas13 показан на рис. 2.3.3.

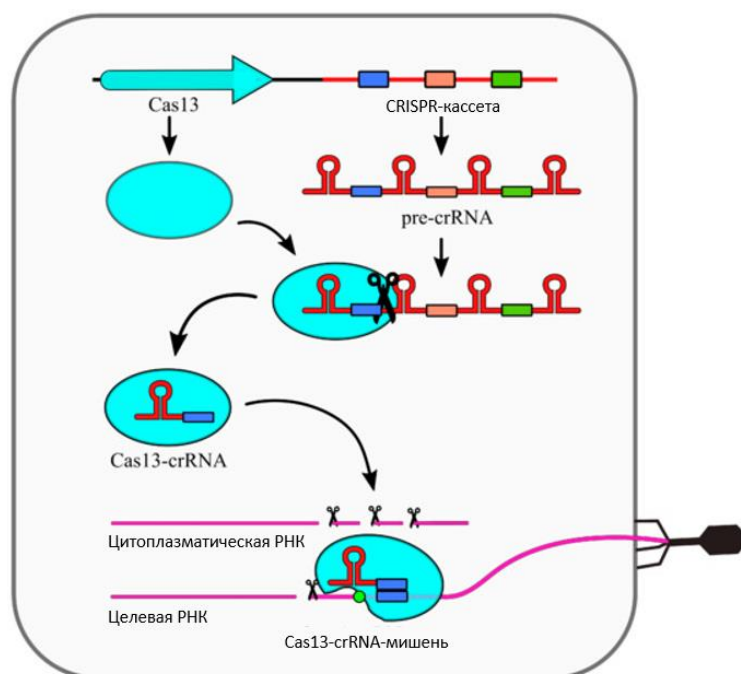


Рис. 2.3.3. Механизм разрезания мРНК системы CRISPR-Cas13. CRISPR-кассета транскрибируется в виде длинного прекурсора crRNA, которая процессируется под действием экспрессированного Cas13. Образовавшийся комплекс Cas13-crRNA сканирует оцРНК в клетке на последовательности, комплементарные

crRNA. При гибридизации crRNA и мишени в сочетании с наличием PFS-сайта (последовательность, фланкирующая протоспейсер) происходят конформационные изменения белка, приводящие к неспецифическому разрезанию мРНК. Переведено и адаптировано (Burmistrz, Krakowski, Krawczyk-Balska, 2020).

На основе изучения фундаментальных механизмов регуляции генной экспрессии и понимания того, что короткие нуклеиновые кислоты могут селективно воздействовать на РНК-мишени, были разработаны синтетические антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), способные специфически связываться с комплементарными участками мРНК и подавлять экспрессию целевых генов. Антисмысловые технологии стали логичным продолжением естественных механизмов регуляции, предоставив инструмент для направленного вмешательства в экспрессию генов как в экспериментальных, так и в терапевтических целях. Механизмы действия АСО представлены на рис. 2.3.4.

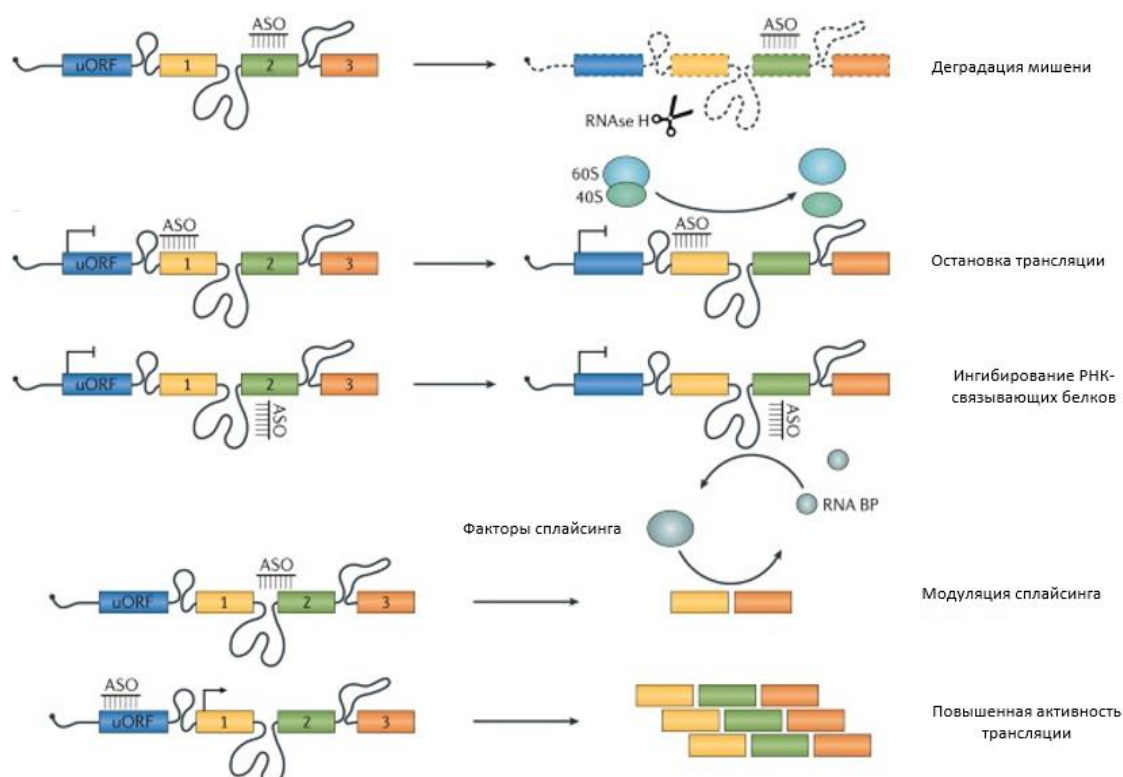


Рис. 2.3.4. Механизмы действий АСО. Связывание АСО с мРНК и образование РНК-ДНК гетеродуплекса активирует РНКазу Н, специфически разрушающую

таргетную мРНК. Связывание АСО со старт-кодоном стерически блокирует связывание трансляционных факторов, останавливая трансляцию. АСО могут стерически блокировать сайты связывания РНК-связывающих белков. Связывание АСО с сайтом сплайсинга приводит к его модуляции. Связывание АСО выше рамки считывания повышает активность трансляции. Переведено и адаптировано (Rinaldi, Wood, 2018).

В этой главе были рассмотрены основные пути регуляции экспрессии генов посредством связывания олигонуклеотидов с мРНК, представленные, как и естественными механизмами – РНК-интерференцией, так и разработанной технологией антисенсовых олигонуклеотидов.

2.4. Кооперативные эффекты в механизмах регуляции экспрессии

Кооперативные эффекты характерны и для систем по регуляции экспрессии, что обеспечивает эффективную регуляцию. Так, показано, что миРНК, имеющие сайты связывания на одной мРНК на небольшом удалении друг от друга могут проявлять кооперативные взаимодействия (рис. 2.4.1). Кооперативность миРНК обеспечивается за счет белка TNRC6, который опосредует взаимодействие комплексов AGO-миРНК между собой.

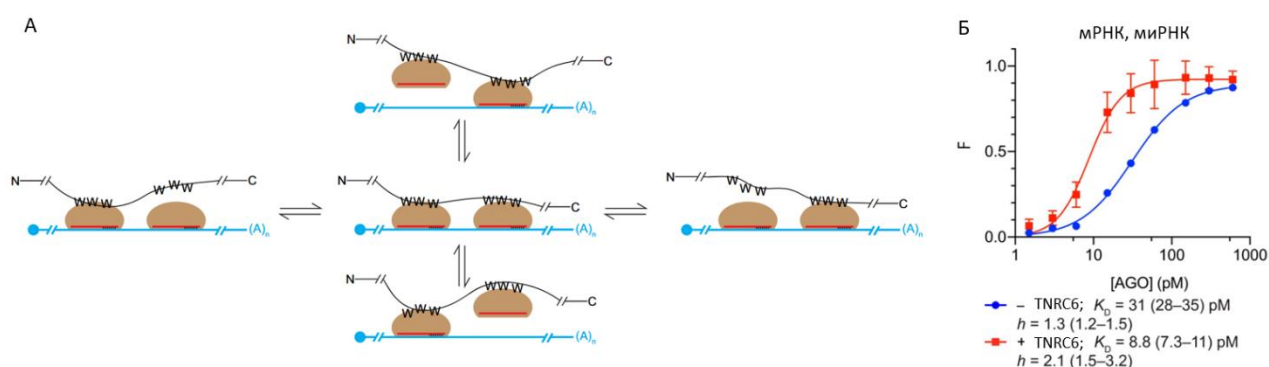


Рис. 2.4.1. А. Модель кооперативного связывания двух миРНК с мРНК. Два AGO белка (коричневым) в комплексе с миРНК (красным) связываются с таргетной мРНК (голубым), имеющей 2 сайта связывания. TNRC6 (черным) связывается с AGO белками посредством тирозиного остатка. Б. Кривая

насыщения мРНК миРНК в отсутствии TNRC6 (голубым) и при его наличии (красным). Показаны константы диссоциации и коэффициенты Хилла.

Переведено и адаптировано (Briskin, Wang, Bartel, 2020).

В конце прошлого века была разработана система кооперативных антисенсовых олигонуклеотидов (Kandimalla и др., 1995). Система состоит из двух олигонуклеотидов, помимо сайтов связывания с мишенью, обладающих сайтами взаимодействия между собой (рис. 2.4.2А). Данное взаимодействие обеспечивает кооперативность системы, повышая ее специфичность, однако, система не показала усиления эффекта подавления трансляции, что характерно для кооперативных взаимодействий миРНК

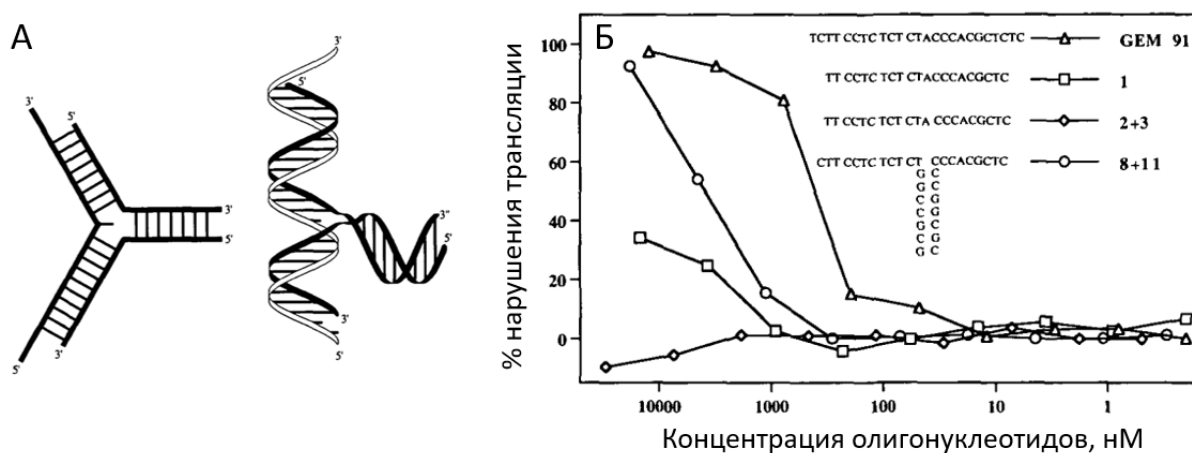


Рис. 2.4.2. Система кооперативных антисенсовых олигонуклеотидов. А. Структура антисенсовых олигонуклеотидов. Б. Кривые подавления трансляции в зависимости от концентрации олигонуклеотидов. Кривая с точками в виде кругов соответствует изучаемой системе. Переведено и адаптировано (Kandimalla и др., 1995).

Кооперативные эффекты играют важную роль в регуляции экспрессии генов посредством миРНК, обеспечивая строгий динамический контроль экспрессии в узком диапазоне изменения концентраций миРНК. Однако, несмотря на имеющиеся инструменты повышения кооперативности синтетических антисенсовых олигонуклеотидов, они уступают природным аналогам.

3. Материалы и методы

Все используемые олигонуклеотиды были приобретены в компании Евроген (Россия). Последовательности приведены в приложениях. Меченые олигонуклеотиды были очищены с помощью ВЭЖХ. Полученные олигонуклеотиды в лиофилизированном виде растворяли в MQ до концентрации 100 мкМ. Точная концентрация определялась с помощью спектрофотометра Nano-500, Allsheng (Китай) на 260 нм используя коэффициенты экстинкции производителя. В случае олигонуклеотидов, обладающих вторичной структуры (шпильки), использовались коэффициенты экстинкции как взвешенное среднее между коэффициентом экстинкции дцДНК и оцДНК в соответствие со вторичной структурой олигонуклеотида. После расчета концентрации олигонуклеотидов были приготовлены их стоки по 10 мкМ на MQ.

Обработка всех полученных данных происходила с использованием Python-библиотек NumPy и Pandas, построение графиков производилось с использованием библиотек Matplotlib и Seaborn.

3.1. Анализ кинетики равновесных взаимодействий молекулярных систем олигонуклеотидов

Теоретический анализ химической кинетики поведения молекулярных систем на основе олигонуклеотидов, при взаимодействии которых проявляются эффекты кооперативности был проведен с использованием специализированного программного обеспечения COPASI для симуляции биохимических систем (Bergmann и др., 2017) и разработанного скрипта на языке Python.

Программное обеспечение COPASI использовалось для построения кривых связывания лигандов с рецепторами с заданными константами диссоциации. Системы дифференциальных уравнений, описывающие взаимодействия олигонуклеотидов, были построены с учетом заданных констант диссоциации, выраженных в виде отношения констант скоростей диссоциации к

константам скоростей ассоциации. Начальные концентрации компонентов и параметры реакций задавали в соответствии с экспериментальными условиями. Получение кривых связывания было осуществлено с использованием инструмента Parameter Scan, рассчитывающего кривые зависимости концентраций продуктов реакции от начальных концентраций олигонуклеотидов. Полученные данные экспортировались в виде CSV-таблиц, обработанными далее с помощью Python-скрипта. Кривые связывания были рассчитаны в соответствии с уравнениями 2.1.5 и 2.1.6.

Поиск констант диссоциаций реакций, соответствующих высоким эффектам кооперативности был проведен с использованием инструментов оптимизации, реализованных в библиотеке SciPy. Кривые связывания были рассчитаны на основе системы уравнений реакций в равновесных состояниях с учетом материального баланса с помощью метода наименьших квадратов. Для получения корректных решений были заданы границы рассчитываемых переменных в пределах от нуля до начальной концентрации. В качестве функции минимизации был выбран параметр $L_{0.9/0.1}$ (3.1.1), отражающий кооперативность системы. Для его расчета использовалась функция интерполяции `interp1d`.

$$L_{0.9/0.1} = \frac{L(F = 0.9)}{L(F = 0.1)} \quad (3.1.1)$$

Минимизация параметра кооперативности была проведена с использованием метода Nelder-Mead, вариация констант диссоциации была проведена в пределах двух порядков.

3.2. Дизайн олигонуклеотидов, предсказание вторичной структуры и термодинамических параметров

Дизайн олигонуклеотидов, предсказание вторичной структуры и термодинамических параметров были осуществлены с использованием веб-

сервиса NUPACK (Zadeh и др., 2011). Все расчеты проводились при 25°C (за исключением расчета кривых плавления) и 0.1М концентрации NaCl. Концентрация каждой цепи составляла 1 мкМ.

При дизайне олигонуклеотидов использовались ограничения разнообразия (Diversity constraints): в последовательности длиной 4 нуклеотида должно быть не менее 3 типов нуклеотидов.

Константы равновесия систем взаимодействующих олигонуклеотидов рассчитывались с использованием уравнения 3.2.1:

$$K_d = e^{\frac{\Delta G_p^0}{RT}} \quad (3.2.1)$$

где

ΔG_p^0 стандартное изменение энергии Гиббса при образовании продукта реакции;

R – газовая постоянная;

T – температура в кельвинах.

Расчет стандартного изменения энергии Гиббса проводился путем вычитания свободной энергии вторичной структуры реагентов из свободной энергии вторичной структуры продуктов, предсказанных NUPACK.

Кривые плавления для систем олигонуклеотидов были рассчитаны в температурном диапазоне от 25 до 95°C с шагом в 1°C.

3.3. Метод гель-электрофореза для исследования поведения системы олигонуклеотидов

Качественная оценка взаимодействия систем олигонуклеотидов и их соответствия предсказаниям производилась с использованием метода гель-

электрофореза. Из 10 мкМ стоков олигонуклеотидов в MQ отбирались аликвоты, которые подвергались отжигу с использованием термоциклера (90 сек 95°C, 40 сек 4°C), после чего разбавлялись до 1 мкМ в буфере (20мМ Трис, 100 мМ KCl, pH 7.5). Взаимодействующие олигонуклеотиды смешивали в эквимольных количествах до объема 30 мкл и инкубировали при комнатной температуре 1 час. Образцы, подлежащие денатурации, после инкубации были нагреты до 95°C, находились при этой температуре 5 мин и остужались до 25°C со скоростью 0.1°C в секунду в теромциклере. При нанесении на гель, 7.5 мкл образца (приблизительно 100 нг) смешивались с 2.5 мкл 4x Gel Loading Dye, Blue (Евроген, Россия).

Образцы гнались в 12% полиакриламидном геле с 1x TAE буфером при 80V 2.5 ч. Для поддержания постоянной температуры буфера камера была помещена на 4°C. Перед загрузкой образцов был осуществлен префорез в течение 30 мин. Гель был окрашен SYBR Gold (Invitrogen) и визуализирован в ChemiDoc BioRad с использованием экрана конверсии XcitaBlue. Результаты обрабатывались с помощью программы ImageJ (<https://imagej.net/ij/>).

Для количественной оценки взаимодействия систем олигонуклеотидов использовалась рецепторная цепь R, меченая флуоресцентной меткой FAM на 5'-конце. Из 10 мкМ стоков олигонуклеотидов в MQ отбирались аликвоты и подвергались отжигу с использованием термоциклера, после чего разбавлялись до 8 мкМ в буфере. Взаимодействующие олигонуклеотиды смешивали в эквимольных количествах до финальной концентрации 2 мкМ и инкубировали при комнатной температуре 1 час. Образцы гнались в 12% полиакриламидном геле с 1xTAE буфером при 120V 2 ч. Остальные параметры были аналогичны описанным выше.

3.4. Получение кривых плавления систем олигонуклеотидов с использованием SYBR green

Аликвоты из 10 мкМ стоков используемых олигонуклеотидов подвергались отжигу, после чего были доведены до концентрации 4 мкМ MQ. Взаимодействующие олигонуклеотиды смешивали в эквимольных количествах в оптически прозрачных ПЦР-пробирках, доводя до объема в 30 мкл, после чего инкубировали при комнатной температуре. Далее в каждую пробу добавляли 10 мкл 4х буфера с 4х Sybr Green, полученной из стока 50х Sybr Green (Евроген, Россия). Пробы инкубировались 1 час при комнатной температуре. Для измерений использовался ртПЦР термоциклер QuantStudio 5 (ThermoFisher, США). Измерения проводились от 25 до 95°C с шагом в 1°C и тремя измерениями с интервалом 20 сек для каждой температуры. Каждой пробе имелось три технические повторности.

В качестве контроля имела проба одноцепочечной ДНК, практически не связывающаяся с SYBR Green и не претерпевающая конформационных переходов при нагреве. Из-за слабого сигнала флуоресценции, вызванного малым размером дцДНК участков, температурное тушение преобладает над сигналом конформационных переходов, поэтому сигнал флуоресценции образцов был нормирован на контрольный, тем самым нивелируя эффект тушения. Получаемые величины были переведены в относительные величины от 0 до 1 и соответствовали изменению прироста количества одноцепочечной ДНК.

Файлы результатов экспортировались в виде Excel-таблиц и анализировались с использованием разработанного Python-скрипта.

3.5. Анализ кривых связывания олигонуклеотидов посредством измерения флуоресценции меченных олигонуклеотидов

Для данного типа измерений использовалась матрица R (см. Приложения), меченная с 5'-конца флуоресцентной меткой FAM, с 3'-конца – гасителем BHQ-1. Аликвоты олигонуклеотидов 10 мкМ стока были подвергнуты термальному отжигу и разведены до нужной концентрации (Лиганды L1 и L2 – 1.6 мкМ, R – 100нМ) буфером с добавлением 0.01% Твин-20 (Хеликон, Россия). Было приготовлено 10 двукратных разбавлений олигонуклеотидов-лигандов. Для измерений использовался планшет Corning Low Volume 384-well Black Flat Bottom. Приготовление проб было осуществлено с использованием робота-пипетатора Opentrons OT-2. Каждого образца наносилось по 15 мкл до финального объема в 30 мкл. Для каждой пробы было сделано по 3 технические повторности. Измерения проводились на планшетном ридере PolarStar Omega. Полученные результаты экспортировались в виде CSV-таблиц.

Данные были обработаны с помощью Python-скрипта. Фиттирование данных осуществлялось с использованием библиотеки Imfit. Кривые были фиттированы уравнением Хилла с учетом материального баланса. Связь данных измерений флуоресценции с долей связывания осуществляется через уравнение 3.5.1:

$$F = \frac{I - I_f}{I_b - I_f} \quad (3.5.1)$$

где

I – измеряемая интенсивность флуоресценции;

I_f – интенсивность флуоресценции рецептора в свободном состоянии;

I_b – интенсивность флуоресценции рецептора в полностью связанном состоянии;

При фиттировании варьировались K_d , n (коэффициент Хилла), и значения I_b и I_f .

3.6. Анализ кривых связывания олигонуклеотидов методом сдвига электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле

Для анализа кривых связывания олигонуклеотидов методом сдвига электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле использовалась и детектировалась увеличенная матрица R, меченная на 5' конце флуоресцентной меткой FAM (см. Приложения). Аликвоты олигонуклеотидов из 100 мкМ стока были подвергнуты термальному отжигу и разведены до нужной концентрации (Лиганды L1 и L2 – 24 мкМ, R – 6 мкМ) буфером с добавлением 0.01% Твин-20. Было приготовлено 9 двукратных разбавлений олигонуклеотидов-лигандов. Образцы инкубировались 1 час. При нанесении на гель, 7.5 мкл образца (приблизительно 100 нг) смешивались с 2.5 мкл 4x Gel Loading Dye, Blue (Евроген). Каждая проба была измерена в трех независимых повторностях.

Образцы гнались в 12% полиакриламидном геле с 1x TAE буфером при 120V 2 ч. Для поддержания постоянной температуры буфера камера была помещена на 4°C. Перед загрузкой образцов был осуществлен префорез в течение 30 мин. Гель был визуализирован в ChemiDoc BioRad с использованием экрана конверсии XcitaBlue.

Результаты обрабатывались с помощью ImageJ. Площадь полос исследуемых комплексов была посчитана в соответствии с протоколом [<https://lukemiller.org/>]. Было посчитано соотношение площадей полос искоемых комплексов, по которым определялась доля связывания в соответствии с уравнениями 2.1.5 и 2.1.6. Фиттирование данных было проведено аналогично приведенному в разделе 3.5.

В случае плохо разделяющихся полос доля связывания считалась иным способом. Из пика интенсивности контрольной полосы проводилась

вертикальная линия, проходящая через все построенные графики. Считалось соотношение левых частей кривых к правым и по их изменению с увеличением концентрации строились кривые связывания с использованием формулы, аналогичной 3.5.1.

4. Результаты

4.1. Теоретический анализ методами молекулярного моделирования и химической кинетики поведения молекулярных систем на основе олигонуклеотидов, при взаимодействии которых проявляются кооперативные эффекты

В качестве базовой модели, в которой могут проявляться кооперативные эффекты, была выбрана система олигонуклеотидов, представленная на рис. 4.1.1.

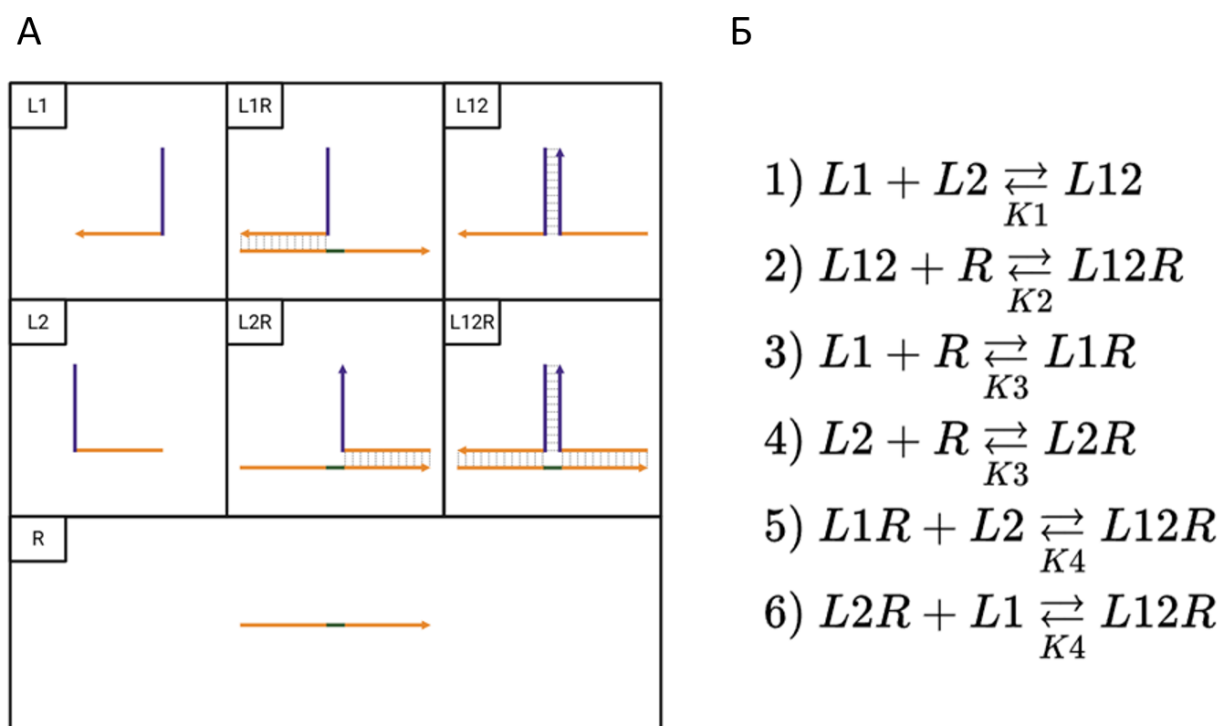


Рис 4.1.1. Молекулярная система на основе олигонуклеотидов, при взаимодействии которых могут проявляться кооперативные эффекты. А) Участвующие в реакциях олигонуклеотиды и образующиеся комплексы. Стрелками показана полярность нуклеотидов от 5' к 3' концу. Б) Система уравнений, описывающая поведение описываемой системы.

Система состоит из трех олигонуклеотидов, L1 и L2 (L) – лигандов, взаимодействующих с рецепторной цепью R, имеющей два сайта связывания для L1 и L2. L-олигонуклеотиды имеют два домена, один для гибридизации с R,

другой – для взаимодействия L между собой. Предполагается, что именно это взаимодействие обеспечивает кооперативность системы. В систему включено 6 обратимых реакций: 1) взаимодействие L между собой с образованием комплекса L12 и константой диссоциации K1; 2) взаимодействие L12 с R с образованием комплекса L12R и константой диссоциации K2; 3) и 4) взаимодействие L с R с образованием комплекса L1R и L2R (LR) и константой диссоциации K3; 5) и 6) взаимодействие LR с L с образованием комплекса L12R и константой диссоциации K4.

Для нахождения Kd реакций, при которых проявляются кооперативные эффекты, была произведена минимизация параметра кооперативности $L_{0.9/0.1}$ (см. раздел 3.1). Начальная концентрация R – 1 мкМ, концентрации L варьировались в диапазоне от 10^{-3} до 10^3 мкМ. Константы реакций варьировались в диапазоне от 1 до 100 мкМ. Кривая насыщения, с параметрами, соответствующему наибольшему эффекту кооперативности приведена на рис. 4.1.2.

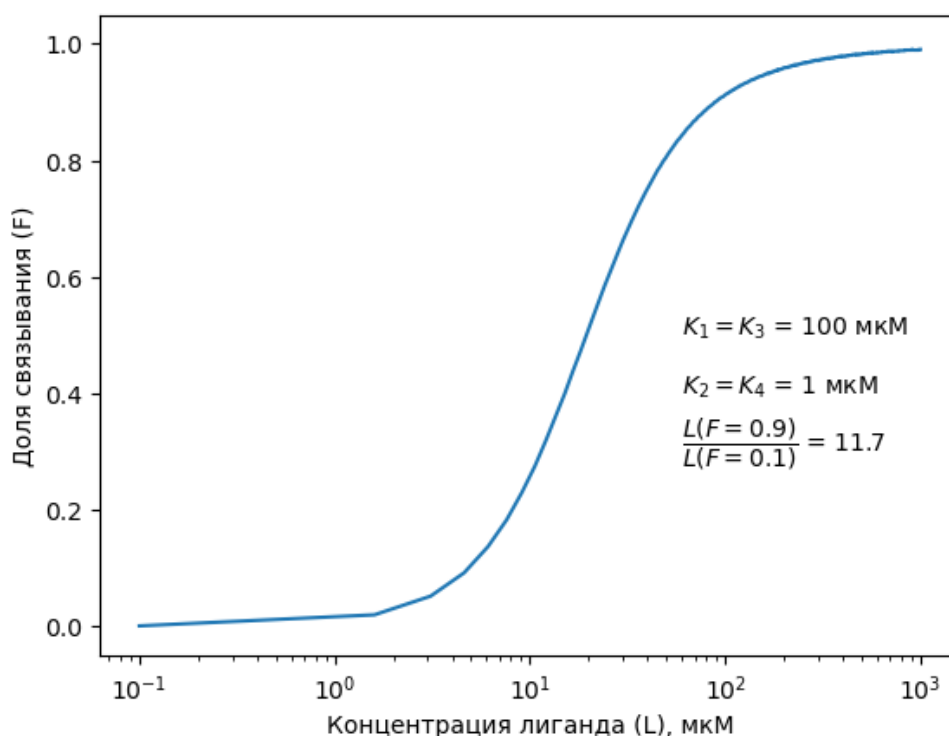


Рис. 4.1.2. Кривая связывания R-цепи лигандами L в полулогарифмической шкале для случая предсказанного наибольшего кооперативного эффекта системы 4.1.1 в выбранном диапазоне вариации констант равновесия. По оси x отложена концентрация лиганда в мкМ, по оси y отложена доля связывания F.

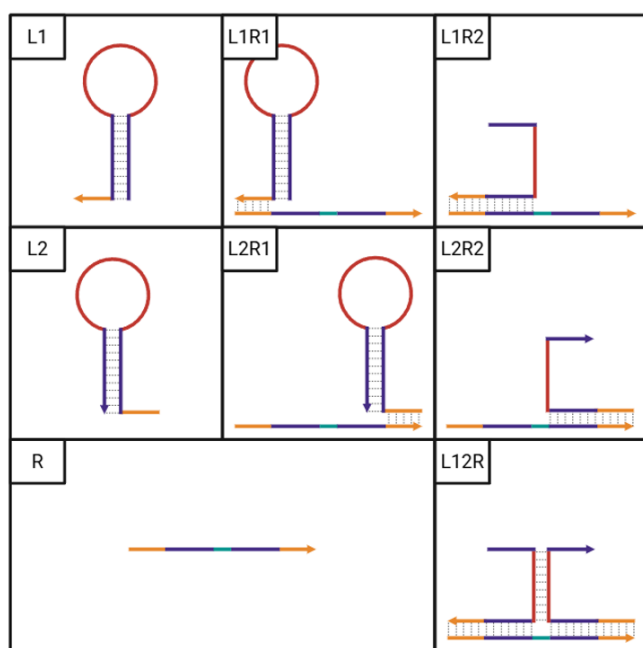
На правой части рисунка показаны оптимизированные константы равновесия и значения рассчитанного параметра кооперативности.

Наибольший эффект кооперативности наблюдается при граничных значениях констант равновесия, K_1 и K_3 максимальны, K_2 и K_4 – минимальны. Следовательно, взаимодействие лигандов между собой и взаимодействия лиганда с рецептором должно быть слабым, в то время как взаимодействие комплекса L_2 с R и LR с L должно быть усилено.

Принимая в сведению данные результаты далее уточним нашу систему. Обратим внимание, что в перечисленных реакциях участвуют только два домена, в то время как констант равновесия – 4. Выделим независимые константы, и выразим оставшиеся через них. Независимыми будут являться K_1 и K_3 , тогда K_2 можно приблизительно считать равной K_3^2 , а K_4 – $K_1 \cdot K_3$. Для уточненной системы найдем параметры, при которых наблюдается наибольший кооперативный эффект. При вариации параметров в диапазоне 1 – 100 мкМ значимого эффекта кооперативности обнаружено не было. Поэтому дальнейший поиск был осуществлен в диапазоне 0.1 нМ до 100 нМ. Оказалось, что наибольший эффект кооперативности проявляется в случае довольно низких K_d , что в растворе должны преобладать продукты этих реакций. Также оказалось, что $K_1 > K_3$, иными словами, сродство L к R выше, чем сродство L друг к другу.

Для дальнейшего рассмотрения молекулярных систем, в которых могут наблюдаться кооперативные эффекты, была предложена система, представленная на рис. 4.1.3.

А



Б

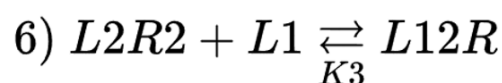
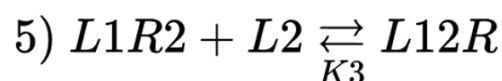
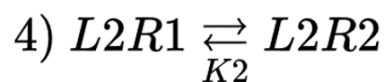
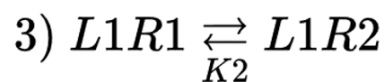
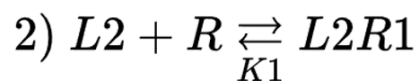
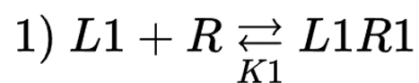


Рис. 4.1.3. Модифицированная молекулярная система на основе олигонуклеотидов, при взаимодействии которых могут проявляться кооперативные эффекты. А) Участвующие в реакциях олигонуклеотиды и образующиеся комплексы. Стрелками показана полярность нуклеотидов от 5' к 3' концу. Б) Система уравнений, описывающая поведение описываемой системы.

При дизайне данной системы был принят во внимание полученный результат, при котором взаимодействие лигандов между собой и взаимодействия лиганда с рецептором должно быть слабым, в то время как взаимодействие комплекса L12 с R и LR с L должно быть усиленно.

Для достижения этих эффектов было предложен дизайн L в виде шпильчатых структур, в которых домен взаимодействия между лигандами скрыт внутри петли, а взаимодействие с R происходит за счет выступающего той-холд конца, при связывании которого с цепью R происходит раскрытие шпильки, в связи с чем усиливается связывание со вторым лигандом. Данная

система описывается шестью уравнениями: 1) и 2) взаимодействие L с R с образованием комплекса L1R1 и L2R1 и константой диссоциации K1; 3) и 4) конформационный переход комплекса L1R1 и L2R1 в комплекс L1R2 и L2R2 соответственно с константой диссоциации K2; 5) и 6) взаимодействие L с L1R2 и L2R2 с образованием комплекса L12R и константой диссоциации K3.

Результаты оптимизации параметров данной системы аналогичны полученным в первом случае – наибольший кооперативный эффект наблюдается при наибольшей K1 и наименьшей K3.

В данном разделе был проведен теоретический анализ двух молекулярных систем, в которых могут проявляться кооперативные эффекты. Было найдено, при каких условиях эффекты кооперативности проявляются, и на их основе предложена модифицированная система олигонуклеотидов с повышенным эффектом кооперативности.

4.2. Разработка системы взаимодействующих олигонуклеотидов, проявляющих эффект кооперативности в заданных диапазонах концентраций и при заданных условиях

Дизайн взаимодействующих олигонуклеотидов производился с использованием веб-сервиса NUPACK (см. раздел 3.2). Задачей была разработка олигонуклеотидов, соответствующих системе 4.1.3 с повышенной K1 и пониженной K3 в условиях, близких к экспериментальным, поэтому моделирование велось с учетом данных условий (концентрация соли, рабочая концентрация).

Цепи L состоят из двух частей: той-холд конец и шпилька, в составе которой можно выделить ножку и петлю. Взаимодействие той-холда с R описывается константой K1. Это взаимодействие должно быть ослаблено, но в то же время необходимо образование стабильного комплекса LR1. В соответствии с литературными данными о зависимости скорости реакции от

длины той-холда (Yurke, Mills, 2003), длина той-холда составила 6 нуклеотидов. В этом случае взаимодействие цепей происходит, но тем не менее, между прямой и обратной реакцией устанавливается необходимое равновесие.

Размер шпильки был выбран таким способом, чтобы данная вторичная структура была наиболее стабильна в водном растворе и в то же время, чтобы домен взаимодействия L между собой был достаточно большим для усиления их взаимодействия между собой. Длина ножки шпильки составила 10 нуклеотидов, что достаточно для ее стабильного формирования в необходимом диапазоне температур (25-37), а длина петли составила 20 нуклеотидов.

Известно, что комплементарные петли шпилек способны к взаимодействию, названному Kissing Loop. Для избежания взаимодействия были приняты во внимание характеристики шпилек для образования данного типа взаимодействия (Barth, Kobbe, Focke, 2016), а именно следовало избежать при дизайне образования GC-богатых и AT-богатых участков на концах, которые способствуют образованию Kissing Loop пары.

Для простоты измерений на цепь R накладывались ограничения отсутствия вторичной структуры.

Суммируя все вышеописанные требования, были получены последовательности олигонуклеотидов (см. Приложения) и рассчитаны константы реакций. Предсказанная кривая связывания с рассчитанными константами реакции приведена на рис. 4.2.1.

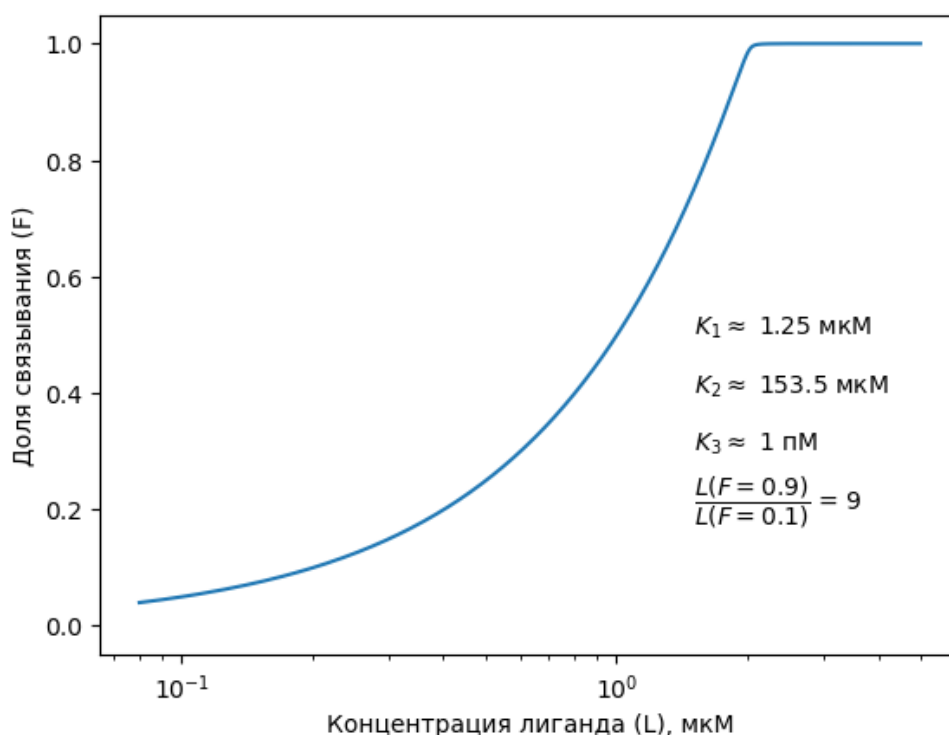


Рис. 4.2.1. Кривая связывания R-цепи смоделированными лигандами L в полулогарифмической шкале. По оси x отложена концентрация лиганда в мкМ, по оси y отложена доля связывания F. На правой части рисунка показаны рассчитанные константы равновесия и значения рассчитанного параметра кооперативности.

Параметр кооперативности, рассчитанный для данной системы составил $L_{0.9/0.1} = 9$, следовательно, дизайн системы соответствует данным теоретического анализа.

В качестве контроля была смоделирована система, в которой L не обладали сайтами связывания между собой и не имели шпилечной структуры, связываясь только с цепью R, следовательно, не обладая эффектом кооперативности.

Таким образом, с учетом требований, накладываемых результатами теоретического анализа поведения молекулярных систем и ограничениями

олигонуклеотидных взаимодействий была разработана система, соответствующая этим требованиям.

4.3. Экспериментальный анализ поведения молекулярной системы на основе олигонуклеотидов

Для проверки разработанной системы сначала было проверено соответствие предсказания взаимодействий олигонуклеотидов сервисом NUPACK с экспериментальными данными методом гель-электрофореза (рис. 4.3.1).

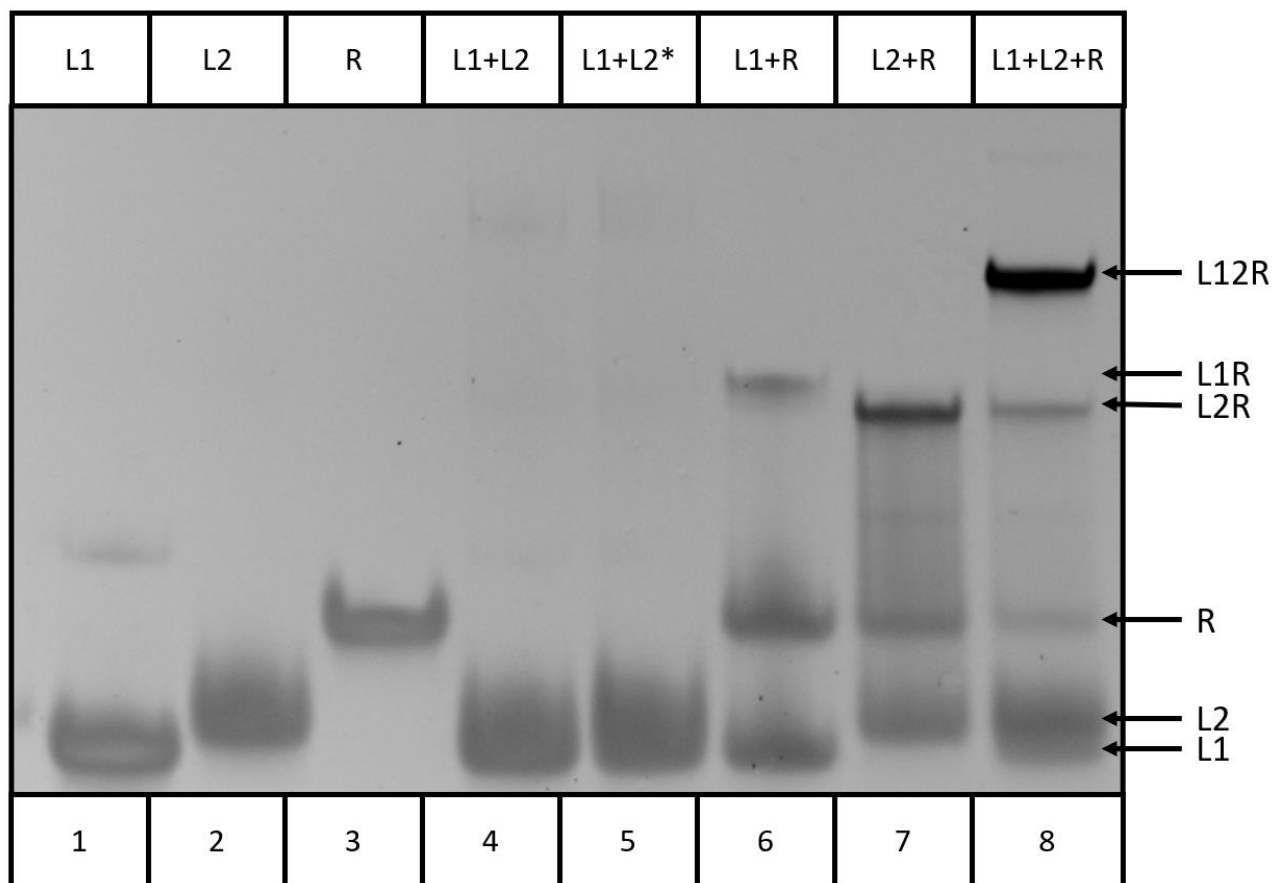


Рис. 4.3.1. Гель-электрофорез исследуемой системы. Содержимое каждой лунки показано в виде буквенных обозначений в верхней части рисунка, в нижней части представлена нумерация лунок. Первые две полосы соответствуют L1 и L2 по отдельности, третья – цепь R. Далее идут смеси L, смеси L после

денатурации, смеси L и R, смеси обоих L и R. Стрелками показаны участки, соответствующие полосам предполагаемых комплексов.

Было обнаружено, что шпильки L действительно не взаимодействуют между собой, при этом отсутствие взаимодействий проявляется даже после денатурации данного комплекса. Лиганды способны к взаимодействию с цепью R по отдельности, при этом при смешивании обоих L с R происходит образование третичного комплекса. Однако, электрофоретические подвижности двух L и образуемых с ними комплексов оказались разными, при этом интенсивность окраски полос, соответствующих комплексам LR1-LR2, также отличалась.

Для количественной валидации был проведен гель-электрофорез с цепью R, меченной флуоресцентной меткой FAM. Измерения были проведены как для исследуемой системы, так и для контроля. Результаты приведены на рис. 4.3.2.

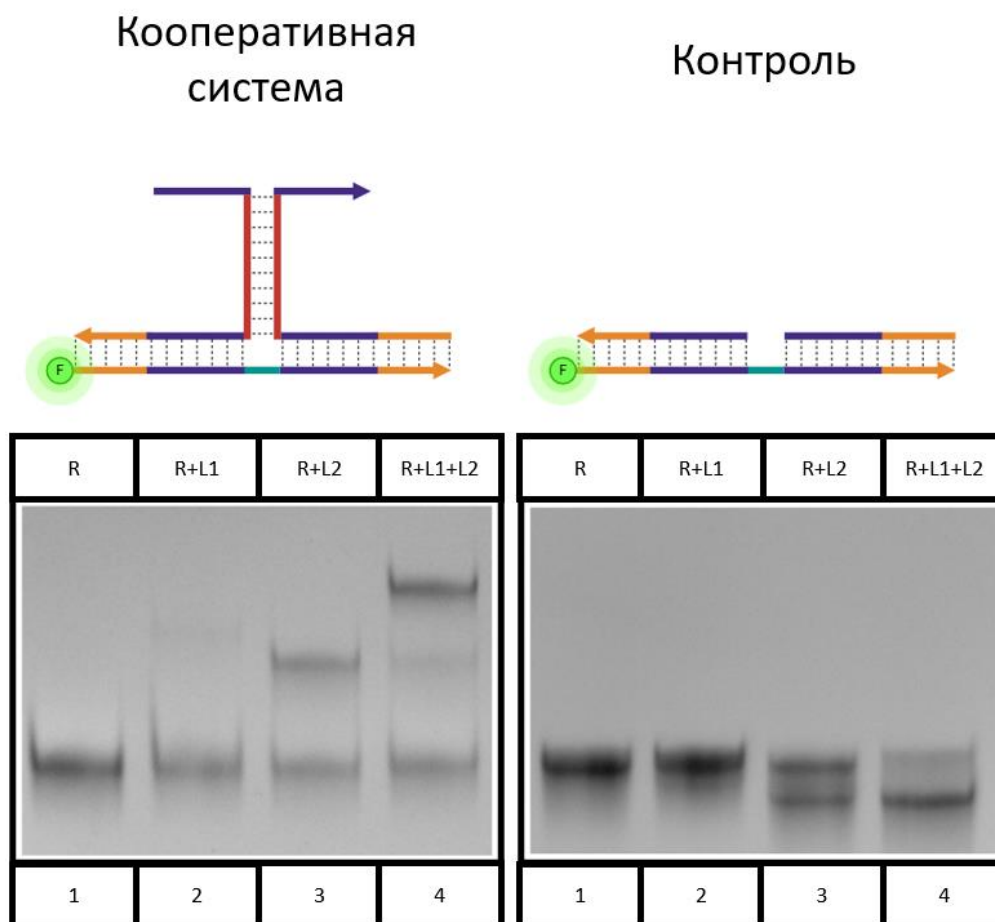


Рис. 4.3.2. Гель-электрофорез исследуемой системы и контроля слева и справа соответственно. Сверху показаны схематичные изображения исследуемой и контрольной системы. Содержимое каждой лунки показано в виде буквенного обозначения над изображением гель-электрофореза, в нижней части представлена нумерация лунок. Первая полоса соответствует цепи R, следующие две комплексам R с L. Четвертая – комплексу R с двумя цепями L.

Для первого лиганда соотношение свободный R/комплекс LR составляло 8 к 1, в то время как для второго лиганда соотношение составляло 4 к 5. При образовании тройного комплекса соотношение R/LR/L12R составляло 5/1/4. При этом для контроля наблюдалась аналогичная ситуация, в которой комплекс со вторым лигандом образовывался эффективнее.

Альтернативным методом проверки соответствия характеристик разработанной системы предсказанным взаимодействием было сравнение кривых плавления комплексов олигонуклеотидов с предсказанными в NUPACK. Данные кривые плавления представлены на рис. 4.3.3.

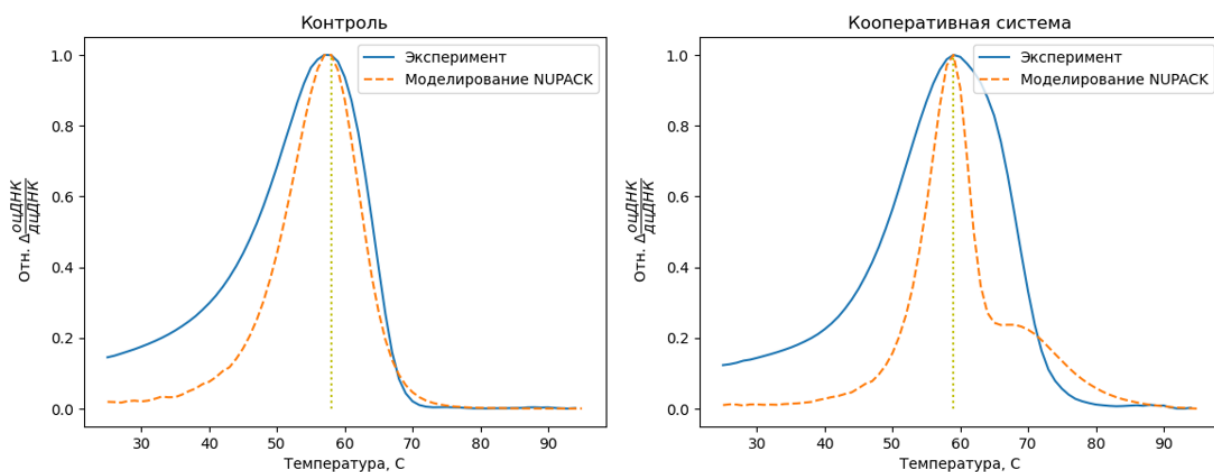


Рис 4.3.3. Кривые плавления систем олигонуклеотидов контроля и исследуемой кооперативной системы. По оси x отложена температура в °С, по оси y – относительное приращение количества оцДНК к дцДНК. Сплошной линии показаны данные эксперимента, пунктирной – моделирование сервисом NUPACK. Вертикальная пунктирная линия соответствует максимуму изменения ординаты. Для контроля он составляет 58°С, для исследуемой системы – 59°С.

Кривая плавления контроля практически совпадает с предсказанной, в то время как в случае исследуемой системы экспериментальная кривая оказалась шире ожидаемой кривой. Тем не менее, предсказанные максимумы изменения приращение количества оцДНК к дцДНК совпали с экспериментальными в обоих случаях.

Так, экспериментально были охарактеризованы взаимодействия олигонуклеотидов разработанной системы и проверены на соответствие предсказанным параметрам.

4.4. Проверка способности спроектированных олигонуклеотидов к кооперативному взаимодействию

Для проверки способности спроектированных олигонуклеотидов к кооперативному взаимодействию были получены кривые связывания L с R методом измерения сигнала флуоресценции меченной цепи R, с 5'-конца флуоресцентной меткой, с другой стороны – гасителем. Принцип измерения показан на рис 4.4.1. Результаты экспериментов приведены на рис. 4.4.2.

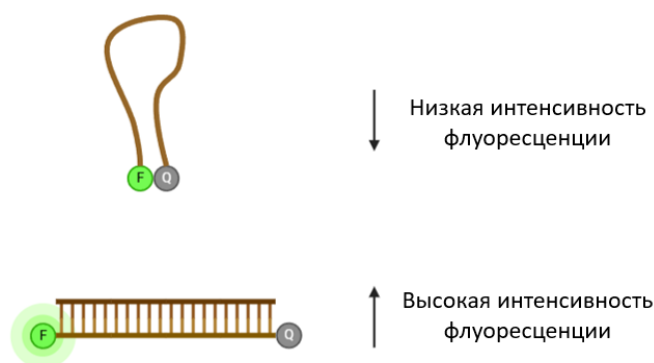


Рис. 4.4.1. Принцип измерения сигнала флуоресценции меченной цепи R при взаимодействии с L. В свободном состоянии меченые концы олигонуклеотиды сближены в пространстве, из-за чего наблюдается низкая интенсивность флуоресценции. При связывании с комплементарной цепью расстояние между концами цепи увеличивается, из-за чего возрастает наблюдаемая интенсивность флуоресценции.

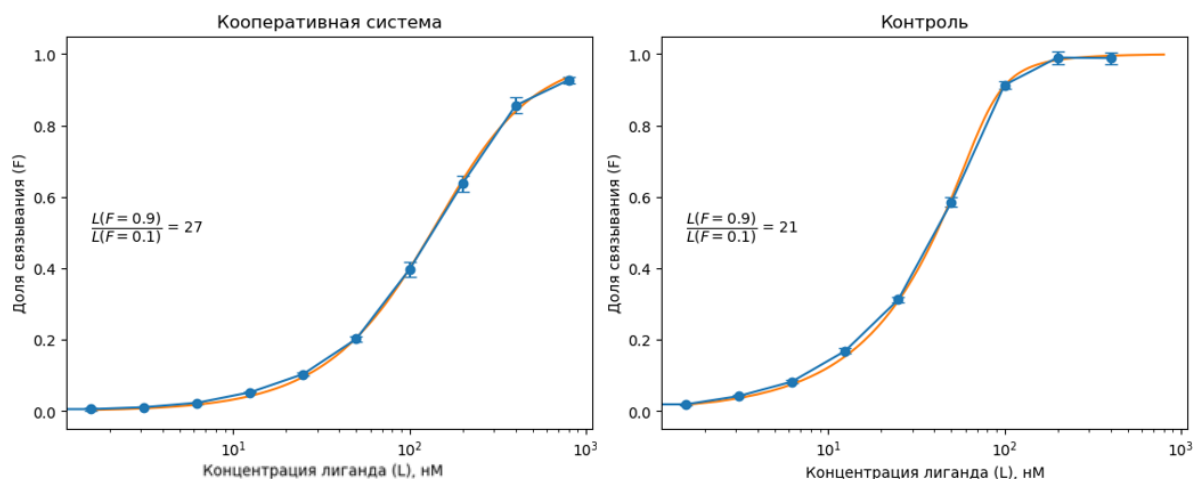


Рис. 4.4.2. Полученные кривые связывания L с R методом измерения флуоресценции меченой R- цепи в полулогарифмической шкале для контроля и исследуемой системы. По оси x отложена концентрация лиганда L в нМ, по оси y – доля связывания. На графиках слева в центре показано рассчитанное значение параметра кооперативности. Каждая точка была измерена в трех повторностях, усы соответствуют стандартному отклонению. Оранжевым показано фиттирование экспериментальных данных уравнением Хилла, R^2 в обоих случаях составил 0.999.

И контроль, и исследуемая система демонстрируют схожие кооперативные эффекты, из чего следует, что сама цепь R по своим свойствам обладает кооперативным эффектом независимо от типа L. Для устранения данного эффекта была заказана цепь R большего размера, с увеличенными концами, не участвующими в реакциях, меченая с 5'-конца флуоресцентной меткой. Кривые связывания для данного случая были построены с использованием метода сдвига электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле (гель-шифт). Данные представлены на рис. 4.4.3.

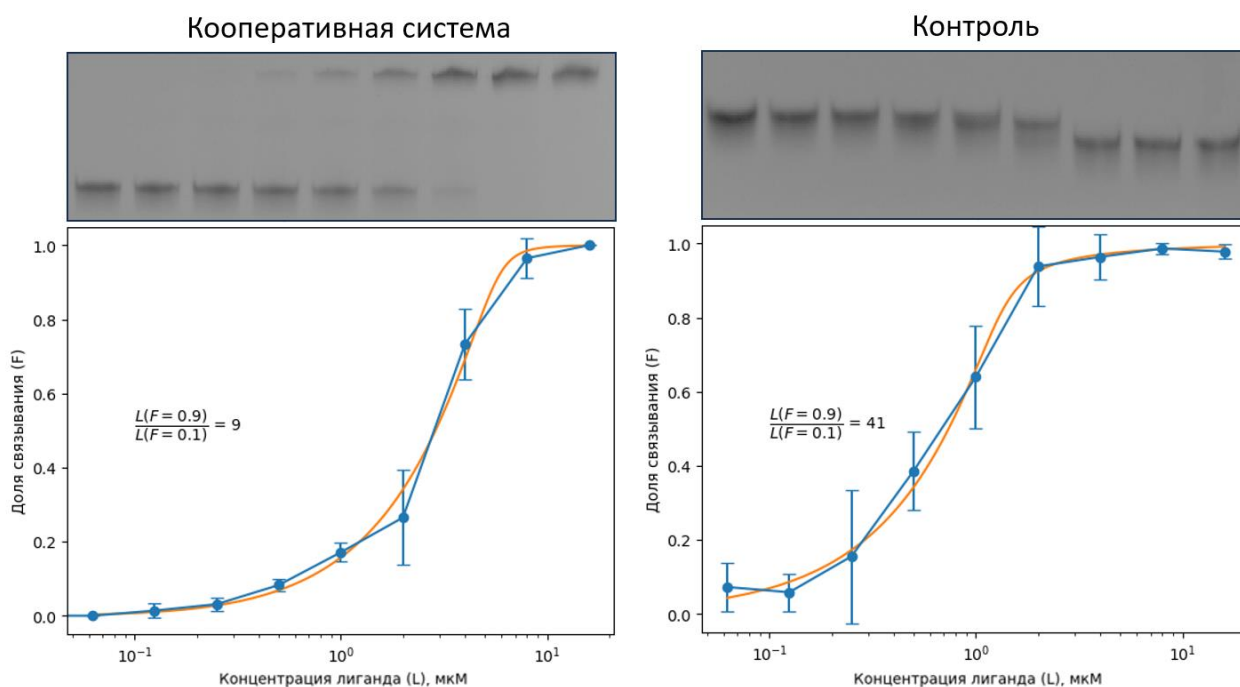


Рис. 4.4.3. Кривые связывания для контроля и исследуемой системы, полученные методом гель-шифта. Данные представлены в полулогарифмической шкале, по оси x отложена концентрация лиганда L в мкМ, по оси y – доля связывания. На графиках слева в центре показано рассчитанное значение параметра кооперативности. Каждая точка была измерена в трех независимых повторностях, усы соответствуют стандартному отклонению. Оранжевым показано фиттирование экспериментальных данных уравнением Хилла, R^2 для контроля составил 0.96, для исследуемой системы – 0.98. Над графиками показаны соответствующие изображения гелей, по которым производился расчет кривых. Положение полос геля соответствует экспериментальным точкам на графике.

В данном случае кооперативный эффект исследуемой системы был значимо выше по сравнению с контролем, в котором кооперативных эффектов практически не проявлялось.

Таким образом, получилось подтвердить способность спроектированных олигонуклеотидов *in vitro* к кооперативному взаимодействию.

5. Обсуждение

В данной работе был проведен теоретический анализ поведения молекулярных систем на основе олигонуклеотидов, в результате которого были найдены параметры системы, при которых наблюдается повышенный эффект кооперативности. Полученные данные для системы на рис. 4.1.1. хорошо соотносятся с теорией кооперативности (см. разд. 2.1). Так, в уравнении Хилла (2.1.9) эффект кооперативности описан, как одновременное связывание обоих лигандов с рецептором, в то время как в теории Полинга (2.1.13) эффект кооперативности обеспечивается за счет уменьшения константы диссоциации каждого последующего связывания лиганда. В анализируемой системе эффект кооперативности достигается похожим образом: связывание L_1 с R и связывание LR с L должно быть высоким, в то время как связывание первого лиганда должно быть слабее. Помимо этого, результат анализа хорошо совпадает с параметрами системы взаимодействующих олигонуклеотидов, разработанных Kandimalla (Kandimalla и др., 1995). Авторы экспериментальным путем подобрали олигонуклеотиды, при взаимодействии которых проявляются кооперативные эффекты, при этом, предсказанные константы равновесия разработанной ими системы соответствуют результатам теоретического анализа. Кривая связывания и параметры системы показаны на рис. 5.1.

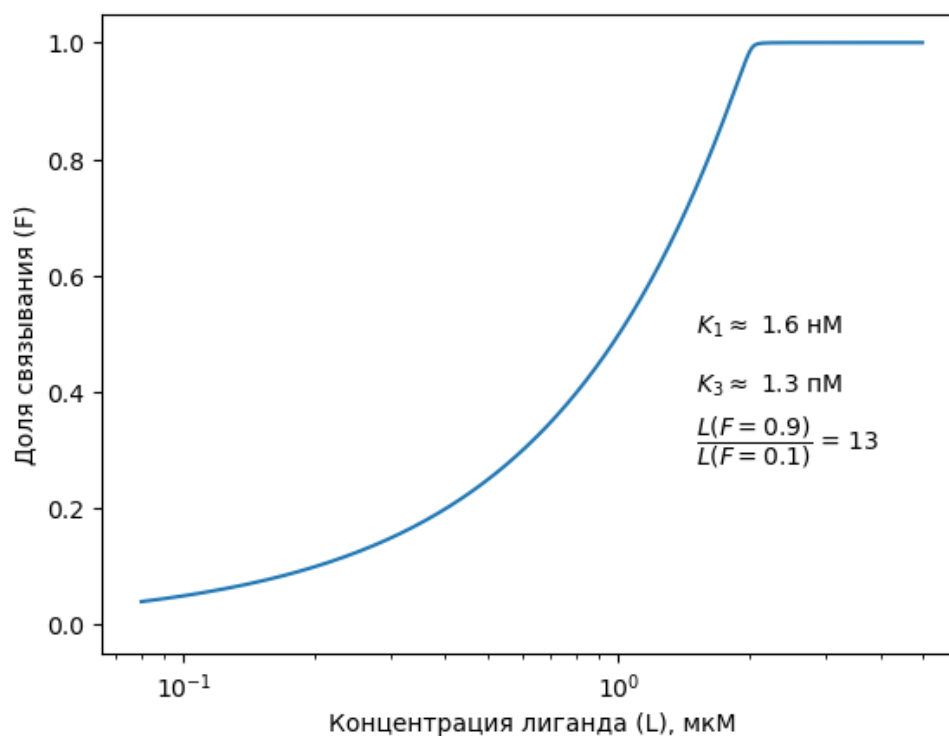


Рис. 5.1. Рассчитанная кривая связывания для системы Kandimalla в полулогарифмической шкале. По оси x отложена концентрация лиганда в мкМ, по оси y отложена доля связывания F. На правой части рисунка показаны рассчитанные константы равновесия и значения рассчитанного параметра кооперативности.

В качестве альтернативной молекулярной системы, в которой также могут проявляться кооперативные эффекты, был предложен дизайн, показанный на рис. 4.1.3. Если в первой системе эффект кооперативности достигался за счет вариации констант диссоциации, то в данном случае эффект кооперативности достигается, в первую очередь, за счет изменения конформации лигандов. Система задумана таким образом, что связывание лигандов между собой нивелировано за счет скрывания взаимодействующих доменов в петлю шпильки, а связывание первого лиганда с рецептором обеспечивается за счет короткого той-холда, в то время как связывание второго лиганда обеспечивается как за счет второго той-холда, так и петлевого домена взаимодействия с лигандом, тем самым удовлетворяя условиям эффекта кооперативности, облегчая связывания

второго лиганда с рецептором только в момент связывания первого. Действительно, теоретический анализ данной системы показал высокий уровень кооперативности, при этом система проявляет кооперативный эффект в широком диапазоне вариации констант диссоциации, в то время как для первой системы 4.1.1. кооперативные эффекты проявляются в более строгом диапазоне.

Для проверки эффективности проанализированной молекулярной системы были разработаны олигонуклеотиды, соответствующие указанным требованиям. Действительно, рассчитанный эффект кооперативности соответствовал предсказанному.

Далее разработанная система была проверена экспериментальным путем. Методом гель-электрофореза (рис. 4.3.1) получилось подтвердить предсказанное сервисом NUPACK комплексообразование в молекулярной системе в соответствии с системой 4.1.3. Однако, наблюдались некоторые отклонения от ожидаемых свойств системы. Так, лиганды L1 и L2 имели одинаковый размер и одинаковую вторичную структуру, но обладали разной полярностью, в случае L1 той-холд был расположен на 3'-конце, а в случае L2 – 5'-конца. Тем не менее, в геле они мигрировали на различное расстояние. Данный эффект может быть связан с физическими свойствами одноцепочечных концов исследуемых олигонуклеотидов. В то время как сами шпильки схожи по своим физическим свойствам, свободный 5'-конец L2 несет некомпенсированный двуцепочечной ДНК отрицательный заряд фосфата, в то время как 3'-конец L1 обладает нейтральным зарядом за счет гидроксильной концевой группы. Данные свойства отражаются на трехмерной структуре олигонуклеотидов, из-за наличия избыточного заряда L2 свободный хвост электростатически отталкивается от шпильки, тем самым увеличивая размер олигонуклеотида, в то время состояние L1 более компактно за счет меньшего заряда. Потенциальное отличие в размере молекул может объяснить данный эффект, однако, для его подтверждения требуется анализ изучаемой системы методами молекулярного моделирования, в

том числе алгоритмами крупнозернистого огрубленного моделирования oxDNA (Ouldrige, Louis, Doye, 2011).

Другое отклонение от ожидаемых результатов – различное сродство L1 и L2 к R при образовании комплекса LR. Комплекс L1 с R мигрирует медленнее, чем комплекс L2 с R, при этом интенсивность окрашивания полос также отличается. Примерная количественная оценка (см. рис. 4.3.2) соотношения свободной цепи R к LR для L1 составила 8 к 1, в то время как для L2 – 4 к 5. Несмотря на практически идентичные термодинамически предсказанные свойства последовательностей, оцененное сродство олигонуклеотидов отличалось от ожидаемых результатов, комплекс L2 с R образовывался гораздо эффективнее, нежели комплекс L1 с R. Полученные данные также могут быть объяснены различной полярностью последовательностей L1 и L2. Той-холд последовательности на 5'-конце обеспечивает более эффективный так называемый перекрестный стекинг (Šulc и др., 2015), при котором взаимодействуют диагонально расположенные основания в дцДНК. Большее сродство 5'-тойхолда к R-цепи и обеспечивает более эффективное комплексообразование.

Далее для исследуемой системы и контроля были получены кривые плавления (рис. 4.3.3). Для обеих систем предсказанные температуры плавления совпали с экспериментальными, однако, если смоделированная и экспериментальные кривые плавления для контроля практически совпали, экспериментальная кривая исследуемой системы оказалось значительно шире предсказанной сервисом. Данное явление объясняется тем, что при смешивании в эквимольных количествах взаимодействующих олигонуклеотидов не все вступают в образование третичного комплекса, что соответствует рис. 4.3.2. Соотношение R/LR/L2R составило 5/1/4, при том, что веб-сервисом NUPACK была предсказана полная гибридизация последовательностей. Отклонение экспериментальных данных от предсказанных также связано с изменённой кинетикой связывания L1 и L2 с R. Расширение кривой плавления в левую

сторону связано с наличием в растворе комплексов LR1 и LR2, обладающих меньшей температурой плавления, чем комплекс L2R, в то время как расширение кривой вправо объясняется наличием свободных шпилек, денатурирующих при более высокой температуре (пик плавления шпилек соответствуют предсказанному NUPACK небольшому пику, следующего за основным пиком плавления).

Для исследования систем на проявление эффектов кооперативности были получены кривые связывания лигандов L с цепью R. Сначала кривые связывания были получены методом измерения флуоресценции меченой и меткой, и гасителем цепи R для контроля и исследуемой системы. Оказалось, что и в случае контроля, и в случае исследуемой системы проявляется схожий эффект кооперативности, выраженный в виде коэффициента кооперативности $L_{0.9/0.1}$ (см. рис. 4.4.2) из чего следует, что наблюдаемый эффект объяснялся не свойствами взаимодействующих олигонуклеотидов, а свойствами цепи R. Действительно, для коротких олигонуклеотидных матриц характерен эффект кооперативного раскручивания, при котором связывание одного олигонуклеотида с комплементарной цепью упрощает связывание других олигонуклеотидов с данной цепью (Лохов и др., 1990; Koval и др., 1999; Mohammadi-Kambs, Ott, 2019).

Для решения этой проблемы была заказана расширенная цепь R, имеющая удлиненные концы, не участвующие в реакции. Для длинных цепей описанный эффект должен проявляться в меньшей степени. Для обновленной системы также были получены кривые связывания (рис. 4.4.3). При этом, эффект кооперативности исследуемой системы значительно превысил эффект кооперативности контроля. Также, полученный параметр значительно отличался от полученного для укороченной цепи R. Данное явление может быть связано с физическими свойствами длинной и короткой цепи ДНК. Длина персистентности оцДНК составляет примерно 2-3 нм (Chi, Wang, Jiang, 2013), из

чего следует, что короткая цепь ДНК является более жесткой, чем длинная цепь. Большая гибкость длинной матрицы упрощает взаимодействие L между собой, тем самым обеспечивая кооперативность системы. Однако, данная гипотеза также требует подтверждения результатами молекулярного моделирования.

6. Выводы

Теоретический анализ подтвердил возможность кооперативного взаимодействия в изученных молекулярных системах на основе олигонуклеотидов. На основе моделирования была разработана система олигонуклеотидов, которая продемонстрировала наличие кооперативных эффектов в заданном диапазоне концентраций и физико-химических условий. Разработанная система при экспериментальной проверке продемонстрировала предсказанные кооперативные эффекты, что открывает пути для дальнейшего использования системы в создании программируемых лекарств.

7. Список литературы

1. Лохов С. Г., Кошкин А. А., Кутявин И. В., и др. Влияние интеркалирующих красителей этидия и феназина, ковалентно присоединенных к 5'- или 3'-концу пентануклеотида d(pGAAAG), на термодинамику комплементарного и кооперативного взаимодействия // Биоорг. химия. 1990. Т. 21. № 3. С. 197–205.
2. Adair G. S. The osmotic pressure of hæmoglobin in the absence of salts // Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character. 1925.
3. Ashwood B., Jones M. S., Ferguson A. L., и др. Disruption of energetic and dynamic base pairing cooperativity in DNA duplexes by an abasic site // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2023. Т. 120. № 14. С. e2219124120.
4. Barth A., Kobbe D., Focke M. DNA–DNA kissing complexes as a new tool for the assembly of DNA nanostructures // Nucleic Acids Research. 2016. Т. 44. № 4. С. 1502.
5. Bergmann F. T., Hoops S., Klahn B., и др. COPASI and its Applications in Biotechnology // J Biotechnol. 2017. Т. 261. С. 215–220.
6. Bohr C. Die Sauerstoffaufnahme des genuinen Blutfarbstoffes und des aus dem Blute dargestellten Hämoglobins // Zentralblatt Physiol. 1904. № 23. С. 688–690.
7. Briskin D., Wang P. Y., Bartel D. P. The biochemical basis for the cooperative action of microRNAs // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020. Т. 117. № 30. С. 17764–17774.
8. Burmistrz M., Krakowski K., Krawczyk-Balska A. RNA-Targeting CRISPR–Cas Systems and Their Applications // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Т. 21. № 3. С. 1122.

9. Chi Q., Wang G., Jiang J. The persistence length and length per base of single-stranded DNA obtained from fluorescence correlation spectroscopy measurements using mean field theory // *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. 2013. T. 392. № 5. С. 1072–1079.

10. Dana H., Chalbatani G. M., Mahmoodzadeh H., и др. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA // *Int J Biomed Sci*. 2017. T. 13. № 2. С. 48–57.

11. Hertel S., Spinney R. E., Xu S. Y., и др. The stability and number of nucleating interactions determine DNA hybridization rates in the absence of secondary structure // *Nucleic Acids Res*. 2022. T. 50. № 14. С. 7829–7841.

12. Hill A. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves // *The Journal of Physiology*. 1910. T. 40. С. 4–7.

13. Kandimalla E. R., Manning A., Lathan C., и др. Design, biochemical, biophysical and biological properties of cooperative antisense oligonucleotides // *Nucleic Acids Research*. 1995. T. 23. № 17. С. 3578–3584.

14. Koval V. V., Lokteva ,Nadya A., Karnaukhova ,Svetlana L., и др. Cooperative Binding of Oligonucleotides to Adjacent Sites of Single-Stranded DNA: Sequence Composition Dependence at the Junction // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1999. T. 17. № 2. С. 259–265.

15. Langmuir I. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS. // *J. Am. Chem. Soc*. 1916. T. 38. № 11. С. 2221–2295.

16. MacFarlane L.-A., Murphy P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer // *Curr Genomics*. 2010. T. 11. № 7. С. 537–561.

17. Mariottini D., Idili A., Vallée-Bélisle A., и др. A DNA Nanodevice That Loads and Releases a Cargo with Hemoglobin-Like Allosteric Control and Cooperativity // *Nano Lett.* 2017. T. 17. № 5. C. 3225–3230.
18. Mohammadi-Kambs M., Ott A. DNA oligomer binding in competition exhibits cooperativity // *New J. Phys.* 2019. T. 21. № 11. C. 113027.
19. Morris K. V., Mattick J. S. The rise of regulatory RNA // *Nat Rev Genet.* 2014. T. 15. № 6. C. 423–437.
20. Ouldridge T. E., Louis A. A., Doye J. P. K. Structural, mechanical, and thermodynamic properties of a coarse-grained DNA model // *The Journal of Chemical Physics.* 2011. T. 134. № 8. C. 085101.
21. Pauling L. The Oxygen Equilibrium of Hemoglobin and Its Structural Interpretation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1935. T. 21. № 4. C. 186–191.
22. Perutz M. F. Hemoglobin structure and respiratory transport // *Sci Am.* 1978. T. 239. № 6. C. 92–125.
23. Rinaldi C., Wood M. J. A. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders // *Nat Rev Neurol.* 2018. T. 14. № 1. C. 9–21.
24. Scatchard G. THE ATTRACTIONS OF PROTEINS FOR SMALL MOLECULES AND IONS // *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1949. T. 51. № 4. C. 660–672.
25. Simon A. J., Vallée-Bélisle A., Ricci F., и др. Using the population-shift mechanism to rationally introduce “Hill-type” cooperativity into a normally non-cooperative receptor // *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014a. T. 53. № 36. C. 9471–9475.
26. Simon A. J., Vallée-Bélisle A., Ricci F., и др. Intrinsic disorder as a generalizable strategy for the rational design of highly responsive, allosterically

cooperative receptors // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014b. Т. 111. № 42. С. 15048–15053.

27. Statello L., Guo C.-J., Chen L.-L., и др. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions // Nat Rev Mol Cell Biol. 2021. Т. 22. № 2. С. 96–118.

28. Šulc P., Ouldrige T. E., Romano F., и др. Modelling Toehold-Mediated RNA Strand Displacement // Biophysical Journal. 2015. Т. 108. № 5. С. 1238–1247.

29. Yurke B., Mills A. P. Using DNA to Power Nanostructures // Genet Program Evolvable Mach. 2003. Т. 4. № 2. С. 111–122.

30. Zadeh J. N., Steenberg C. D., Bois J. S., и др. NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems // Journal of Computational Chemistry. 2011. Т. 32. № 1. С. 170–173.

31. Zeng Y., Monrichok A., Zocchi G. Bubble Nucleation and Cooperativity in DNA Melting // Journal of Molecular Biology. 2004. Т. 339. № 1. С. 67–75.

8. Приложения

Табл. 8.1. Используемые в работе последовательности олигонуклеотидов.

Последовательность (от 5' к 3' концу)	Название
CGGTTAGGTTGGTGGAGAGGTTGGTTGGTATTGG	R
(FAM)-CGGTTAGGTTGGTGGAGAGGTTGGTTGGTATTGG	FAM-R
(FAM)-CGGTTAGGTTGGTGGAGAGGTTGGTTGGTATTGG-(BHQ-1)	FAM-R-BHQ1
(FAM)- CGTGGTTTGGTATTGTGAGGTTGTGCGGTTAGGTTGGTTGGAGAGG TTGGTTGGTATTGGTGGTGGTGTGCGGTTAGTTGTTGATC	ExtR
CCAATACCAACCAACC	ctrlL1
CCAACCAACCTAACCG	ctrlL2
GGTTGGTTGGTGATGATGAGGCTTAATTCCAACCAACCTAACCG	L1
CCAATACCAACCAACCAATTAAAGCCCTCATCATCAGGTTGGTTGG	L2