

От изучения свойств к рациональному дизайну конструкций на основе нуклеиновых кислот

Ломзов А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

lomzov@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: производные и аналоги нуклеиновых кислот; гибридизационные свойства; термодинамика; структура; молекулярная динамика; прогностические модели

Мотивация и цель: Олигонуклеотиды широко используются в различных областях фундаментальных и прикладных исследований, в биотехнологических и биомедицинских применениях. Изменение свойств олигонуклеотидов для улучшения их потребительских качеств при решении разнообразных задач осуществляют путем выбора специфических нуклеотидных последовательностей, а в случае, если этого оказывается недостаточно, в структуру олигомеров вводят химические модификации. Такие модификации научились вводить в разнообразные положения нуклеотидной цепи: в гетероциклическое основание, остаток сахара или остаток фосфорной кислоты. Более того, возможно полное замещение таких фрагментов нуклеотидов, например, рибозофосфатного остова целиком [1, 2]. Уже разработано большое число таких модификаций, однако запрос на новые производные нуклеиновых (НК) кислот все еще сохраняется в связи с рядом причин, к которым можно отнести патентную закрытость, сложность или неудобство синтеза, высокую цену синтеза и др. Данная работа посвящена разработке методов анализа физико-химических свойств олигонуклеотидов с модифицированным рибозофосфатным остовом, а также созданию подходов и алгоритмов для прогностического расчета таких свойств.

Методы и алгоритмы: При выполнении исследований использован широкий спектр физико-химических методов исследований. Для изучения гибридизационных свойств олигонуклеотидов применяли метод термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. При исследовании структуры олигонуклеотидов и их комплексов использовали методы кругового дихроизма, флуоресцентной спектроскопии, ЯМР и ЭПР спектроскопии, метод задержки в геле, метод атомно-силовой микроскопии. Методы молекулярного моделирования применяли для изучения структуры и динамики биомолекулярных структур, а также для разработки подходов прогностического расчета гибридизационных свойств нуклеиновых кислот и их производных.

Результаты: Разработан ряд методов и подходов для изучения свойств производных нуклеиновых кислот. При разработке новых производных и аналогов НК зачастую сложно синтезировать протяженные цепи, содержащие модификации. Однако необходимо иметь инструменты изучения свойств таких соединений и оценки перспективности их применения. На примере глицин-морфолиновых олигонуклеотидов мы разработали подход для количественного определения их гибридизационных свойств. Метод позволяет количественно определять термодинамические параметры формирования комплексов производных с ДНК и/или РНК и, следовательно, перспективность дальнейшей

разработки таких соединений. Для этого необходимо использовать олигомеры, содержащие всего 5–6 мономерных звеньев или более [1]. Применимость данного метода была верифицирована и на ряде новых фосфорамидных бензоазольных производных олигонуклеотидов, которые мы недавно разработали [3, 4]. Исследование их свойств показало большие перспективы применения, в частности в области молекулярной диагностики [5]. В целом для фосфорамидных производных НК ведутся разработки их использования в области биомедицины. Для эффективного применения таких соединений нами проведено детальное исследование их свойств на примере фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (ФГО), несущих N,N-диметилимидазолидин-2-иминовую модификацию. В деталях изучены гибридизационные свойства ФГО и структуры их комплексов, в том числе методами структурного ЯМР и молекулярного моделирования [6–8]. На основании детального анализа их свойств разработан метод расчета гибридизационных свойств ФГО, содержащих любое число модификаций в различных положениях олигонуклеотидов при различной ионной силе раствора. Такие данные позволяют осуществлять рациональный дизайн структуры олигомеров, содержащих ФГ-группы, что может быть использовано в системах ПЦР диагностики.

Нами проведено исследование применимости ФГО и ФАО в качестве праймеров в системах аллель-специфической ПЦР, в том числе с использованием реальных образцов [4, 9]. Исследования показали большое преимущество использования фосфорамидных производных нуклеиновых кислот и способность их справиться с задачами, которые не могут решить нативные праймеры.

Несмотря на успех в разработках методов и полуэмпирических моделей для прогностического расчета свойств новых производных, их создание является чрезвычайно долгим, трудоемким и дорогостоящим. В связи с развитием компьютерных технологий, методов компьютерного моделирования и анализа мы попробовали использовать методы молекулярного моделирования для расчета гибридизационных свойств НК и их производных. Метод молекулярной динамики (МД) успешно применяют для исследования структуры и динамики комплексов НК, а полученные результаты оказываются очень близки к экспериментальным [10, 11]. Мы разработали подходы на основе МД моделирования для предсказания термодинамических параметров формирования комплексов нативных олигонуклеотидов. Их применение к производным и аналогам НК не дает такой же хорошей предсказательной способности [4, 9], однако позволяет оценить перспективность таких соединений с точки зрения структуры их комплексов с цепями НК и их гибридизационной способности.

Разработанные методы и подходы можно применять не только для дизайна коротких олигомеров, но и при построении супрамолекулярных конструкций. Нами проведено исследование формирования конкатемерных комплексов НК, а также формирования на их основе замкнутых кольцевых конструкций различной размерности и молекулярности. В рамках данных исследований обнаружена способность образования комплексов НК с различной геометрией и структурой парой или тройкой олигонуклеотидов. Установлены закономерности образования ДНК/ДНК, РНК/РНК и ДНК/РНК комплексов [12, 13]. Их формирование и динамика подтверждены набором физико-химических методов и подходов, а для доказательства молекулярности таких комплексов разработан оригинальный подход [12, 13]. Такие комплексы имеют перспективы для применения в качестве

усилителей в системах гибридизационного анализа, в системах доставки терапевтических нуклеиновых кислот в клетки и при решении других задач биомедицины.

Выводы: Таким образом, разработаны инструменты для изучения свойств производных нуклеиновых кислот, методы и подходы для создания прогностических моделей расчета их гибридизационных свойств как на основании экспериментальных данных, так и с использованием методов молекулярного моделирования.

Финансирование: Исследование поддержано проектами РНФ (№ 23-14-00358 и № 18-14-00357), государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1) и РФФИ (№ 19-34-90127 и № 20-04-00719).

From the study of properties to the rational design of structures based on nucleic acids

Lomzov A.

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia
lomzov@niboch.nsc.ru*

Key words: derivatives and analogues of nucleic acids; hybridization; thermodynamics; structure; molecular dynamics; predictive models

Motivation and Aim: Oligonucleotides are widely used in various areas of fundamental and applied research, in biotechnological and biomedical applications. Changing the properties of oligonucleotide to improve their consumer qualities in solving various tasks is carried out by selecting specific nucleotide sequences, and if this is not sufficient, chemical modifications are introduced into the oligomer structure. Such modifications learned to be introduced in various positions of the nucleotide chain: in the nucleobase, sugar or phosphate residue. Moreover, it is possible to completely replace such nucleotide fragments, for example, backbone [1, 2]. A large number of such modifications have already been developed, but the demand for new nucleic acid (NA) derivatives remains due to a number of reasons, including protection by patent law, the complexity or inconvenience of synthesis, the high cost of synthetics, etc. This work is devoted to the development of methods of analysis of the physico-chemical properties of oligonucleotide with modified backbone, as well as the developments of approaches and algorithms for prognostic calculation of such properties.

Methods and Algorithms: A wide range of physico-chemical methods of research were used in the study. The method of thermal denaturation with optical signal registration was used to analyze the hybridization properties of oligonucleotide. In the study of the structure of oligonucleotide and their complexes used methods of circular dichroism, fluorescent spectroscopy, NMR and EPR spectroscopy, the method of in gel electrophoresis, and atomic-force microscopy. Methods of molecular modeling have been used to study the structure and dynamics of biomolecular structures, as well as to develop approaches for the prognostic calculation of hybridization properties of nucleic acids and their derivatives.

Results: A number of methods and approaches have been developed to study the properties of nucleic acid derivatives. When developing new NA derivatives and analogues, it is often difficult to synthesize extended chains containing modifications. However, approaches must be available to study the properties of such compounds and to assess the prospects for their use. Using the example of glycine-morpholine oligonucleotide, we have developed a method to quantifying their hybridizing properties. The method allows to determine the thermodynamic parameters of the formation of complexes derivatives with DNA and/or RNA and, therefore, the prospect of further development of such compounds. To do this, oligomers containing only 5–6 or more monomer units [1] should be used. The applicability of this method has also been verified on a number of new phosphoramidate benzoazole oligonucleotide derivatives (PABAO), which we have recently developed [3, 4]. The study of their properties has shown great prospects of application, in particular, in the field of molecular diagnostics [5]. In general, development is under way for phosphoramidate derivatives in the field of biomedical applications. For the effective application of such compounds we have carried out a detailed examination of their properties on the example of phosphoryl guanidine oligonucleotide (PGO) carrying N,N-dimethylimidazolidine-2-amin modification(s). The hybridization properties of PGO and the structures of their complexes are studied in detail, including the methods of structural NMR and molecular modeling [6–8]. Based on a detailed analysis of their properties, a method has been developed to calculate the hybridization properties of PGOs containing any number of modifications in desired oligonucleotide positions at different ion strength of the solution. Such data enable rational design of the structure of oligomers containing PG groups, which can be used in PCR diagnostics.

We conducted a study of the applicability of PGO and PABAO as primers in allele-specific PCR systems, including using real samples [4, 9]. Studies have shown the great advantage of using phosphoramidate derivatives of nucleic acids in PCR diagnostics, and their ability to cope with challenges that native primers cannot solve.

Despite the success in developing methods and semi-empirical models for the prognostic calculation of the properties of new NA derivatives, their developments is extremely long, time-consuming and costly. In connection with the development of computer technologies, methods of computer modeling and analysis, we have tried to use methods for molecular modeling to calculate the hybridization properties of NAs and their derivatives. The method of molecular dynamics (MD) is successfully applied to the study of structure and dynamics of NA complexes, and the results on the structure and the dynamic of such complexes are very close to experimental [10, 11]. We have developed approaches, based on MD modeling, to predict the thermodynamic parameters of the formation of native oligonucleotide complexes. Their application to derivatives and analogues of NA does not give the same good predictive ability [4, 9], but allows to assess the prospects of such compounds in terms of the structure of their complexes with NA chains and their hybridization ability.

The methods and approaches developed can be applied not only for the design of short oligomers, but also for the construction of supramolecular structures. We conducted a study of the formation of concatemeric complexes of NA, as well as formation on their basis of closed ring structures of different size and molecularity. Within the framework of these studies, the ability to form complexes of NA with different geometry and structure by the pair or triple oligonucleotides has been discovered. The similarity in patterns of the formation of DNA/DNA, RNA/RNA and DNA/RNA complexes [12, 13]

have been established. Their formation and dynamics are confirmed by a set of physico-chemical methods and processes, and an original approach has been developed to prove the molecularity of such complexes [12, 13]. Such complexes have prospects for use as amplifiers in hybridization analysis systems, in therapeutic nucleic acid cell delivery systems and in other biomedical applications.

Conclusion: Thus, tools for the study of properties of nucleic acid derivatives, methods and approaches for the creation of prognostic models for the calculation of their hybridization properties have been developed, both on the basis of experimental data and molecular modeling method.

Funding: The study is supported by projects RSF (No. 23-14-00358 and No. 18-14-00357) by the Russian state funded project for ICBFM SB RAS (No. 121031300042-1) and RFBR (No. 19-34-90127 и No. 20-04-00719).

Список литературы/References

1. Golyshev V.M., Abramova T.V., Pyshnyi D.V., Lomzov A.A. A new approach to precise thermodynamic characterization of hybridization properties of modified oligonucleotides: Comparative studies of deoxyribo- and glycine morpholine pentaadenines. *Biophys Chem.* 2018;234:24-33. doi 10.1016/j.bpc.2017.12.004
2. Golyshev V.M., Abramova T.V., Pyshnyi D.V., Lomzov A.A. Structure and Hybridization Properties of Glycine Morpholine Oligomers in Complexes with DNA and RNA: Experimental and Molecular Dynamics Studies. *J Phys Chem B.* 2019;123(50):10571-10581. doi 10.1021/acs.jpcc.9b07148
3. Vasilyeva S.V., Baranovskaya E.E., Dyudeeva E.S., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. Synthesis of Oligonucleotides Carrying Inter-nucleotide N-(Benzoazole)-phosphoramidate Moieties. *ACS Omega.* 2023;8(1):1556-1566. doi 10.1021/acsomega.2c07083
4. Vasilyeva S.V., Baranovskaya E.E., Chubarov A.S., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. Phosphoramidate azole oligonucleotides, a method for the synthesis of phosphoramidate azole oligonucleotides and a method for template enzymatic DNA synthesis using them. Application for Russ. patent, priority dated 04/26/23. Reg. No. 2023110694
5. Chubarov A.S., Baranovskaya E.E., Ooscorbin I.P. et al. Phosphoramidate Azole Oligonucleotides for Single Nucleotide Polymorphism Detection by PCR. *Int J Mol Sci.* 2024;25(1):617. doi 10.3390/IJMS25010617
6. Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Dyudeeva E.S., Pyshnyi D.V. A Comparative Study of the Hybridization of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides with DNA and RNA. *Russ J Bioorganic Chem.* 2021;47(2):461-468. doi 10.1134/S1068162021020151
7. Lomzov A.A., Golyshev V.M., Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Structure and hybridization properties of phosphorylguanidine oligonucleotides. *J Biomol Struct Dyn.* 2019;37:83-84
8. Golyshev V.M., Pyshnyi D.V., Lomzov A.A. Effects of Phosphoryl Guanidine Modification of Phosphate Residues on the Structure and Hybridization of Oligodeoxyribonucleotides. *J Phys Chem B.* 2021;125(11):2841-2855. doi 10.1021/acs.jpcc.0c10214
9. Chubarov A.S., Ooscorbin I.P., Filipenko M.L., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. Allele-specific PCR for KRAS mutation detection using phosphoryl guanidine modified primers. *Diagnostics.* 2020;10(11):872. doi 10.3390/diagnostics10110872
10. Shevelev G.Y., Krumkacheva O.A., Lomzov A.A. et al. Physiological-temperature distance measurement in nucleic acid using triarylmethyl-based spin labels and pulsed dipolar EPR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 2014;136(28):9874-9877. doi 10.1021/ja505122n
11. Lomzov A.A., Sviridov E.A., Shernuykov A.V., Shevelev G.Y., Pyshnyi D.V., Bagryanskaya E.G. Study of a DNA duplex by nuclear magnetic resonance and molecular dynamics simulations. Validation of pulsed dipolar electron paramagnetic resonance distance measurements using triarylmethyl-based spin labels. *J Phys Chem B.* 2016;120(23):5125-5133. doi 10.1021/acs.jpcc.6b03193
12. Zamoskovtseva A.A., Golyshev V.M., Kizilova V.A., Shevelev G.Y., Pyshnyi D.V., Lomzov A.A. Pairing nanoarchitectonics of oligodeoxyribonucleotides with complex diversity: concatemers and self-limited complexes. *RSC Adv.* 2022;12(11):6416-6431. doi 10.1039/D2RA00155A
13. Kanarskaya M.A., Pyshnyi D.V., Lomzov A.A. Diversity of Self-Assembled RNA Complexes: From Nanoarchitecture to Nanomachines. *Molecules.* 2023;29(1):10. doi 10.3390/MOLECULES29010010/S1