

Курूसь Нина Николаевна

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ
ФОРМИРОВАНИИ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК МЕТОДАМИ АТОМНО-
СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И СКАНИРОВАНИЯ ЯВЛЕНИЙ ОТРЫВА

Специальность 1.3.8 – физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте физики полупроводников им. А.В. Ржанова
Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: **Милёхин Александр Германович**
доктор физико-математических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Головин Андрей Викторович**
доктор химических наук, профессор, заместитель декана
по научной работе факультета биоинженерии и
биоинформатики федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова»

Дунаевский Михаил Сергеевич
кандидат физико-математических наук, старший
научный сотрудник лаборатории оптики поверхности
федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Физико-технический институт имени А.Ф.Иоффе
РАН»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки «Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН».

Защита состоится 24.12.2024 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета на базе
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физики
полупроводников им. А. В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук по
адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 13.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института физики полупроводников им.
А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук:
<https://www.isp.nsc.ru/institut/dissertatsionnyj-sovet/zasedaniya/>

Автореферат разослан « » 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.ф.-м.н.

Погосов Артур Григорьевич

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Исследование физических свойств упорядоченных органических систем и их изменения при различных внешних воздействиях относится к числу актуальных вопросов физики конденсированного состояния. Примером подобных систем служат органические полимеры, такие как полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) является важнейшей биологической молекулой, выполняющей функцию хранения и передачи генетической информации. Ряд процессов, происходящих с её участием, сопровождается формированием и распадом двойной спирали. Изучение механизмов протекания этих реакций до сих пор остается актуальной и важной фундаментальной задачей, решение которой может привести к усовершенствованию методов молекулярной биологии, в том числе, методов секвенирования нуклеотидных последовательностей. Кроме того, анализ межмолекулярных взаимодействий является важнейшей задачей распознавания и детектирования органических веществ при разработке новых типов биосенсорных устройств. В этой связи, формирование системных представлений о денатурации двойной спирали является необходимым этапом при создании нового поколения устройств молекулярной диагностики.

Ключевым этапом в изучении механизмов денатурации ДНК является исследование кинетических и термодинамических параметров данного процесса. Методы калориметрии и термической денатурации с оптической регистрацией сигнала, широко применяемые со второй половины прошлого века в изучении нуклеиновых кислот, рассматривают лишь начальное и конечное состояние молекулы и позволяют определить разницу энергий между этими состояниями, но не несут информации о механизме перехода между ними. Поэтому данные методы наиболее широко используют при

исследовании термодинамической стабильности комплексов нуклеиновых кислот и конформационных изменений в их вторичных структурах [1-3]. Для изучения механизмов денатурации необходимо исследование энергетического профиля реакции: количества энергетических барьеров и их положений вдоль координаты реакции, энергий активации для состояний, а также кинетических констант, соответствующих переходам между ними.

Поэтому данные методы наиболее широко используют при исследовании термодинамической стабильности комплексов нуклеиновых кислот и конформационных изменений в их вторичной структуре [1-3]. Для изучения механизмов денатурации необходимо исследование энергетического профиля реакции: количества энергетических барьеров и их положений вдоль координаты реакции, энергий активации для состояний, а также кинетических констант, соответствующих переходам между данными состояниями.

Развитие метода атомно-силовой спектроскопии (АСС) [4-7] и появление таких инструментов как оптический [8,9] и магнитный пинцет [10-12], позволило перейти к манипулированию единичными молекулами или их комплексами. Так, возник подход, называемый динамической силовой спектроскопией, направленный на исследование прочности биомолекулярных комплексов под действием изменяющейся во времени внешней силы. Работы, опубликованные Р. Беллом (англ. Bell) и М. Эвансом (англ. Evans), явились первым теоретическим описанием термодинамических аспектов силовой спектроскопии [13,14]. Данная феноменологическая модель стала ключом к исследованию энергетических профилей диссоциации различных биомолекулярных комплексов, в том числе и двойной спирали ДНК. В последние годы наблюдается повышенный интерес к исследованию процессов, происходящих при механической диссоциации ДНК. Изучено влияние температуры, концентрации катионов в буферном растворе, длины и последовательности нуклеотидной цепи (процентного соотношения пар аденин/тимин (A/T) и гуанин/цитозин (G/C)) на силу разрыва молекулы. Опубликован и ряд работ, посвященных исследованию кинетических и

термодинамических параметров денатурации двойной спирали, образованной двумя короткими ДНК цепями (дуплекса) в различных режимах разрыва. Тем не менее, представленные на данный момент результаты обладают малой степенью общности, а иногда вступают в противоречие друг с другом в части числа энергетических барьеров, их положения и констант скорости реакций. В качестве одной из возможных причин подобных противоречий можно предположить расхождения в экспериментальных процедурах и диапазонах измерений параметров взаимодействия. Таким образом, необходимо более детальное и системное исследование влияния нуклеотидного состава и внешних факторов среды на параметры энергетического профиля диссоциации ДНК, полученные методами динамической силовой спектроскопии. В настоящей работе выполнено сопоставление данных о параметрах взаимодействия в двойных спиральных ДНК, полученных методами АСС и сканирования явлений отрыва (REVS), впервые примененного в подходе динамической силовой спектроскопии.

Цель диссертационной работы — исследование процесса денатурации молекулы ДНК посредством измерения сил разрыва при диссоциации цепей коротких ДНК/ДНК-комплексов.

Основные задачи работы

1. Определение механической и термодинамической стабильности модельных ДНК-комплексов в зависимости от степени комплементарности последовательностей, солевых условий среды, температуры, соотношения АТ/ГС пар оснований, степени комплементарности последовательностей.
2. Установление механизма и определение кинетических параметров реакций комплексообразования, таких как равновесная константа скорости диссоциации k_{diss} , равновесное время жизни комплекса τ и положение барьера вдоль координаты реакции Δx модельных олиго-дезоксирибонуклеотидов методами АСС и REVS.

3. Определение энергетических параметров механической денатурации модельных комплексов (энтальпий активации для каждого из энергетических барьеров) методами ACC и REVS.

Научная новизна:

1. Впервые показано, что метод REVS достоверен в исследовании энергетического профиля диссоциации биомолекулярного комплекса.
2. В исследовании профиля денатурации молекул ДНК впервые одновременно применены два физических метода: ACC и REVS, что позволило расширить динамический диапазон измерений и исследовать режимы диссоциации двойной спирали: сдвиговый, смешанный и режим с последовательным разделением нуклеотидов.
3. Экспериментально обнаружено присутствие двух энергетических барьеров на пути денатурации в сдвиговом режиме короткого ДНК/ДНК-дуплекса.

Научная и практическая значимость диссертационной работы

Исследования, выполненные в рамках данной диссертационной работы, имеют преимущественно фундаментальный характер и вносят существенный вклад в описание механизма диссоциации коротких ДНК дуплексов. Кроме того, полученные результаты обладают высокой значимостью для развития физических методов исследования термической денатурации и механической диссоциации двойной спирали ДНК. В то же время, представленные данные могут быть востребованы при разработке биосенсорных устройств, предназначенных для экспресс-анализа ДНК. Механизмы процессов формирования и распада двойной спирали ДНК, исследованные в работе, важны для разработки тест-систем экспресс диагностики патогенов, установления родства двух организмов и для анализа совпадения биологических образцов.

Методология и методы исследования

Предметом исследования являлись олиго-дезоксирибонуклеотиды длиной 20-30 пар оснований, синтезированные аминокислотным методом с

использованием автоматического синтезатора и выделенные методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФВЭЖХ).

В качестве основных методов исследования выступали атомно-силовая микроскопия, атомно-силовая спектроскопия и метод сканирования явлений отрыва на основе кварцевого резонатора (REVS).

Научные положения, выносимые на защиту

1. Механизм диссоциации дуплексов в методе атомно-силовой спектроскопии определяется рельефом подложки и поверхностной плотностью олигонуклеотидов на ней, задающих режим связывания при контакте с зондом. С ростом шероховатости поверхности подложки и поверхностной плотности олигонуклеотидов множественные связывания начинают доминировать над единичными.
2. Механическая денатурация двойной спирали ДНК в сдвиговом режиме описывается моделью трех состояний, включающих невозмущенную двойную спираль, “растянутую” конформацию и полностью диссоциированные олигонуклеотиды, что подтверждается наблюдением двух потенциальных барьеров в энергетическом профиле диссоциации.
3. Температура плавления единичных дуплексов олигонуклеотидов достоверно определяется с помощью метода динамической силовой спектроскопии путем измерения зависимости силы разрыва двойной спирали ДНК от температуры и согласуется с известными данными, полученными методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала.
4. Метод сканирования явлений отрыва позволяет исследовать кинетику диссоциации ДНК дуплексов: определить величины констант скорости ассоциации и диссоциации, эффективные времена жизни бимолекулярных комплексов и положение энергетических барьеров вдоль координаты реакции.

Достоверность результатов и апробация работы

Достоверность результатов, представленных в диссертации, обеспечивается использованием хорошо зарекомендовавших себя методов силовой

спектроскопии, таких как атомно-силовая спектроскопия и метод сканирования явлений отрыва REVS. Полученные результаты имеют высокую воспроизводимость и хорошо согласуются с теоретическими и экспериментальными данными, ранее опубликованными другими авторами.

Основные результаты, изложенные в диссертации, докладывались и обсуждались на 6 российских и международных конференциях: «Химическая биология», Новосибирск, 24-28 июля 2016 г, IX International Voevodsky Conference Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes, Novosibirsk, Russia, June 25-30, 2017, XXI International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia, Novosibirsk, Russia, 26-30 June 2017, 2-й Международный форум "Техноюнити- Электронно-лучевые технологии для микроэлектроники", Москва, Зеленоград, 9-12 октября 2017г, V Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск, 22-25 октября 2018г, VIII Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике на тему: «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем»/ ФГУБН Институт молекулярной генетики РАН- Москва, Звенигород, 2018, 19-23 ноября 2018г, а также на конкурсе научных работ молодых ученых ИФП СО РАН, на лабораторных семинарах. Результаты, представленные в диссертации, опубликованы в 5 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора

Все эксперименты по атомно-силовой спектроскопии, а также анализ и интерпретация полученных данных автором диссертации выполнены лично. Измерения методом сканирования явлений отрыва, обсуждение результатов и подготовка публикаций проводились совместно с соавторами. Представление результатов исследований на научных мероприятиях осуществлялось, преимущественно, автором диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации составляет 102 страницы, включая 49 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 64 наименования.

Основное содержание работы

Во введении обоснована актуальность темы исследования, описано текущее состояние научной проблемы и сформулированы цели и задачи диссертационной работы.

Первая глава представляет собой обзор литературы о методах силовой спектроскопии, применяемых в исследовании межмолекулярных взаимодействий в двойных спиралях ДНК. Особое внимание уделено роли методов ACC и REVS в данном направлении и преимуществам их совместного применения в исследовании механизмов механической диссоциации олигодезоксирибонуклеотидов [A1]. Обсуждаются опубликованные данные по силовой спектроскопии ДНК, в том числе параметры энергетического профиля диссоциации комплексов в зависимости от различных факторов, таких как нуклеотидный состав, длина молекулы и динамический диапазон измерения сил разрыва. Обсуждено текущее состояние исследуемой проблемы, и определено место данной диссертационной работы в ней.

Вторая глава посвящена описанию основных методов синтеза и выделения олигодезоксирибонуклеотидов, их иммобилизации на поверхность кварцевого резонатора, кремниевых подложек, покрытых золотом, и кремниевых зондов для ACC. Описана методика измерения сил разрыва методами ACC и REVS.

Модельные олигонуклеотиды (Таблица 1) были синтезированы в ИХБФМ СО РАН с помощью автоматического твердофазного фосфорамидитного метода синтеза с использованием стандартных коммерчески доступных синтонов. После синтеза олигонуклеотиды были выделены в индивидуальном виде методом (ОФВЭЖХ), их концентрация и термодинамические параметры

охарактеризованы методом УФ-спектроскопии. Их гомогенность подтверждена методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях (20% ПААГ, 8М мочевины).

Таблица 1 Нуклеотидные последовательности модельных олиго-дезоксирибонуклеотидов

Олигонуклеотид	Последовательность
ON1	3'-NH ₂ - CTA GAA AGC TTC GAT ACT AG-5'
ON2	3'-NH ₂ -CTA GTA TCG AAG CTT TCT AG -5'
ON2-B	3'-Biotin- CTA GTA TCG AAG CTT TCT AG-5'
ON3	3'-NH ₂ - CTA GTA TCG AAG CTT TCT CG -5'
ON4	3'- CTC GTA TCG AAG CTT TCT AG-NH ₂ -5'
ON5	3'- CTA GTA TCG AAG CTT TCT AG-NH ₂ -5'

Иммобилизацию модельных олигонуклеотидов на кремниевые зонды с коэффициентами жесткости с $k \sim 0,01$ Н/м выполняли с через силанольные химические группы путём обработки острия в растворе (3-Глицидилоксипропил) триметоксисилана. Модифицированные таким образом кремниевые зонды на 30 минут помещали в раствор олигонуклеотида, несущего на 3' конце аминогруппу. Иммобилизацию олигонуклеотидов производили в атмосфере аргона. По окончании процесса иммобилизации зонды промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, 1х, рН 7,0). Подготовленные зонды использовали немедленно.

Подложки для АСС были подготовлены путём электровакуумного осаждения на пластину кремния подслоя титана толщиной 20 нм и золота толщиной 100 нм.

Иммобилизацию олиго- дезоксирибонуклеотидов производили на подложки для АСС, химически модифицированных в спиртовом растворе 11-меркаптоундекановой кислоты (T_1) или в спиртовом растворе 11-меркаптоундекановой кислоты (T_1) и 11-меркапто-1-ундеканола (T_2) с соотношениями $T_1: T_2=1:1$, $1:10$ или $1:25$. В результате на поверхности золота формировался высокоупорядоченный [15] монослой тиолов с карбоксильными (T_1) и гидроксильными (T_2) функциональными группами.

Первые участвуют в ковалентной иммобилизации олигодезоксирибонуклеотидов, а вторые выполняют функцию «разбавления» карбоксильных групп и предназначены для уменьшения поверхностной плотности иммобилизованных олигонуклеотидов. Активацию карбоксильных групп проводили в растворах карбодиимида (EDC) и гидросукцинимиды (NHS) в буфере MES (pH 6,4). Затем образец в течение двух часов выдерживали в растворе олигонуклеотида, комплементарного иммобилизованному на кремниевом зонде. После этого промывали деионизованной водой (milliQ) и немедленно использовали. Химическая модификация кварцевых резонаторов и последующая иммобилизация олигонуклеотидов проводились в соответствии с описанным протоколом.

Морфологию подложек для АСС и кварцевых резонаторов изучали методом атомно-силовой микроскопии в контактном режиме и в режиме Scanasyt-air (Bruker, Германия). Сканирование образцов и силовые измерения производили на атомно-силовом микроскопе MultiMode8 производства компании Bruker. В работе использовали зонды Scanasyt-air and SNL-10 с коэффициентами жёсткости 0,4 и 0,24 Н/м, соответственно. Последующий анализ рельефа поверхности осуществляли с использованием программного обеспечения Nanoscope Analysis.

Измерения сил разрыва в требуемом диапазоне скоростей нагружения осуществлялось путём варьирования скорости отвода зонда от подложки в диапазоне 100-3000 нм/с. Скорость подвода зонда составляла 500 нм/с и оставалась постоянной в течение всего эксперимента. На каждой скорости отвода получали около 1000 силовых кривых, а затем для каждой из скоростей формировали выборку силовых кривых, на которых наблюдались явления разрыва ДНК дуплексов. Путём статистической обработки данной выборки определяли величину и погрешность измерения сил разрыва ДНК дуплекса.

Анализ силовых кривых производили с использованием программного обеспечения Force Reader (Корнеев Д.В., ФБУН ГНЦ ВБ). Типичная силовая

кривая, наблюдаемая при разрыве двойной спирали ДНК, представлена на Рис.1.

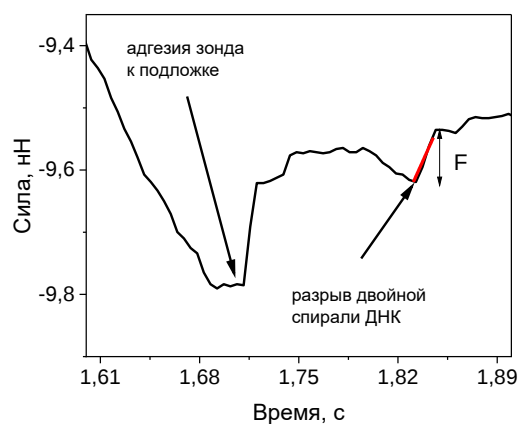


Рис. 1 Типичная силовая кривая вблизи точки контакта, наблюдаемая при разрыве двойной спирали ДНК в сдвиговом режиме методом АСС.

Для каждой кривой величину силы разрыва определяли по высоте пика, наблюдаемого в момент разрыва. Параметр скорости нагружения определяли по углу наклона силовой кривой в момент перед разрывом.

Для каждой из скоростей отвода зонда строили частотные распределения сил разрыва и скоростей нагружения. Количество интервалов разбиения определяли в соответствии с формулой $n = 1 + [3,322 \lg N]$, где n - число интервалов разбиения, N -количество точек в экспериментальной выборке.

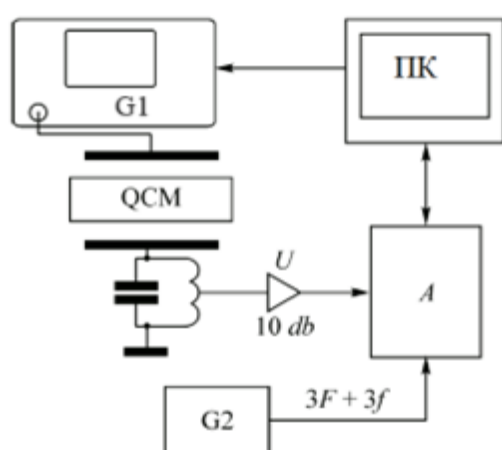
На основе статистически установленных наиболее вероятных значений силы разрыва строили зависимость её от скорости нагружения. Полученную зависимость аппроксимировали кривой вида $F = B \cdot \ln(R) + A$, где F - наиболее вероятная величина силы разрыва дуплекса [Н], R - скорость его нагружения [нН/с], $A = \frac{k_B T}{x_\beta} \cdot \ln\left(\frac{x_\beta}{k_{off} k_B T}\right)$ и $B = \frac{k_B T}{x_\beta}$, а затем использовали модель Белла-Эванса для расчёта параметров энергетического профиля денатурации [13]:

$$\Delta x = \frac{k_B T}{B}, [\text{нм}] \quad k_{diss} = \frac{1}{B} \exp\left(-\frac{A}{B}\right), [\text{с}^{-1}] \quad \tau = \frac{1}{k_{diss}}, [\text{с}]$$

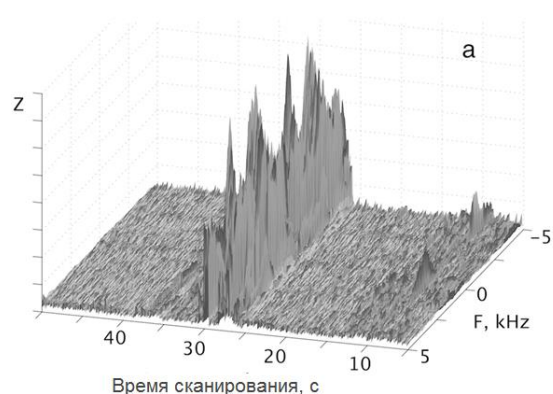
где Δx - положение барьера вдоль координаты реакции, k_{diss} – равновесная константа скорости диссоциации комплекса, τ - равновесное время жизни комплекса.

Измерения силы разрыва модельных ДНК дуплексов методом REVS проводили и использованием установки для сканирования явлений отрыва, созданной в ИФП СО РАН. Использовали измерительную схему с регистрацией характерного сигнала на третьей гармонике колебаний кварцевого резонатора (Рис.2а).

В работе использовали кварцевые резонаторы с резонансной частотой 14,5 МГц. Гармоническое напряжение U_0 , подаваемое с генератора (G), равномерно увеличивается от 0 до 7 В. При данных амплитудах напряжения происходит только диссоциация ДНК дуплексов. Время сканирования (нарастания напряжения) варьировали от 1 до 30с. С увеличением амплитуды напряжения растет амплитуда сдвиговых осцилляций поверхности кварцевого кристалла и происходит диссоциация ДНК дуплекса. В этот момент возникает характерный сигнал, снимаемый с фильтра, настроенного на третью гармонику в узкой полосе частот $\pm 5\text{кГц}$ (Рис.2). Далее сигнал поступает в устройство, выполняющее роль анализатора, соединенного с компьютером.



а



б

Рис. 2 Схема измерительной установки: G1 и G2- генераторы, А- анализатор, ПК- персональный компьютер (а) и характерный 3D-сигнал,

полученный при помощи анализатора в случае разрыва двойной спирали ДНК, сформированной комплементарными цепями.

Амплитуда сигнала дает информацию о количестве диссоциированных комплексов, а его положение по напряжению - величину силы разрыва комплекса.

Третья глава посвящена исследованию влияния различных факторов (концентрации катионов в буферном растворе, температуры, наличия однонуклеотидных несоответствий и режима разрыва) на прочность двойной спирали ДНК.

Была синтезирована система модельных олигодезоксирибонуклеотидов длиной 20 н.т., формирующих полностью комплементарные дуплексы или дуплексы с однонуклеотидными несоответствиями вблизи 3' или 5'-конца иммобилизованного олигонуклеотида. Для реализации двух различных режимов разрыва молекулы (сдвигового и режима с последовательным разделением нуклеотидов) варьировали положение концевой аминогруппы, с помощью которой осуществляли иммобилизацию олигонуклеотида на подложку для АСС или кварцевый резонатор.

Оценка эффективности иммобилизации олигонуклеотидов на подложке и их гибридизации с комплементарными молекулами была выполнена методом иммуноферментного анализа (ELISA). Критически важным фактором в исследовании механической диссоциации дуплексов методом АСС является плотность расположения олигонуклеотидов на поверхностях подложки и острия зонда АСМ.

Оценка поверхностной плотности олигонуклеотидов, выполненная с учётом:

- 1) поверхностной плотности целевых концевых химических групп (-COOH на подложке и -ОН на острие кремниевого зонда),

- 2) эффективности активации целевых концевых химических групп
- 3) эффективности ковалентного связывания с данными химическими группами олигодезоксирибонуклеотидов, несущих аминогруппу,
- 4) вероятности гибридизации комплементарных олигонуклеотидов (формирования двойной спирали) при контакте зонда с подложкой,

приводит к выводу о реализации явлений разрыва не более чем одной молекулы ДНК при каждом отводе зонда от подложки в эксперименте АСС.

В то же время, показано, что частотные распределения сил разрыва модельных дуплексов имеют двухмодовый характер, что указывает на реализацию процессов разрыва множественных связываний (нескольких дуплексов). Установлено, что к возникновению множественных связываний, вносящих критически значимый вклад в точность установления сил разрыва и, как следствие, параметров энергетического профиля механической диссоциации биомолекулярных комплексов, приводит зернистый рельеф поверхности кремниевой подложки, покрытой золотом [A2]. Предложена процедура подготовки гладких подложек для АСС, основанная на технологии Ленгмюра-Блоджетт, для измерения сил разрыва на уровне единичных молекулярных взаимодействий.

Исследовано влияние солевых условий среды на прочность ДНК дуплекса методом АСС в сдвиговом режиме. Показано, что уменьшение концентрации катионов (Na^+) в водной среде со 137 до 20 мМоль приводит к снижению детектируемой силы разрыва дуплекса на $18 \pm 1\%$ (с $61 \pm 1,7$ до $49,7 \pm 1,1$ пН).

Одной из ключевых задач данной работы является исследование влияния однонуклеотидных несоответствий в цепях ДНК на прочность двойной спирали. Ранее было показано, что нуклеотидные несоответствия вызывают термодинамическую и механическую дестабилизацию двойной спирали ДНК, вследствие чего наблюдается уменьшение силы её разрыва на $\approx 30 \pm 5\%$ [16]. При этом наиболее существенное снижение силы разрыва

наблюдалось для нуклеотидного несоответствия, расположенных у конца дуплекса, удаленного от поверхности кварцевого резонатора. В рамках диссертационной работы была поставлена задача исследовать, насколько сильным окажется влияние данного нуклеотидного несоответствия на прочность двойной спирали при разрыве в сдвиговом режиме методом АСС. Установлено, что внедрение однонуклеотидного несоответствия в нуклеотидную последовательность вызывает заметное (на 16 ± 1 %) снижение силы разрыва двойной спирали ДНК. Меньшее по сравнению с методом сканирования явлений отрыва (REVS) влияние мисматча на силу разрыва двойной спирали обусловлено именно механизмом диссоциации [A3]. В методе REVS механическая денатурация молекулы происходит в режиме, близком к режиму последовательного разделения нуклеотидов (unzippping, модель «застёжка-молния»), при реализации которого детектируемая величина силы разрыва всегда оказывается меньше, чем при реализации сдвигового режима. В этой связи дестабилизирующее влияние на дуплекс оказывается более существенным.

Исследована температурная зависимость силы разрыва двойной спирали с использованием методов REVS и АСС. Теоретические исследования, касающиеся денатурации ДНК под действием постоянной силы, предполагают наличие теплового равновесия между одноцепочечными и двухцепочечным состояниями и предсказывают существование энергетического барьера для диссоциации. Сила, прилагаемая к отдельным цепям дуплекса и необходимая для его диссоциации, уменьшается с ростом температуры и равна нулю в точке термической денатурации (температура плавления). В рамках диссертационной работы предложен метод определения температуры плавления ДНК методами REVS и АСС, предполагающий измерение силы разрыва молекулы при разных температурах среды с последующей экстраполяцией температурной зависимости силы разрыва к нулевой величине силы (Рис. 3) [A4]. Точка пересечения графика со шкалой

температуры с высокой точностью определяет величину температуры плавления ДНК, что подтверждается данными калориметрических измерений.

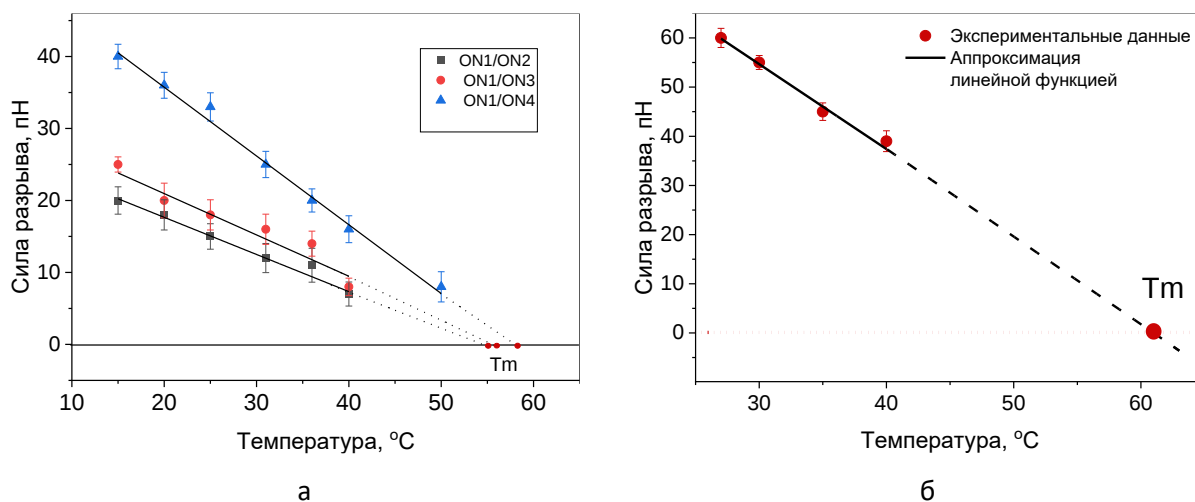


Рис. 3 Температурная зависимость силы разрыва модельных ДНК дуплексов, измеренная с помощью метода REVS (а) и ACC (б): ON1/ON2 (комплементарные), ON1/ON3 (мисматч), ON1/ON4 (мисматч).

В четвертой главе представлены результаты исследования энергетических профилей механической денатурации модельных ДНК/ДНК-комплексов.

Энергетические профили денатурации модельных ДНК/ДНК-комплексов исследовали методом ACC в сдвиговом режиме (shearing) и в режиме с последовательным разделением нуклеотидов (unziping) путём измерения зависимости сил разрыва комплексов от скорости нагружения. При механической диссоциации в сдвиговом режиме (Рис. 4а) на графике зависимости силы разрыва дуплекса от логарифма скорости его нагружения $F(\ln R)$ можно выделить два участка разными значениями наклона и свободного члена линейной зависимости. Это указывает на присутствие двух потенциальных барьеров при денатурации модельного ДНК дуплекса [АЗ]. Таким образом, механическая диссоциация ДНК дуплекса может быть описана моделью трёх состояний. Ранее в подобных исследованиях сообщалось о присутствии лишь одного барьера при денатурации олигодезоксирибонуклеотидов (модель двух состояний) [4, 17-20].

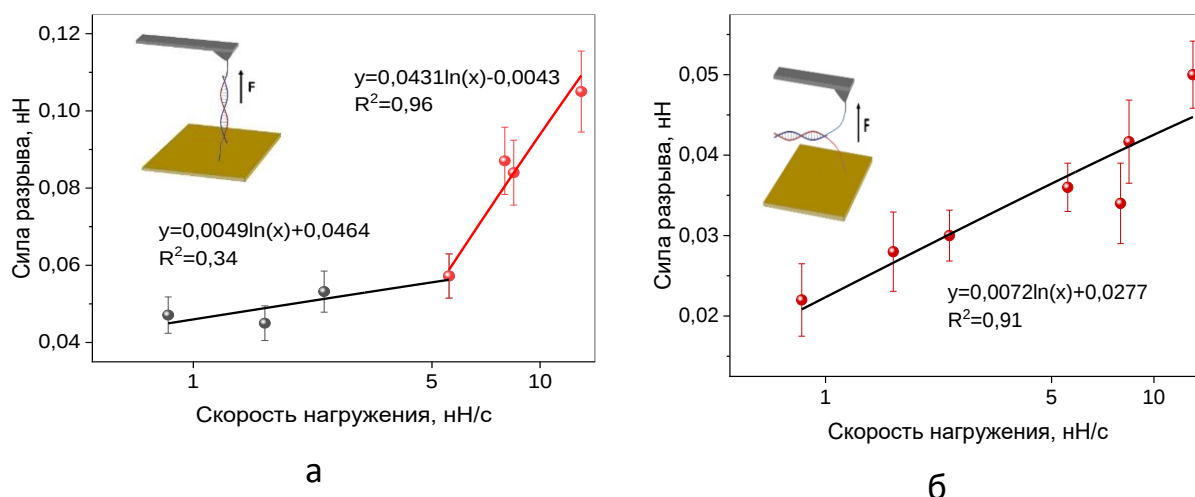


Рис. 4 Характерные зависимости силы разрыва дуплекса ДНК длиной 20 пар оснований от скорости нагружения, измеренные методом АСС в сдвиговом режиме (а) и в режиме с последовательным разделением нуклеотидов (б).

Определены параметры энергетического профиля диссоциации (положения барьеров вдоль координаты реакции Δx , константа скорости диссоциации k_{diss} и равновесное время жизни состояния τ) для каждого из участков кривой. На основе выполненных оценок предложена интерпретация трёх состояний как двойная спираль, «растянутая» двойная спираль и полностью диссоциированные олигонуклеотиды, при этом первый барьер связан с растяжением спирали, а второй — с разрывом водородных связей между цепями. Зависимость силы разрыва от скорости нагружения, измеренная в режиме с последовательным разделением нуклеотидов с высокой достоверностью аппроксимируется линейной функцией, что указывает на преодоление единичного потенциального барьера при механической диссоциации дуплекса.

Исследовано влияние нуклеотидного состава на параметры энергетического профиля диссоциации ДНК дуплексов методами АСС и REVS на примере модельной системы комплементарных и содержащих однонуклеотидное несоответствие олигомеров длиной 30 нуклеотидов, с

последовательностями, содержащими АТ- GC- богатые концевые участки длиной 5 пар оснований.

Исследование энергетических профилей диссоциации данных дуплексов методом АСС в сдвиговом режиме обнаружило, что внедрение однонуклеотидного несоответствие в термодинамически стабильный GC- богатый конец молекулы влияет на положение барьера (Δx_2) вдоль координаты реакции, уменьшая его с $0,79 \pm 0,02$ нм до $0,73 \pm 0,1$ нм. Данная тенденция хорошо согласуется с имеющимися представлениями о том, что мисматч в термодинамически более стабильном участке последовательности существенно дестабилизирует молекулу, что проявляется в уменьшении расстояния до энергетического барьера.

Обнаружено, что внедрение мисматча в GC-богатый конец заметно снижает стабильность ДНК дуплекса, что проявляется в виде увеличения на $10 \pm 0,1\%$ константы скорости диссоциации при преодолении второго барьера. Однонуклеотидное несоответствие в АТ-богатом конце в меньшей степени влияет на кинетику диссоциации молекулы. Соответственно, экспериментально установленное значение времени жизни τ максимально для комплекса полностью комплементарных олигонуклеотидов. При внедрении однонуклеотидного несоответствия время жизни снижается тем сильнее, чем более дестабилизирующим оказывается влияние этого несоответствия на дуплекс. Впервые получены константы скорости реакции диссоциации, связанные с растяжением двойной спирали. Показано, что данные константы одинаковы для всех исследованных комплексов: $k_{\text{off}} \sim 10 \pm 1 \text{ с}^{-1}$ для всех исследованных комплексов.

В рамках данной диссертационной работы метод REVS впервые применен в исследовании энергетического профиля диссоциации ДНК дуплекса [A5]. Представленная на Рис. 5 типичная зависимость $F(\ln R)$ в диапазоне низких скоростей нагружения имеет вид горизонтальной линии.

Подобный характер зависимости указывает на наблюдение равновесного режима, когда внешнее воздействие слишком мало для уменьшения высоты потенциального барьера и увеличения вероятности разрыва. В этом случае прикладываемая механическая сила не влияет на кинетику процесса денатурации. В диапазоне скоростей нагружения ($1 \cdot 10^{-4} \div 1 \cdot 10^{-3}$ нН/с) зависимости аппроксимируются кривыми линейной функции вида $F=B \cdot \ln(R)+A$.

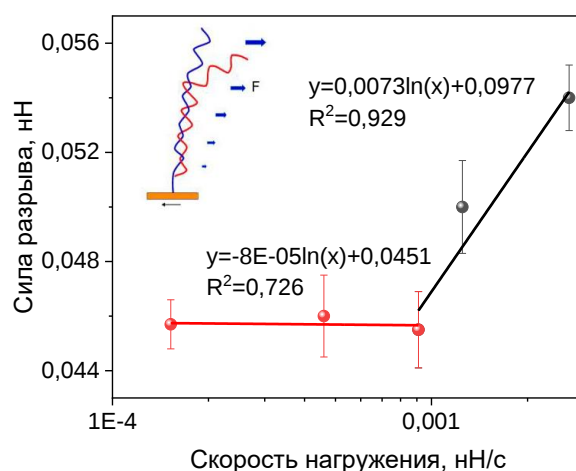


Рис. 5 Характерная зависимость силы разрыва от скорости нагружения, измеренная методом REVS.

Полученные значения параметров энергетического профиля диссоциации дуплекса, сформированного полностью комплементарными цепями, $\Delta x = 0.56 \pm 0.014$ нм, $k_{\text{off}} = (2.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, $\tau = 4740 \pm 9$ с хорошо согласуются с опубликованными к настоящему моменту данными по механизму последовательного разделения нуклеотидов (англ.-“unzipping”).

Механическая денатурация модельных ДНК/ДНК-комплексов в методе REVS протекает с преодолением единичного потенциального барьера. Параметры этого барьера и кинетики его преодоления сопоставимы с параметрами энергетического профиля диссоциации в сдвиговом режиме АСС. При этом отличие положения барьера Δx от значения Δx_2 , измеренного в сдвиговом

режиме, обусловлено именно разницей в механизмах разрыва. Таким образом, механическая диссоциация в методе REVS происходит в смешанном режиме, промежуточном между сдвиговым и режимом последовательного разделения нуклеотидов. В отличие от сдвигового режима, в случае последовательного разделения нуклеотидов внешняя сила распределяется по первым нескольким парам оснований. Однонуклеотидное несоответствие, расположенное вдали от поверхности кварцевого резонатора, в данном случае вносит существенный вклад в снижение стабильности комплекса.

Заключение

1. Показано, что рельеф слоя золота, формируемого на подложках и предназначенного для иммобилизации биомолекул, влияет на результаты атомно-силовой спектроскопии. Установлено, что зернистый рельеф поверхности золота приводит к возникновению множественных связываний, что вносит критически значимый вклад в точность установления сил разрыва и, как следствие, параметров энергетического профиля механической диссоциации биомолекулярных комплексов. Предложена процедура подготовки гладких подложек для АСС, основанная на технологии Ленгмюра-Блоджетт для обеспечения измерения сил разрыва на уровне единичных молекулярных взаимодействий.
2. Установлено, что внедрение однонуклеотидного несоответствия в последовательность приводит к снижению прочности дуплексов ДНК длиной 20 пар оснований примерно на 16% при механической денатурации в сдвиговом режиме.
3. Показано, что методы АСС и REVS являются альтернативой УФ-спектроскопии и калориметрии при измерении температуры плавления двойной спирали ДНК. Кроме того, метод АСС позволяет выполнить анализ единичных молекул.
4. Установлено, что денатурация двойной спирали ДНК в сдвиговом режиме протекает с преодолением двух потенциальных барьеров,

первый из которых связан с растяжением двойной спирали ДНК, а второй - с разрывом водородных связей между цепями.

5. Показано, что внедрение мисматча в термодинамически более стабильный конец последовательности на порядок увеличивает константу скорости диссоциации молекулы ДНК в сдвиговом режиме относительно дуплекса, сформированного комплементарными олигонуклеотидами.
6. Подтверждена возможность наблюдения методом АСС метастабильных состояний на энергетическом профиле денатурации в режиме с последовательным разделением нуклеотидов на примере ДНК/ДНК-комплекса длиной 30 пар оснований, содержащего десятинуклеотидное выпетливание.

Публикации по теме диссертации

Статьи в периодических научных изданиях:

[A1] Kurus N. N. Measurement of the unwinding force of a DNA double helix / Kurus N. N., Dultsev F. N. //Journal of Structural Chemistry. – 2017.– Т. 58. – С. 315-339. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0022476617020135>

[A2] Kurus N. N. et al. Effect of the relief on the measurement of bond rupture force with the help of AFM: the dynamics of interaction and optimization of the procedure / Kurus, N. N., Dultsev, F. N., Shevelev, G. Y., Lomzov, A. A., & Pyshnyi, D. V. //Analytical Methods. – 2018. – Т. 10. – №. 28. – С. 3498-3505.

[A3] Kurus N. N., Dultsev F. N. Determination of the Thermodynamic Parameters of DNA Double Helix Unwinding with the Help of Mechanical Methods //ACS Omega. – 2018. – Т. 3. – №. 3. – С. 2793-2797

[A4] Dultsev F. N. Temperature dependence of unwinding forces between complementary oligonucleotides / Dultsev F. N., Kurus N. N //Journal of microbiological methods. – 2017. – Т. 143. – С. 94-97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.011>.

[A5] Kurus N. N. et al. A QCM-based rupture event scanning technique as a simple and reliable approach to study the kinetics of DNA duplex dissociation // *Analytical Methods*. – 2020. – Т. 12. – №. 30. – С. 3771-3777.

Тезисы докладов и труды конференций:

[A6] Измерение силы разрыва молекулы ДНК методом атомно-силовой спектроскопии / Курусь Н.Н., Дульцев Ф.Н., Шевелев Г.Ю., Ломзов А.А., Пышный Д.В. / *Химическая биология: материалы международной конференции* / Российская академия наук и др. – Новосибирск, 2016. – с. 195

[A7] Nina N. Kurus Investigation of the energy profile of helix unwinding in DNA by means of atomic force spectroscopy / Nina N. Kurus, Georgiy Yu. Shevelev // *IX International Voevodsky Conference Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes* / V.V. Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, SB RAS – Novosibirsk, Russia, 2017. – p. 137

[A8] Исследование кинетики гибридизации олигодезоксирибонуклеотидов методом VFDM/ Дюдеева Е.С., Курусь Н.Н., Дульцев Ф.Н., Ломзов А.А., Шевелёв Г.Ю., Пышный Д.В./ *VIII Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике на тему: «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем»*/ ФГУБН Институт молекулярной генетики РАН- Москва, Звенигород, 2018 (19-23 ноября 2018г.).

[A9] Использование кварцевого резонатора для определения термодинамических параметров механической денатурации двойной спирали ДНК / Некрасов Д.В., Курусь Н.Н., Дульцев Ф.Н., Ломзов А.А., Шевелёв Г. Ю., Пышный Д.В./ *VIII Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике на тему: «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем»*/ ФГУБН Институт молекулярной генетики РАН- Москва, Звенигород, 2018 (19-23 ноября 2018г.).

Список литературы

- 1) Wartell R. M., Benight A. S. Thermal denaturation of DNA molecules: a comparison of theory with experiment //Physics Reports. – 1985. – Т. 126. – №. 2. – С. 67-107.
- 2) Grosschedl R., Hobom G. DNA sequences and structural homologies of the replication origins of lambdoid bacteriophages //Nature. – 1979. – Т. 277. – №. 5698. – С. 621.
- 3) Marky L. A. et al. Calorimetric and spectroscopic investigation of the helix-to-coil transition of the self-complementary deoxyribonucleotide ATGCAT //Biophysical chemistry. – 1981. – Т. 13. – №. 2. – С. 141-149
- 4) Strunz T. et al. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – Т. 96. – №. 20. – С. 11277-11282.
- 5) Noy A. et al. Stretching and breaking duplex DNA by chemical force microscopy //Chemistry & biology. – 1997. – Т. 4. – №. 7. – С. 519-527.
- 6) Krautbauer R., Rief M., Gaub H. E. Unzipping DNA oligomers //Nano Letters. – 2003. – Т. 3. – №. 4. – С. 493-496.
- 7) Lee G. U., Chrissey L. A., Colton R. J. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA //Science. – 1994. – Т. 266. – №. 5186. – С. 771-773.
- 8) Wang M. D. et al. Stretching DNA with optical tweezers //Biophysical journal. – 1997. – Т. 72. – №. 3. – С. 1335-1346.
- 9) Bockelmann U. et al. Unzipping DNA with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips //Biophysical journal. – 2002. – Т. 82. – №. 3. – С. 1537-1553.
- 10) Haber C., Wirtz D. Magnetic tweezers for DNA micromanipulation //Review of Scientific instruments. – 2000. – Т. 71. – №. 12. – С. 4561-4570.

- 11) Chiou C. H. et al. New magnetic tweezers for investigation of the mechanical properties of single DNA molecules //Nanotechnology. – 2006. – T. 17. – №. 5. – C. 1217.
- 12) Zlatanova J., Leuba S. H. Magnetic tweezers: a sensitive tool to study DNA and chromatin at the single-molecule level //Biochemistry and cell biology. – 2003. – T. 81. – №. 3. – C. 151-159.
- 13) Evans E., Ritchie K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds //Biophysical journal. – 1997. – T. 72. – №. 4. – C. 1541-1555.
- 14) Merkel R. et al. Energy landscapes of receptor–ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy //Nature. – 1999. – T. 397. – №. 6714. – C. 50.
- 15) Lee J. W. et al. Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody //Biosensors and Bioelectronics. – 2005. – T. 20. – №. 7. – C. 1422-1427.]
- 16) Dultsev F. N. et al. QCM-based rupture force measurement as a tool to study DNA dehybridization and duplex stability //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2017. – T. 409. – №. 4. – C. 891-901.
- 17) Williams P. M. Analytical descriptions of dynamic force spectroscopy: behaviour of multiple connections //Analytica Chimica Acta. – 2003. – T. 479. – №. 1. – C. 107-115.
- 18) Mosayebi M. et al. Force-induced rupture of a DNA duplex: from fundamentals to force sensors //ACS nano. – 2015. – T. 9. – №. 12. – C. 11993-12003.
- 19) Morfill J. et al. BS transition in short oligonucleotides //Biophysical journal. – 2007. – T. 93. – №. 7. – C. 2400-2409.
- 20) Zhang J. et al. Dynamic Melting Properties of Photoswitch-Modified DNA: Shearing versus Unzipping //The Journal of Physical Chemistry B. – 2016. – T. 120. – №. 41. – C. 10706-10713.