

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН)

Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения Российской
академии наук – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
(ИФ СО РАН)

На правах рукописи



Щугорева Ирина Андреевна

**Моделирование структуры и свойств
синтетических олигомеров методами теории функционала плотности**

Специальность 1.3.8.

Физика конденсированного состояния

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Томилин Ф.Н.

Красноярск – 2023

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Характеристика объектов исследования	11
1.1 Биосенсоры на основе синтетических олигомеров	11
1.2 Аптамеры. Общая характеристика	13
1.2.1 Определение пространственной структуры аптамеров	14
1.3 Сопряженные полимеры. Общая характеристика	18
1.3.1 Сопряженные полимеры на основе флуорена	20
Глава 2. Методы теоретического исследования структуры и свойств синтетических олигомеров	23
2.1 Метод теории функционала плотности	23
2.2 Метод функционала электронной плотности в приближении сильной связи	25
2.3 Функционал плотности для нестационарных систем	27
2.4 Приближения в рамках теории функционала плотности	29
2.5 Метод фрагментации молекулярных орбиталей	30
2.6 Основные принципы метода молекулярной динамики	34
2.6.1 Силовые поля	35
Глава 3. Моделирование атомной и электронной структуры олигомеров на основе флуорена	39
3.1 Алгоритм расчётов	39
3.2 Анализ электронной структуры, спектров поглощения синтетических олигомеров с различным числом звеньев бензотиазола	42
3.3 Анализ электронной структуры, спектров поглощения синтетических олигомеров с различными алкильными заместителями	46
Глава 4. Моделирование атомной структуры ДНК-аптамеров	48
4.1 Моделирование пространственной структуры аптамера RE-31	49
4.2 Моделирование пространственной структуры аптамера LC-18t	52
4.2.1 Алгоритм расчетов	53

4.2.2	Верификация теоретических моделей с помощью МУРР	58
4.3	Моделирование пространственной структуры аптамера Gli-233	61
4.4.	Моделирование пространственной структуры аптамера Gli-55	64
4.4.1	Молекулярное моделирование квадруплекса аптамера Gli-55	67
4.4.2	Верификация теоретических моделей с помощью МУРР	68
4.4.3	Укорачивание нуклеотидной последовательности аптамера Gli-55	71
4.4	Моделирование пространственной структуры аптамера Apt-31	75
	Заключение	79
	Список работ, опубликованных автором по теме диссертации	81
	Список сокращений	83
	Благодарности	85
	Список литературы	86

Введение

Актуальность темы.

Во всем мире проводятся интенсивные исследования по разработке быстрых, простых и чувствительных сенсоров для медицинской диагностики и биомедицинских исследований. На сегодняшний день существует огромное количество разнообразных биосенсоров в основе работы которых лежит молекулярное распознавание и его преобразование в измеримый результат. Тест-системы отличаются по способу преобразования сигнала, его детектирования и типу рецептора [1]. В последнее время, среди всех возможных рецепторов для молекулярного распознавания наибольший интерес вызывают синтетические одноцепочечные РНК или ДНК олигонуклеотиды, называемые аптамерами. Прежде всего они интересны тем, что способны связываться с различными ионами металлов, аминокислотами, белками и даже клетками с высокой аффинностью и специфичностью благодаря образованию уникальной трёхмерной структуры [2]. Однако для создания эффективного биосенсора на их основе необходимы адекватные элементы для преобразования события связывания в физически измеримый сигнал. Так, например, связывание аптамера с белком-мишенью было обнаружено с помощью ковалентно связанных с аптамером люминесцентных меток [3]. Однако стоит отметить, что добавление меток из различных функциональных групп может поставить под угрозу связывающие свойства аптамеров. В связи с этим, перспективным видится применение оптически активных молекул, которые не будут ковалентно связаны с аптамером. Совместное пребывание в растворе положительно заряженных оптически активных полимеров и отрицательно заряженных аптамеров приводит к образованию полиэлектролитных комплексов, что в свою очередь вызывает значительное тушение люминесценции полимеров. При появлении мишеней аптамеров интенсивность люминесценции сопряженных полимеров усиливается, поскольку аптамер предпочтет связываться с белком-мишенью [4].

Одним из перспективных кандидатов на роль оптически активных полимеров является водорастворимые сопряженные сополимеры на основе флуорена, которые активно применяются в оптоэлектронике. Данный класс полимеров обладает высоким квантовым выходом люминесценции, а длина волны излучения может быть настроена путем добавления различных заместителей в основную или боковую цепь. Более того, изменяя заместители в боковой цепи, можно контролировать растворимость в различных растворителях и заряд полимера в целом. Полимеры на основе флуорена способны специфически преобразовывать событие связывания аптамера с его мишенью в четкий оптический сигнал [5]. Такой, быстрый, чувствительный и селективный метод не требует какой-либо сложной химической модификации аптамеров.

Однако сдерживающим фактором создания биосенсоров на основе двух этих соединений является высокая сложность и длительность синтеза сополифлуоренов и невозможность получения точной структуры аптамеров кристаллографическими методами и, как следствие, непонимание фундаментальных основ взаимодействия аптамер-мишень. В связи с этим видится перспективным применение методов молекулярного моделирования к этим проблемам. Для сополифлуоренов это позволит установить влияние различных заместителей на оптические свойства и будет способствовать их целенаправленному синтезу. А для аптамеров – поможет установить пространственную структуру, на основе которой возможно проведение различных модификаций с целью повышения связывающей способности и специфичности.

За последние десятилетия произошёл рост вычислительных ресурсов и развитие методов моделирования многоатомных систем, что позволило изучать физические свойства объектов, содержащих свыше тысячи атомов, в том числе макромолекул [6]. Методы развивались сразу в нескольких направлениях, одни шли на уточнение (увеличение точности описания) электронных, оптических, колебательных свойств относительно простых упорядоченных систем или небольших молекул, другие на увеличение предельных размеров описываемых систем с простыми типами взаимодействия внутри [7]. На сегодняшний день

имеется широкий спектр методов молекулярного моделирования начиная с высокоточных квантовохимических методов – метода связанных кластеров (Coupled cluster) [8], до молекулярнодинамических методов – крупнозернистого моделирования (Coarse-grained modeling) [9]. Такой широкий спектр методов даёт понимание свойств самых разнообразных соединений ещё до их синтеза, что в дальнейшем способствует сокращению временных и финансовых затрат на разработку новых устройств, таких как биосенсоры.

Исходя из вышесказанного, **целью** диссертационной работы является определение физических свойств функциональных органических олигомеров, применяемых в биосенсорах, методами молекулярного моделирования.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1. Установить влияние заместителей в основной и боковой цепи на оптические свойства олигомеров флуорена.
2. Восстановить пространственную структуру коротких синтетических олигонуклеотидов RE-31, Gli-55, Gli-233, Apt-31, LC-18t на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния с помощью квантовохимических и молекулярнодинамических методов.
3. Предложить укороченную нуклеотидную последовательность аптамера Gli-55, сохраняющую ключевые особенности пространственной структуры.

Научная новизна.

1. Проведены квантовохимические расчёты на TD-DFT/B3LYP уровне теории для олигомеров на основе флуорена с разным числом последовательно стоящих звеньев бензотиазола.

2. Смоделированы вторичные и пространственные структуры аптамеров LC-18t, Gli-55, Gli-233 и Apt-31 и сопоставлены с данными МУРР.

3. Предложен укороченный вариант аптамера Gli-55, который сохраняет связывающую способность к клеткам глиобластомы головного мозга на уровне полноразмерного аптамера.

Теоретическая и практическая значимость.

Методы молекулярного моделирования позволили выявить степень влияния различных заместителей в основной и боковой цепи олигомеров на основе флуорена на их оптические свойства. Установленные данные будут способствовать целенаправленному синтезу сопряженных сополифлуоренов с заданными оптическими свойствами. Также в работе были смоделированы полноатомные конформации пяти различных аптамеров в растворе на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния. Полученные атомные модели будут способствовать проведению различных модификаций структур аптамеров с целью повышения их специфичного связывания с различными белковыми мишенями. Результаты диссертационной работы позволят оптимизировать структуры синтетических олигомеров на основе флуорена и ДНК-аптамеров для практических применений в таких областях, как светоизлучающие устройства, био- и хемосенсорика.

Методы исследования.

Компьютерное моделирование атомной и электронной структуры основного состояния для олигомеров с флуореновыми звеньями проводилось в рамках теории функционала плотности DFT с использованием гибридного функционала B3LYP в качестве обменно-корреляционной поправки. Нахождение резонансных частот поглощения проводилось с помощью метода TD-DFT, реализованного в программе GAMESS-US. Моделирование различных конформаций аптамера было проведено с помощью молекулярнодинамического моделирования в сочетании с силовым полем Amber14sb и моделью растворителя TIP3P для воды, реализованных в программном пакете GROMACS. Оптимизация геометрии молекулярных структур аптамера проводили с использованием

квантовохимического метода фрагментации молекулярных орбиталей FMO с использованием метода теории функционала плотности в приближении сильной связи DFTB3, а для оценки сольватационных эффектов использовалась модель поляризуемого континуума PCM реализованных в программном пакете GAMESS-US.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Наличие двух соседних звеньев бензотиазола в основной цепи сополифлуорена приводит к батохромному сдвигу спектров поглощения в сравнении со спектром поглощения олигомера, содержащего изолированное звено бензотиазола.

2. Увеличение длины углеродной цепи боковой алкильной группы флуореновых мономеров не влияет на значение энергетической щели и длины волны поглощения олигомера в целом.

3. Расчеты конформаций аптамеров при помощи метода молекулярной динамики Amber14sb/TIP3P позволяют восстановить пространственные структуры в растворе, основываясь на экспериментальных данных малоуглового рентгеновского рассеяния, с точностью сопоставимой с квантовохимическими расчётами FMO2/DFTB3.

4. Молекулы аптамера LC-18t в растворе при нормальных условиях присутствует в нескольких конформациях, находящихся в термодинамическом равновесии, что существенно проявляется в спектрах рассеяния МУРР.

5. Аптамер Gli-35, предложенный на основе восстановленной пространственной структуры аптамера Gli-55 и выявленной ключевой части последовательности, имеет аналогичную пространственную конформацию и проявляет такие же связывающие свойства и более высокую специфичность к клеткам глиобластомы, чем исходная полноразмерная молекула.

Достоверность результатов

Применение современных, хорошо апробированных методов и согласованность результатов теоретических расчетов с данными, полученными в ходе экспериментальных исследований, обеспечивают достоверность результатов диссертационной работы.

Апробация работы

Результаты исследований были представлены на конференциях различного уровня и направлений: 54-я Международная научная студенческая конференция (г. Новосибирск, 2016); VI Euro-Asian Symposium «Trends in MAGnetism – ESTMAG-2016» (г. Красноярск, 2016); XIV International Conference on pulsed lasers and laser applications – AMPL-2019 (г. Томск, 2019); «Aptamers in Russia 2019» (г. Красноярск, 2019); 65-я Всероссийская научная конференция МФТИ (г. Москва, 2023).

Результаты диссертационной работы докладывались на научных семинарах в Институте физики ФИЦ КНЦ СО РАН (г. Красноярск), Институте высокомолекулярных соединений РАН (г. Санкт-Петербург) и Сибирском федеральном университете (г. Красноярск) (2022-2023).

Личный вклад соискателя заключается в построении атомных моделей синтетических олигомеров, проведении квантовохимических и молекулярно-динамических расчётов, интерпретации и обсуждении полученных результатов.

Благодарности фондам. Работа выполнена при поддержке фондов: Российского Научного Фонда (№ 21-73-20240); Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ FWES-2022-0005; Межведомственного суперкомпьютерного центра Российской академии наук.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 5-ти рецензируемых научных журналах рекомендованных ВАК и индексируемых Web of Science и Scopus, а также получен 1 патент.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из списка сокращений, введения, 4 глав, основных выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 96 страницах, включая 26 рисунков, 5 таблиц, 95 литературных источников.

Глава 1. Характеристика объектов исследования

1.1 Биосенсоры на основе синтетических олигомеров

Биосенсоры нашли широкое применение в различных областях науки, таких как здравоохранение, клиническая диагностика, фармацевтика, контроль качества пищевых продуктов и мониторинг окружающей среды [10]. Тест-системы состоят из трех основных компонентов, включая биорецептор, преобразователь и сегменты обработки сигнала. Взаимодействие мишени с ее биорецептором индуцирует биохимические сигналы, которые преобразуются в обнаруживаемый электрический сигнал с помощью преобразователя. Электрический сигнал усиливается и преобразуется в измеримый сигнал с помощью системы обработки сигналов. На сегодняшний день существует огромное разнообразие биосенсоров, отличающихся по способу преобразования сигнала, его детектирования и типу рецептора. Биорецепторы обычно представляют собой ферменты, белки, пептиды, антитела, которые захватывают свою конкретную мишень. Однако все они имеют ряд недостатков, так, например, антитела чувствительны к изменениям температуры, что делает их склонными к денатурации. Кроме того, они обладают высокой молекулярной массой, что делает их синтез и модификацию трудоемким и дорогостоящим процессом. В качестве альтернативы антителам, наиболее перспективными соединениями являются аптамеры. Благодаря высокой стабильности, специфичности и аффинности к различным мишеням, одноцепочечные ДНК и РНК являются превосходными элементами биораспознавания в сенсорах (аптасенсорах) [11].

На сегодняшний день существует огромное количество вариаций аптасенсоров различающихся по способу преобразования сигнала связывания аптамера с мишенью [12–14]. Среди них, наибольший интерес представляют флуоресцентные биосенсоры на основе сополифлуоренов из-за их высокой

чувствительности, простоты в эксплуатации, быстрого отклика, отсутствия разрушения образца или меньшего повреждения клеток, а также способности предоставлять информацию в режиме реального времени [5,15,16].

Сополифлуорены обладают высокой химической устойчивостью, растворимостью в различных растворителях, в том числе в воде и высоким квантовым выходом люминесценции. Одной из важнейших характеристик данных полимеров является возможность настройки длины волны излучения, путем добавления люминофорных, донорно-акцепторных фрагментов [17]. Еще одной важной особенностью является то, что они способны образовывать комплексы с противоположно заряженными биомолекулами (такими как аптамеры и белки) за счет сильных электростатических взаимодействий (рисунок 1.1), что позволяет избежать необходимости ковалентного мечения аптамера или мишени и может значительно снизить стоимость проб [18].

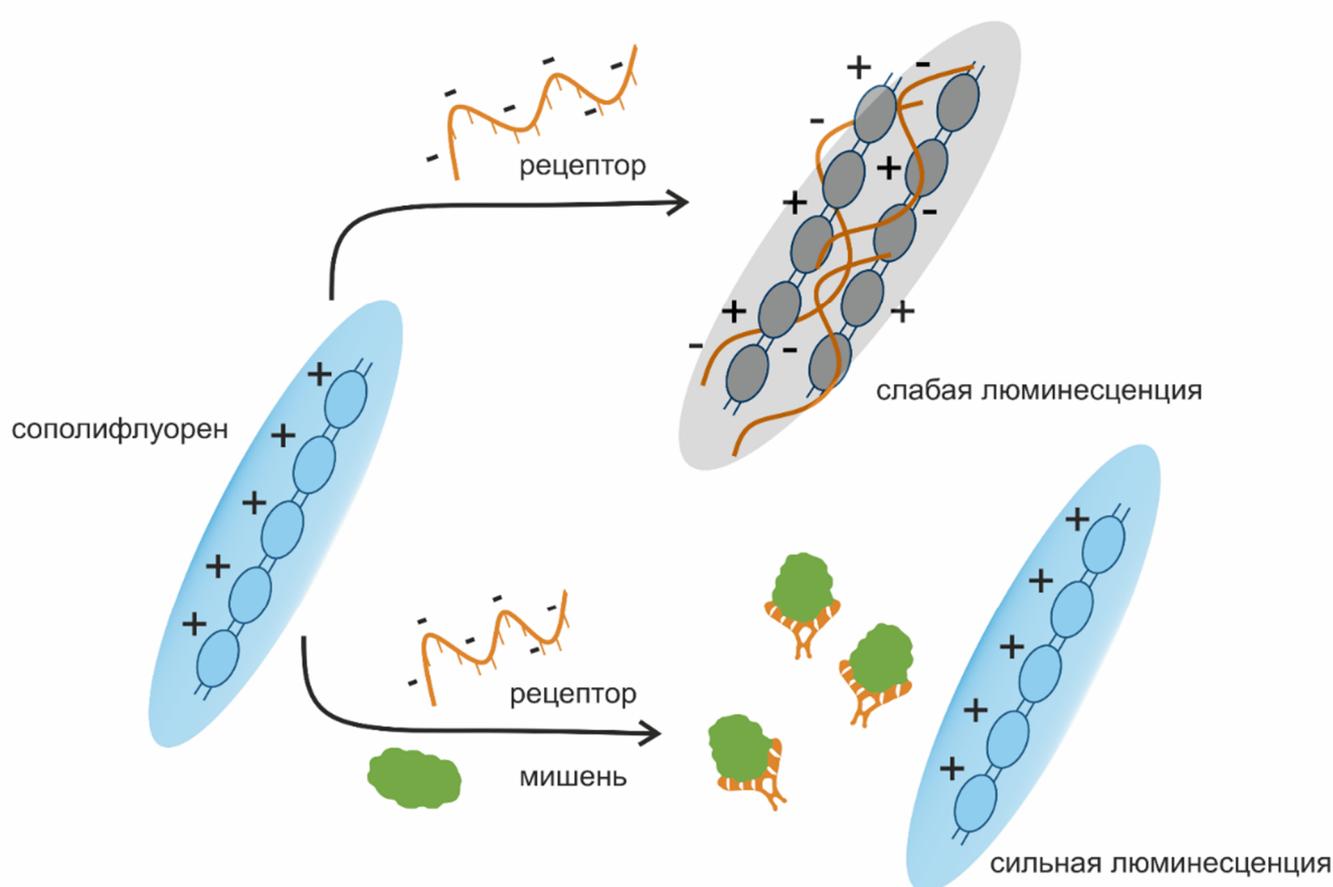


Рисунок 1.1 – Схема работы биосенсора на основе сополифлуорена

1.2 Аптамеры. Общая характеристика

Аптамеры представляют собой короткие последовательности одноцепочечной ДНК (оцДНК) или РНК, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с различными мишенями, начиная от простых неорганических молекул и заканчивая сложными белковыми комплексами и даже целыми клетками [19]. По сути, аптамеры представляют собой синтетические аналоги антител, однако, процесс получения аптамеров значительно проще и существенно менее дорогостоящий, чем получение антител. Классическая процедура получения аптамеров *in vitro* называется SELEX – систематическая эволюция лигандов путём экспоненциального обогащения [20]. Процедура SELEX содержит повторяющиеся циклы инкубации, связывания, разделения и амплификации. Случайный пул олигонуклеотидных последовательностей (инициирующая библиотека), содержащий от 10^{14} до 10^{15} различных последовательностей, инкубируют с молекулами-мишенями. Во время инкубации некоторые из последовательностей связываются с молекулами-мишенями, тогда как остальные последовательности связываются слабо или не взаимодействуют. Разделение представляет собой этап, на котором связанные последовательности изолируются от слабо связанных или несвязанных. Элюированные олигонуклеотиды амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (в случае последовательностей ДНК) или ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в случае последовательностей РНК для обогащения библиотеки [21]. В результате ПЦР происходит постепенное обогащение библиотеки последовательностями олигонуклеотидов, обладающих повышенным сродством к мишени. Вся процедура может длиться от нескольких недель до нескольких месяцев.

Благодаря своим уникальным свойствам аптамеры функционально сопоставимы с традиционными антителами. Однако они обладают несколькими преимуществами [22]. В целом они более стабильны, чем антитела, и имеют более длительный срок хранения и могут долго сохранять свои свойства в широком

диапазоне значений pH и температуры. Кроме того, аптамеры имеют меньший размер по сравнению с антителами, что обеспечивает лучшее проникновение в ткани. Низкая молекулярная масса аптамеров делает процессы их получения и модификации легкими. Хотя антитела могут быть химически модифицированы, сайт-специфические модификации чрезвычайно сложны [23].

Стоит отметить, что ДНК-аптамеры более стабильны чем РНК-аптамеры. Период жизни *in vitro* РНК-аптамера в плазме крови составляет несколько секунд, в то время как для ДНК-аптамера период составляет 30-60 минут [24]. РНК-аптамеры легко деградируют под воздействием разнообразных факторов, таких, как РНКазы, высокая температура, щелочная среда и т.д. В связи с этим в данной работе были изучены структуры различных ДНК-аптамеров.

1.2.1 Определение пространственной структуры аптамеров

Аптамеры связываются со своими мишенями с высокой аффинностью и селективностью из-за способности олигонуклеотидов сворачиваться в сложные многообразные трехмерные формы. Изучение вторичной структуры обычно выполняется *in silico* с помощью расчета возможных конфигураций нуклеиновых кислот с использованием алгоритма минимизации свободной энергии структуры [25]. Наиболее распространенными мотивами в структуре аптамеров считаются: шпильки, петли, псевдоузлы, G-квадруплексы, но можно найти и более сложные модели (рисунок 1.2). Нуклеотиды таких мотивов обеспечивают взаимодействие с функциональными группами мишени благодаря образованию водородных связей, электростатических и Ван-Дер-Ваальсовых взаимодействий [26]. Было установлено, что за специфическое взаимодействие аптамеров с их мишенями отвечают неспаренные нуклеотиды, т.е. образование водородных связей происходит за счёт азотистых оснований, а не фосфатного остова аптамеров. В то время как за стабильность пространственной структуры отвечают

комплементарные участки олигонуклеотидов, поскольку поддерживают правильное взаиморасположение основных структурных мотивов [27,28].



Рисунок 1.2 – Вторичные структуры ДНК-аптамеров

Информация о структуре аптамеров может помочь исследователям понять взаимодействие между аптамерами и их мишенями и, следовательно, может помочь разработать соответствующие стратегии по модификации структуры олигонуклеотидов с целью повышения селективности и специфичности. На сегодняшний день существует три наиболее распространенных метода, используемых для изучения трехмерных структур биологических макромолекул – это рентгеновская кристаллография, спектроскопия ядерного магнитного резонанса и криоэлектронная микроскопия. Каждый подход имеет свои преимущества и недостатки (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Преимущества и недостатки методов структурного анализа

Метод	ЯМР	XRD	Крио-ЭМ
Требования к образцу	Образец должен находиться в растворе	Образец должен быть кристаллизован	Образец должен быть подвергнут быстрой заморозке
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> - Молекулы изучаются в растворе - Исследования фолдинга белков - Не разрушает образец 	<ul style="list-style-type: none"> - Высокое разрешение - Не требует растворимости образца в высококонцентрированном растворе. - Широкий диапазон молекулярной массы. 	<ul style="list-style-type: none"> - Достаточно высокое разрешение - Не требует кристаллизации образца - Не требует растворимости образца в высококонцентрированном растворе.
Недостатки	<ul style="list-style-type: none"> - Молекулярная масса < 30 кДа. - Требуется растворимость образца в высококонцентрированном растворе. - Необходимо изотопное мечение 	<ul style="list-style-type: none"> - Требуется кристаллизация образца - Кристаллические контакты могут искажать структуру образца - Не подходит для гибких молекул 	<ul style="list-style-type: none"> - Комплексные измерения и анализ данных - Минимальная молекулярная масса ~ 300 кДа. - Технология нуждается в доработке

Для определения структуры аптамера с помощью метода ЯМР в качестве меток для нуклеиновых кислот используют изотопы ^{13}C и ^{15}N и добавляют высокоспецифичные лиганды, например, аминокислоты L-аргинин и L-цитруллин

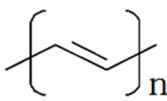
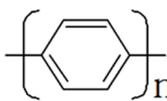
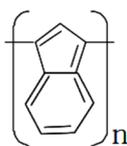
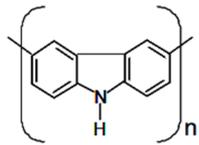
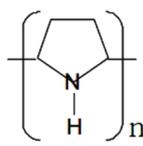
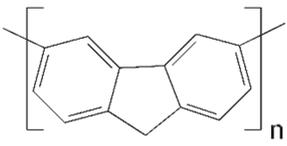
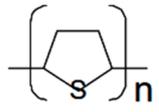
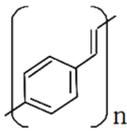
[29], которые обеспечивают стабильную конформацию аптамеров, что приводит к узким анализируемым спектрам ЯМР. При этом стоимость такого исследования достаточно высока. Кроме того, данный метод применим для относительно небольших молекул (<30-40 кДа). Молекулярная масса аптамеров обычно находится в пределах от 10 до 20 кДа, в то время как их белковые комплексы могут достигать молекулярной массы свыше 100 кДа, что делает анализ структуры таких комплексов методом ЯМР очень затруднительным. Однако структура больших комплексов может быть определена с помощью рентгеновской кристаллографии, но только в том случае, если полученные кристаллы обеспечивают приемлемое качество дифракционных данных. Определение условий кристаллизации, при которых получают хорошо дифракционные кристаллы, по-прежнему происходит методом проб и ошибок [30]. Более того, данные рентгенографии не показывают возможные конформационные изменения в условиях реального раствора, которые могут быть более важными [31,32,33]. Применение метода крио-ЭМ для изучения структуры олигонуклеотидов сильно ограничивается одним ключевым моментом – минимальной молекулярной массой структур, которые могут быть использованы для исследования. С учетом всех преимуществ и недостатков описанных методов структурного анализа, для определения структуры аптамеров необходим метод, который не требует сложной пробоподготовки, отличается быстрым сбором и обработкой данных, а также имеет возможность измерения образцов в растворе, для которого легко регулируются такие параметры, как температура, рН и состав буфера. Метод малоуглового рентгеновского рассеяния сочетает в себе все эти преимущества и хорошо зарекомендовал себя для исследования структуры белков, ДНК/РНК и их комплексов, [34,35,36]. Это мощный физический метод изучения общей формы и линейных размеров биологических макромолекул в растворе с нанометровым разрешением. Поскольку данный метод не дает представление об атомной структуре, на помощь приходит компьютерное моделирование, иногда называемое *in silico*, которое помогает получить правдоподобные пространственные структуры.

1.3 Сопряженные полимеры. Общая характеристика

Синтетические полимерные материалы сегодня широко используются в самых разных областях, включая упаковку, клеи и смазочные материалы, электрические изоляторы для микроэлектроники и различные импланты в биомедицинских приложениях. Особым типом полимера, перспективным для применений оптоэлектронике, является так называемый сопряженный полимер. Сопряженные полимеры представляют класс органических полимеров с системой сопряженных связей в основной цепи, в которой все атомы находятся в состоянии sp - или sp^2 -гибридизации. В результате взаимодействия между орбиталями создается полупроводниковая зонная структура, имеющая валентную зону и зону проводимости с относительно небольшой запрещенной зоной между ними. Электронное сопряжение между каждой повторяющейся единицей (мономером) создает полупроводниковую «молекулярную проволоку», обеспечивающую различные оптические свойства, которые в первую очередь определяются разницей в энергии (шириной запрещенной зоны) между высшей занятой молекулярной орбиталью (ВЗМО) и низшей вакантной молекулярной орбиталью (НВМО). Именно наличие такой сопряженной электронной структуры дало название целому классу полимеров. В таблице 1.2 представлены некоторые из наиболее распространенных базовых структур СП [37].

Открытие в 1977 году Shirakawa *et. al.* первого проводящего полимера, галогенированного производного полиацетилена [38], дало развитие в самых разнообразных областях. Делокализованная (сопряжённая) электронная структура полиацетилена обуславливает хорошую подвижность носителей заряда и сильное поглощение света в УФ-видимой области. К сожалению, полиацетилен нестабилен в присутствии кислорода или воды, что делает его бесполезным для многих применений. Тем не менее, дальнейшие исследования привели к разработке гораздо более стабильных ароматических сопряжённых полимеров.

Таблица 1.2 – Название и структура мономеров наиболее распространённых сопряжённых полимеров.

Название	Структура
Полиацетилен	
Полипарафенилен	
Полиазулен	
Поликарбазол	
Полипиррол	
Полифлуорен	
Политиофен	
Полипарафенилен винилен	

Такие полимерные материалы сегодня сочетают в себе важные полупроводниковые свойства (люминесценция, электропроводность), а также свойства синтетических полимеров (эластичность, простота изготовления). Благодаря своим уникальным свойствам они нашли широкое применение в оптоэлектронных устройствах, включая органические светоизлучающие диоды,

солнечные элементы, полевые транзисторы и оптические сенсоры (хемо- и биосенсоры).

Делокализованная электронная структура сопряжённых полимеров придает им привлекательные оптические и электрохимические свойства. В частности, большие коэффициенты экстинкции, а также хорошие излучательные свойства делают их более привлекательными для создания биосенсоров на их основе. Действительно, свойство, которое делает сопряженные полимеры предпочтительным материалом для создания биосенсора, является их способность переводить событие связывания рецептора с мишенью в легко измеряемый оптический или электрохимический сигнал. Из-за их сопряженной природы они демонстрируют высокоэффективный перенос энергии внутри и между цепями. В частности, по сравнению с сенсорами на основе низкомолекулярных соединений, сопряженные полимеры демонстрируют значительное усиление сигнала в результате коллективного отклика многих сопряженных единиц [39]. На основе различных сопряженных полимеров были разработаны сенсоры с различными схемами преобразования, особенно важными являются те, в которых регистрируют изменения электрохимических или оптических свойств.

1.3.1 Сопряженные полимеры на основе флуорена

Полифлуорены – простейшие полифенилены, которые могут действовать как электроактивные, так и фотоактивные материалы. Полифлуорены представляют семейство сопряжённых полимеров, которые излучают во всем видимом диапазоне спектра с высокой эффективностью и низким рабочим напряжением. Они обладают целым рядом уникальных свойств, открывающих неограниченные возможности по работе с цветом, в частности по улучшению цветопередачи дисплеев или созданию сверхчувствительных сенсоров.

Уникальные свойства полимеров прежде всего обусловлены строением их основной структурной единицы – флуореном. Впервые флуорен был обнаружен Марселлином Бертло в 1883 году в каменноугольной смоле [40]. Это природное ароматическое соединение, образующее белые кристаллы с фиолетовой флуоресценцией, от которой и произошло его название. Атомная структура представляет собой жёсткие, плоские бифенильные звенья, соединённые дополнительным метиленовым мостиком (положение С9), что обеспечивает высокую степень сопряжения (рисунок 1.3).

Метиленовый мостик в структуре флуорена дает возможность модифицировать функциональность полимера без нарушения делокализации π -связей с помощью различных заместителей. Например, замена атома Н в положении С9 флуоренов на алкильные группы улучшает растворимость полифлуоренов в различных органических растворителях, а также предотвращает агрегацию нескольких цепей [41]. Это важно для получения растворимых полимеров с помощью реакций сочетания, таких как сочетание Сузуки, Хека и Штилле. Также к этой алкильной цепи могут быть добавлены различные функциональные группы для растворения полимера в воде [42–44].

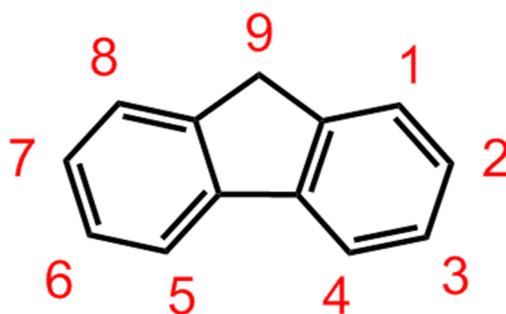


Рисунок 1.3 – Химическая структура молекулы флуорена

Кроме того, положения 2 и 7, 3 и 6 в структуре флуорена, используются в качестве активного центра для связывания с другими ароматическими звеньями и образованию полимерной цепи. Добавление различных донорных и акцепторных групп в эти положения обеспечивает контроль ширины запрещенной зоны [45–47].

Данные полимеры стали объектами для вариации химической структуры, так как от этого зависел цвет их излучения в видимой части спектра. Необходимо было понять какие части молекулы были химически активными, и как заменить или добавить функциональные группы в основную цепь полимера, чтобы оказать влияние на люминесценцию. Такая тонкая настройка оптических свойств полимера способствовала широкому применению в оптоэлектронных устройствах, включая светоизлучающие диоды [48], полевые транзисторы [49] и полимерные солнечные элементы [50]. Также они могут быть использованы при создании хемо- и биосенсоров [5,51].

Сдерживающим фактором развития сополифлуоренов (СПФ) является длительность их синтез в реакциях Сузуки и Ямамото (48 ч и более) [52]. Поэтому одним из наиболее широко развивающихся направлений является синтез таких полимеров с заранее заданными свойствами. Для этого необходимы разработки научных подходов, которые помогут выявить взаимосвязь структурных характеристик макромолекул с их спектральными и физико-химическими свойствами до начала проведения длительного синтеза.

Глава 2. Методы теоретического исследования структуры и свойств синтетических олигомеров

2.1 Метод теории функционала плотности

В работе использованы подходы теории функционала (DFT), которые успешно применяются для изучения свойств атомов, молекул и твердых тел, основываясь на фундаментальных законах квантовой механики. Основная идея DFT состоит в том, что возможно описать основное состояние взаимодействующей системы многих тел через плотность ее частиц, а не через многочастичную волновую функцию, т.е. происходит сведение $3N$ степеней свободы системы N тел только к трем пространственным координатам:

$$(x_1, y_2, z_3, \dots, x_N, y_N, z_N) \Rightarrow \rho(x, y, z). \quad (1)$$

В основе данной теории лежат теоремы Хоэнберга-Кона (ХК) [53]:

Теорема 1. Если две системы электронов, одна из которых находится в потенциале $v_1(r)$, а другая — в $v_2(r)$, имеют одинаковую плотность основного состояния $\rho(r)$, то $v_1(r) - v_2(r)$ обязательно константа.

Теорема 2. Существует универсальный функционал энергии от плотности, который дает наименьшую энергию тогда и только тогда, когда входная плотность является истинной плотностью основного состояния.

Данные теоремы говорят лишь о существовании функционала, который зависит только от распределения электронной плотности, но не предлагают способ его представления. В 1965 году Кон и Шем предложили способ приближенного вычисления функционалов основного состояния для систем многих электронов [54]. Строится вспомогательная система

невзаимодействующих электронов, находящаяся в некотором эффективном потенциале, при этом электронная плотность данной системы будет совпадать с плотностью основного состояния системы взаимодействующих частиц. Такой эффективный потенциал можно найти, если представить функционал энергии системы в виде:

$$E = T + E_{int} + V_{ext} = T_0 + V_h + V_{ext} + V_{xc} \quad (2)$$

$$V_{ext}(\rho) = \int v_{ext}(r)\rho(r)dr \quad (3)$$

$$V_h(\rho) = \int \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r - r'|} drdr' \quad (4)$$

где T_0 – кинетическая энергия невзаимодействующих электронов, V_h – энергия отталкивания плотностей, V_{xc} – обменно-корреляционный вклад. Выражение V_{xc} теоретически не определено явным образом, и описывается различными способами, в зависимости от выбора функционала.

Далее записываются уравнения Кона-Шема, которые заменили задачу минимизации функционала полной энергии решением уравнения Шредингера для невзаимодействующих частиц. Уравнения Кона-Шема:

$$V_{eff}(r) = V_{ext}(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} dr' + v_{xc}(r) \quad (5)$$

$$h_{ks} = -\frac{1}{2}\Delta^2 + V_{eff} \quad (6)$$

$$h_{ks}\varphi_i = \varepsilon_i\varphi_i \quad (7)$$

Данные уравнения позволяют найти электронную плотность и полную энергию основного состояния системы взаимодействующих электронов. Так как потенциал Хартри и обменно-корреляционный потенциал зависят от плотности $\rho(r)$, которая определяется набором одноэлектронных волновых функций φ_i , который в свою очередь зависит от эффективного потенциала V_{eff} , то задача

решения уравнений Кона-Шема является нелинейной. Алгоритм решения такой задачи выглядит следующим образом: задают первоначальное представление о распределении электронной плотности $\rho(r)$, рассчитывают соответствующий V_{eff} и затем уже диагонализуют гамильтониан Кона-Шема для нахождения одноэлектронных волновых функций φ_i . Затем вычисляют новую электронную плотность, используя найденные волновые функции, и начинают процесс сначала. Процедура самосогласования повторяется до тех пор, пока не выполнены определенные критерии сходимости. Как только найдено решение $\rho(r)$ с заданной точностью, можно вычислить полную энергию основного состояния из уравнения (2).

Во многих случаях результаты DFT-расчетов дают неплохое согласие с экспериментальными данными, особенно при использовании подходящего приближения для функционала обменно-корреляционной энергии E_{xc} . Однако высокие затраты вычислительных ресурсов для больших систем являются существенным недостатком DFT метода. В то же время появляются упрощенные варианты метода функционала электронной плотности, например, вариант метода в приближении сильной связи (DFTB), который в значительной степени позволяет снизить вычислительные затраты.

2.2 Метод функционала электронной плотности в приближении сильной связи

Метод функционала электронной плотности в приближении сильной связи DFTB3 (Density functional based tight-binding) [55] основан на разложении электронной плотности в ряд Тейлора на линейный (DFTB1), квадратичный (DFTB2) или кубический (DFTB3) член. DFTB1 — самый старый подход, который в целом хорошо работает для неполярных систем; DFTB2 добавляет

эффекты переноса заряда и поляризации, DFTB3 улучшает точность распределения заряда, что особенно важно для водородных связей и полярных систем [56,57]. Было показано, что DFTB3 систематически лучше, чем DFTB2 [58–60]. Полная энергия E_{DFTB3} определяется выражением:

$$E^{\text{DFTB3}} = \sum_i n_i \sum_{\mu\nu} c_{\mu i} c_{\nu i} H_{\mu\nu}^0 + \sum_{A>B} E_{AB}^{\text{rep}} + \frac{1}{2} \sum_{A,B} \gamma_{AB} \Delta q_A \Delta q_B + \frac{1}{6} \sum_{A,B} (\Gamma_{AB} \Delta q_A + \Gamma_{AB} \Delta q_B) \Delta q_A q_B, \quad (8)$$

где μ и ν – атомные орбитали, А и В – атомы, n_i – число заполнения i -ой молекулярной орбитали, которое определяется коэффициентами разложения $c_{\mu i}$. E^{rep} – энергия отталкивания, которая зависит только от расстояния между парами атомов, причём парные функции отталкивания получают путём подгонки к теоретическим расчётам более высокого уровня. $H_{\mu\nu}^0$ – невозмущенный гамильтониан, матричные элементы которого предварительно рассчитаны и табулированы для модельных систем в таблицах Слетера-Костера.

В данной работе был использован набор параметров Zorb, который подходит для описания широкого ряда органических и биологически значимых молекул [61]. γ_{AB} и Γ_{AB} – функции, зависящие от расстояния, используемые для вычисления кулоновского взаимодействия, обе зависят от химической жесткости атомов, также называемой параметром Хаббарда [62]. Параметр Γ_{AB} , встречающаяся только в DFTB3, зависит также от производной параметра Хаббарда по зарядам атомов Малликена [63].

Метод DFTB3 относится к классу полуэмпирических, поскольку использует ряд аппроксимаций для оценки энергии [64]. Для упрощения вычислений в методе используется валентное приближение, т.е. внутренние электроны объединяются в остов, а наибольший вклад в энергию вносят валентные орбитали.

Также вычисления упрощаются за счет описания валентных орбиталей в рамках минимального базиса.

2.3 Функционал плотности для нестационарных систем

В данной работе, резонансные частоты поглощения были рассчитаны с использованием метода нестационарной теории функционала плотности TD-DFT. TD-DFT основана на аналоге теорем Хоэнберга и Кона – теореме Рунге-Гросса, которая была сформулирована в 1984 году [65]. В TD-DFT, как и в DFT, строится вспомогательная система невзаимодействующих частиц колебания электронной плотности которой такие же, как и в исходной системе взаимодействующих частиц. Это позволяет записать уравнение, связывающее восприимчивость исходной системы χ , эффективный потенциал Кона-Шема и восприимчивость вспомогательной системы χ_s :

$$\chi(\vec{r}, \vec{r}', \omega) = \chi_s(\vec{r}, \vec{r}', \omega) + \iint \chi_s(\vec{r}, \vec{r}_1, \omega) f_{HXC}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \omega) \chi(\vec{r}_2, \vec{r}', \omega) d\vec{r}_2 d\vec{r}_1 \quad (9)$$

где $f_{HXC} = \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} + f_{xc}$ – обобщенное обменно-корреляционное ядро, $\chi(\vec{r}, \vec{r}', \omega)$ – функция линейного отклика электронной плотности системы на слабое внешнее возмущение. Для кон-шемовской системы невзаимодействующих частиц функцию линейного отклика можно записать так:

$$\chi_s(\vec{r}, \vec{r}', \omega) = \sum_{ai}^{\infty} \left(\frac{\varphi_a(\vec{r}) \varphi_i^*(\vec{r}) \varphi_a^*(\vec{r}') \varphi_i(\vec{r}')}{\omega - (\varepsilon_a - \varepsilon_i)} - \frac{\varphi_a^*(\vec{r}) \varphi_i(\vec{r}) \varphi_a(\vec{r}') \varphi_i^*(\vec{r}')}{\omega + (\varepsilon_a - \varepsilon_i)} \right) \quad (10)$$

где ω – частота возмущений, $\varepsilon_{a,i}$ – энергия элементарного перехода, φ_a и φ_i – орбитали Кона-Шема, характеризующие электронный переход с занятой орбитали i на вакантную орбиталь a . Далее уравнение (9) решается относительно частот возбуждения исходной системы. По сути, решается эрмитова задача по определению собственных значений и собственных векторов матрицы:

$$\begin{pmatrix} A & B \\ B^* & A^* \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X \\ Y \end{pmatrix} = \omega \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X \\ Y \end{pmatrix} \quad (11)$$

где $\begin{pmatrix} X \\ Y \end{pmatrix}$ – собственный вектор перехода (суперпозиция одноэлектронных переходов), X – прямые переходы с i на a орбиталь, Y – обратные переходы с a на i , A – матричные элементы, определяющие взаимодействие между прямыми переходами, B – матричные элементы, определяющие взаимодействие между прямым и обратным переходом.

$$A_{ia,jb} = \delta_{ij}\delta_{ab}(\varepsilon_a - \varepsilon_i) + 2 \int d^3r \int d^3r' \Phi_q^*(r) f_{HXC}(r, r') \Phi_{q'}(r') \quad (12)$$

$$B_{ia,jb} = 2 \int d^3r \int d^3r' \Phi_q^*(r) f_{HXC}(r, r') \Phi_{-q'}(r') \quad (13)$$

где $\Phi_q(r) = \varphi_i^*(r)\varphi_a(r)$ – плотность перехода. К основным преимуществам метода TD-DFT можно отнести, то, что данный подход требует относительно небольшие затраты вычислительных ресурсов, обеспечивая при этом достаточно высокую точность, более того, он практически не ограничен размерами системы. Данный метод широко применяется в теоретических исследованиях, поскольку рассчитанные энергетические характеристики возбуждённых состояний биологических молекул дают хорошее согласие с экспериментальными данными [66].

2.4 Приближения в рамках теории функционала плотности

В настоящее время, для расчёта органических соединений одними из наиболее широко используемых методов функционала плотности являются так называемые гибридные методы. Наиболее популярен в настоящее время гибридный функционал B3LYP [67]. Данный метод, основан на трёхпараметрической схеме Бекке (B3) и корреляционном функционале LYP (Lee, Yang и Parr):

$$E_{xc}^{B3LYP} = 0,8E_x^{LDA} + 0,2E_x^{HF} + 0,72E_x^{B88} + 0,19E_c^{VWN} + 0,81E_c^{LYP}, \quad (13)$$

где E_{xc}^{B3LYP} – сумма вкладов обменной и корреляционной энергии B3LYP. E_x^{B3LYP} состоит из 80 % LDA-обмена плюс 20 % нелокального обмена Хартри-Фока и 72 % градиентных поправок функционала обмена Becke88. Энергия E_c^{B3LYP} состоит из 81% корреляционной энергии LYP, которая содержит локальную и полулокальную (зависимую от градиента) часть, и 19% (локального) корреляционного функционала LDA в формулировке Воско-Уилка-Нёсэ.

Трёхпараметрический функционал B3LYP самый популярный обменно-корреляционный функционал DFT для решения физико-химических задач. Он наиболее оптимален для расчёта молекул, содержащих лёгкие атомы (порядковый номер ≤ 36), поскольку имеет небольшое количество эмпирических подгоночных параметров и широкий спектр свойств, описываемых с достаточно высокой точностью. Достоинством гибридных DFT методов обусловлено сочетанием низкой стоимости вычислений и высокой степени точности результатов расчетов.

В работе использовался метод DFT с гибридными функционалами B3LYP с базисом 6-31G(p,d) для описания систем в основном электронном состоянии. Для

поиска геометрии молекул в возбуждённом состоянии использовали TD-DFT/B3LYP/6-31G(p,d) уровень теории.

2.5 Метод фрагментации молекулярных орбиталей

Метод фрагментации молекулярных орбиталей (FMO) — вычислительный метод, в котором система делится на части, обычно называемые фрагментами, и общие свойства получаются из свойств фрагментов и их конгломератов [68]. С помощью него можно проводить расчёты для больших молекулярных систем (более тысячи атомов) [69] с использованием таких квантовохимических методов как теория функционала плотности (DFT), теория возмущений Мёллера-Плессета второго порядка (MP2), метод многоконфигурационного самосогласованного поля (MCSCF) и др.

В методе FMO при разбиении молекулы на фрагменты связь разделяется на атоме (bond detached atom, BDA), при этом два электрона из связи и один протон (положительный заряд) из BDA назначаются одному фрагменту, а другой фрагмент сохраняет оставшиеся протоны BDA и электроны (рисунок 2.1). Поскольку расчёты фрагментов всегда выполняются в кулоновском поле всей системы, протоны BDA, хотя формально отнесены к двум разным фрагментам, генерируют кулоновское поле из исходных атомов, так что физически все BDA действуют как обычные атомы.

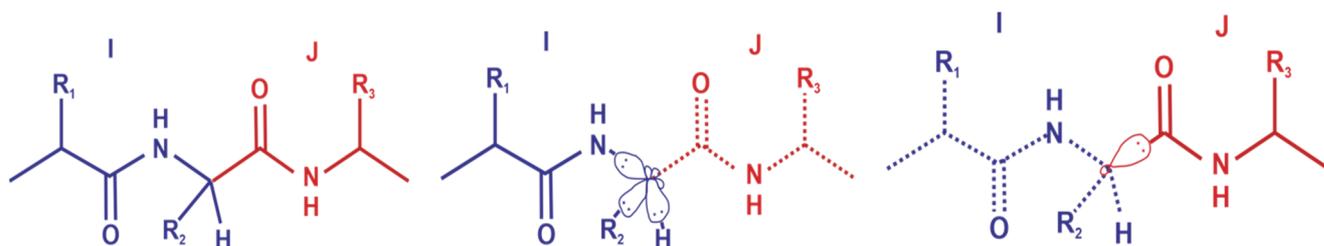


Рисунок 2.1 – Фрагментация связи на атоме BDA

Базисные наборы оставлены как есть, то есть атом углерода, протоны которого отнесены к левому (с пятью протонами) и правому (с одним протоном) фрагментам, имеет базисный набор атома углерода.

Фрагменты в методе FMO рассчитываются, в кулоновском поле, вычисленным для всей системы, с последующими явными многочастичными поправками, полученными из пар и троек фрагментов, называемых димерами и тримерами соответственно. Расчёты димеров и тримеров служат нескольким очень важным целям. Во-первых, это позволяет учесть перенос заряд между фрагментами. Во-вторых, улучшает общую точность расчета. В-третьих, получается ценная количественная информация о взаимодействии многих фрагментов. Существует ряд правил для фрагментации фрагментов:

- 1) Разрывать рекомендуется только одинарные связи.
- 2) Чем больше результирующие фрагменты, тем выше точность и выше вычислительные затраты.
- 3) Химически определенные единицы часто являются лучшим выбором как с точки зрения точности, так и для анализа взаимодействия.
- 4) Некоторые типы компонентов системы, которые не связаны ковалентной связью, желательно поместить в один фрагмент.
- 5) Водородная связь учитывается при расчёте димеров, поэтому нет необходимости помещать части молекулы, соединенные H-связью, в тот же фрагмент.

Расчёт энергии всей молекулы, разделённой на N фрагментов, рассчитывается по формуле:

$$E = \sum_I^N E_I + \sum_I^N \sum_{J>I}^N (E_{IJ} - E_I - E_J) \quad (14)$$

Ниже приведена схема расчёта методом FMO, к которой молекулярная система разбивается на фрагменты, число которых фиксировано для всех расчетов (рисунок 2.2).

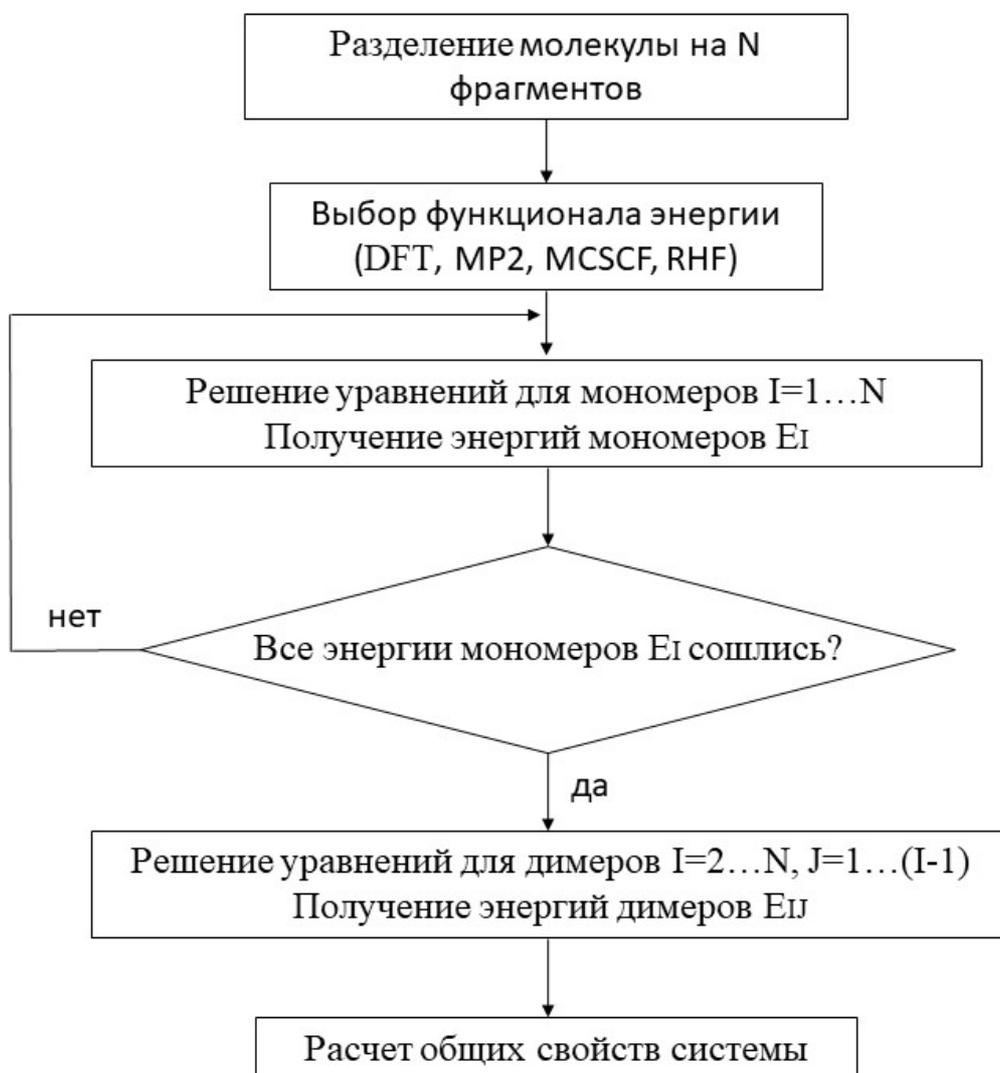


Рисунок 2.2 – Блок-схема расчета метода FMO

Расчёты мономеров повторяются до тех пор, пока все энергии мономера не сойдутся, что включает в себя прогон каждого мономера обычно около 20 раз. Затем выполняются расчёты димеров во внешнем кулоновском поле, определяемом электронной плотностью мономеров на предыдущем этапе. Вычисление каждого димера выполняется только один раз. Полученные

суммарные энергии внутримолекулярного димера (E_{IJ}) объединены с помощью уравнения (14) и в результате получается полная энергия системы.

Энергии отдельных n -меров (X) получаются путём решения необходимых *ab initio* уравнений, где гамильтониан H модифицируется добавлением кулоновского оператора V и оператора проекции P (где X это мономер- I , димер - IJ или тример - IJK):

$$\tilde{H}_{\mu\nu}^X = H_{\mu\nu}^X + V_{\mu\nu}^X + P_{\mu\nu}^X \quad (15)$$

$$V_{\mu\nu}^X = \sum_{K \neq X}^N \left\{ \sum_{A \in K} \left\langle \mu \left| -\frac{Z_A}{|r - R_A|} \right| \nu \right\rangle + \sum_{\rho\sigma \in K} D_{\rho\sigma}^K(\mu\nu|\rho\sigma) \right\} \quad (16)$$

$$P_{\mu\nu}^X = B \sum_{i \in X} \langle \mu | \varphi_i^h \rangle \langle \varphi_i^h | \nu \rangle \quad (17)$$

где, электростатический потенциал является матричным элементом кулоновского оператора, описывающего притяжение между электронной плотностью X и ядрами фрагментов $K \neq X$ и соответствующее отталкивание электронной плотности от плотности. Z_A и R_A — атомные заряды и координаты соответственно. D — матрица плотности. μ , ν , ρ и σ - атомные орбитали [70].

Оператор проекции P строится на атомах BDA, отсоединенных от связи, чтобы разделить базисные функции при разделении связей. В случае разделения связи C-C, sp^3 -гибридизационные орбитали φ_i^h получаются из RHF-расчета CH_4 ($R_{C-H} = 1,09 \text{ \AA}$) для данного базисного набора. Эти орбитали используются без изменений в расчетах FMO (только поворачиваются для каждой связи, чтобы соответствовать ее направлению). Параметр B выбирается достаточно большим, чтобы исключить соответствующие орбитали из вариационного пространства, то есть обычно $B=10^6$ Хартри.

Метод (FMO) хорошо воспроизводит свойства, рассчитанные *ab initio* в полной системе, включая энергию, градиент энергии и дипольный момент [71].

2.6 Основные принципы метода молекулярной динамики

Считается, что наиболее правильное описание эволюции молекулярной системы во времени достигается с помощью квантово-механического представления. Однако, несмотря на уровень развития компьютерных технологий, решение уравнения Шрёдингера из первых принципов (*ab initio*), практически возможно только для атома гелия, но никак не для более крупных систем. Подходы, которые используют различные приближения и так называемые полуэмпирические методы квантовой химии, так же весьма трудоемки в случае больших атомных систем. Альтернативным методом является метод молекулярной динамики – метод, в котором движение системы атомов рассчитывается за определенный период времени и исследуется эволюция системы, основываясь на классическом описании межчастичных взаимодействий. Данный метод может быть использован при изучении равновесных и динамических свойств системы.

Метод моделирования молекулярной динамики основан на втором законе Ньютона:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i(t)}{\partial t^2} = F_i; F_i = -\frac{\partial U}{\partial r_i} \quad (18)$$

где r_i – радиус-вектор i -той частицы, а F_i – сила, действующая на i -ую частицу с массой m_i в момент времени t . Вторая производная координаты атома (ускорение) пропорциональна силе, действующей на атом. Данная сила, равна производной потенциальной энергии по координате, взятой с обратным знаком. В этом методе предполагается, что каждая частица в системе ведет себя как ньютоновская частица, а квантовое поведение полностью игнорируется. Это означает, что электронные движения не учитываются, и предполагается, что электроны остаются в своем основном состоянии и мгновенно корректируют свою динамику

при изменении положения атомов (приближение Борна-Оппенгеймера), поэтому в данном случае динамической переменной является только положение ядер как функция времени. Как только положения и скорости каждого атома известны, состояние системы можно предсказать и рассчитать новые положения и скорости. Процедуру можно повторять снова и снова, и таким образом получается траектория движения атомов во времени. Существует две категории моделирования МД: одна для неравновесных и другая для равновесных систем. Большинство систем моделируются в состоянии равновесия, которое определяется как изолированная система с постоянным объемом (V) и фиксированным числом частиц (N). Поскольку система изолирована, полная энергия E постоянна. Следовательно, зная значения E , V и N изолированной системы, мы можем легко определить её термодинамические свойства.

2.6.1 Силовые поля

Решающим шагом в проведении молекулярной динамики является описание взаимодействия атомов молекулярной системы, называемой силовым полем. В данной работе применялось молекулярнодинамическое моделирование на основе силового поля Amber14sb. Силовое поле построено таким образом, чтобы охватить все соответствующие молекулярные взаимодействия, которые будут моделировать важные степени свободы. Первым шагом к построению реалистичной атомистической модели является расчет сил. Как описано выше сила F_i в момент времени t определяется градиентом потенциальной энергии U относительно координат положения частицы i . Потенциальная энергия U может быть рассчитана как сумма внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий:

$$U(R) = \sum_{bonded} U_i(R) + \sum_{non-bonded} U_i(R) \quad (19)$$

Между несвязанными атомами следует учитывать две потенциальные функции: Кулоновское взаимодействие между электростатическими зарядами, где сила притяжения обратно пропорциональна квадрату расстояния:

$$F = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 r^2} \quad (20)$$

и потенциал взаимодействия Леннарда-Джонсона, описывающее Ван-дер-Ваальсово взаимодействие между атомами:

$$U_{vdw} = \sum_{nonbonded\ pairs} \left(\frac{A_{ik}}{r_{ik}^{12}} - \frac{B_{ik}}{r_{ik}^6} \right) \quad (20)$$

где А и В константы, зависящие от типа атома и получены из экспериментальных данных.

Энергия внутримолекулярных взаимодействий, то есть энергия взаимодействия между связанными атомами складывается из четырех слагаемых:

1) Энергия растяжения валентных связей:

$$U_{bond,ij} = K_{s,ij} (r_{ij} - r_{0,ij})^2 \quad (21)$$

где r_{ij} – текущее расстояние между атомами, $r_{0,ij}$ – равновесное расстояние между атомами, $K_{s,ij}$ – коэффициент растяжения связи

2) Энергия искажения валентных углов, вычисляемая по закону Гука:

$$U_{angle,k} = K_{\varphi,k} (\varphi_k - \varphi_{0,k})^2 \quad (22)$$

где φ_k – текущий валентный угол, $\varphi_{0,k}$ – равновесное значение угла, $K_{\varphi,k}$ – коэффициент упругости валентного угла.

3) Энергия двугранных (торсионных) углов:

$$U_{tor} = \sum K_{\chi}(1 + \cos(n\chi - \delta)) \quad (23)$$

4) Энергия «неправильных» (improper) двугранных углов определяется законом Гука относительно плоского угла (рисунок 2.3):

$$U_{improper} = \frac{1}{2}k_{o,ijkl}(\omega_{ijkl} - \omega_0)^2 \quad (24)$$

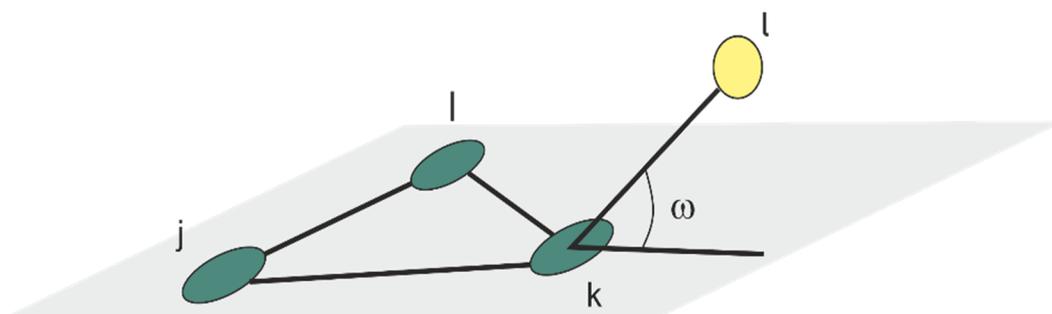


Рисунок 2.3 – Модель «неправильного» двугранного угла

Большинство параметров силового поля взяты из экспериментальных данных о малых молекулах, а другие взяты из теоретических расчетов. Обычно эталонные длины связей и углы берутся из кристаллографических данных для малых молекул. Связи, углы и неправильные двугранные силовые константы, которые моделируют молекулярные колебания, получают из спектроскопических данных. Диэдральные углы обычно получают из квантовохимических расчётов. Частичные атомные заряды также получают из квантовохимических расчётов. Параметры для функции Леннарда-Джонса обычно получены из знаний о диффузии, вязкости и теплоте парообразования малых молекул в конденсированной фазе и уточняется при помощи расчетов молекулярной динамики. Все эти параметры должны быть получены для всех типов атомов,

участвующих в внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействиях исследуемой системы.

В настоящее время для бимолекулярного моделирования широко используются следующие силовые поля: CHARMM, AMBER, OPLS-AA и MMFF. Применение молекулярной динамики в исследовании различных биологических молекулярных систем является распространенной практикой. Данный подход показывает прекрасные результаты при изучении структурно-динамических свойств белков [72], нуклеиновых кислот [73], липидов [74].

Глава 3. Моделирование атомной и электронной структуры олигомеров на основе флуорена

В настоящее время перед материаловедением синтетических полимеров стоит задача получения соединений с функциональными свойствами, которые требуются одновременно в нескольких приложениях, таких как биомедицина и инженерия. Материал должен обладать необходимыми механическими и оптическими свойствами. Однако прежде, чем проводить сложный химический синтез сопряженных олигомеров, а тем более полимеров, неплохо было бы научиться предсказывать их оптоэлектронные свойства. Для решения данной фундаментальной проблемы необходимо использовать современные квантовохимические методы. В данной работе было изучено влияние различных заместителей в основной и боковой цепи производных флуорена на их оптические свойства методами теории функционала плотности.

3.1 Алгоритм расчётов

На первом этапе происходило построение моделей производных сополифлуорена в программе ChemCraft: были рассмотрены молекулы сополифлуорена с одним (F₁BF-C₈H₁₇) и двумя (F₂BF-C₈H₁₇) звеном бензотиазола (БТ) в основной цепи. Также были смоделированы структуры олигомеров с различными алкильными заместителями в боковой цепи, а именно с октильным (F₁BF-C₈H₁₇) и метильным (F₁BF-CH₃) радикалами (рисунок 3.1). Далее строились различные конформеры, которые отличались различным диэдральным углом между бензотиазолом и флуореном. Структуры данных сополимеров представлены на рисунке 3.1. Диэдральный угол между звеном флуорена и

бензотиазолом варьировался с шагом в 20° , начиная с $\theta = 0^\circ$ до $\theta = 180^\circ$. В дальнейшем полученные структуры оптимизировались различными квантовохимическими методами.

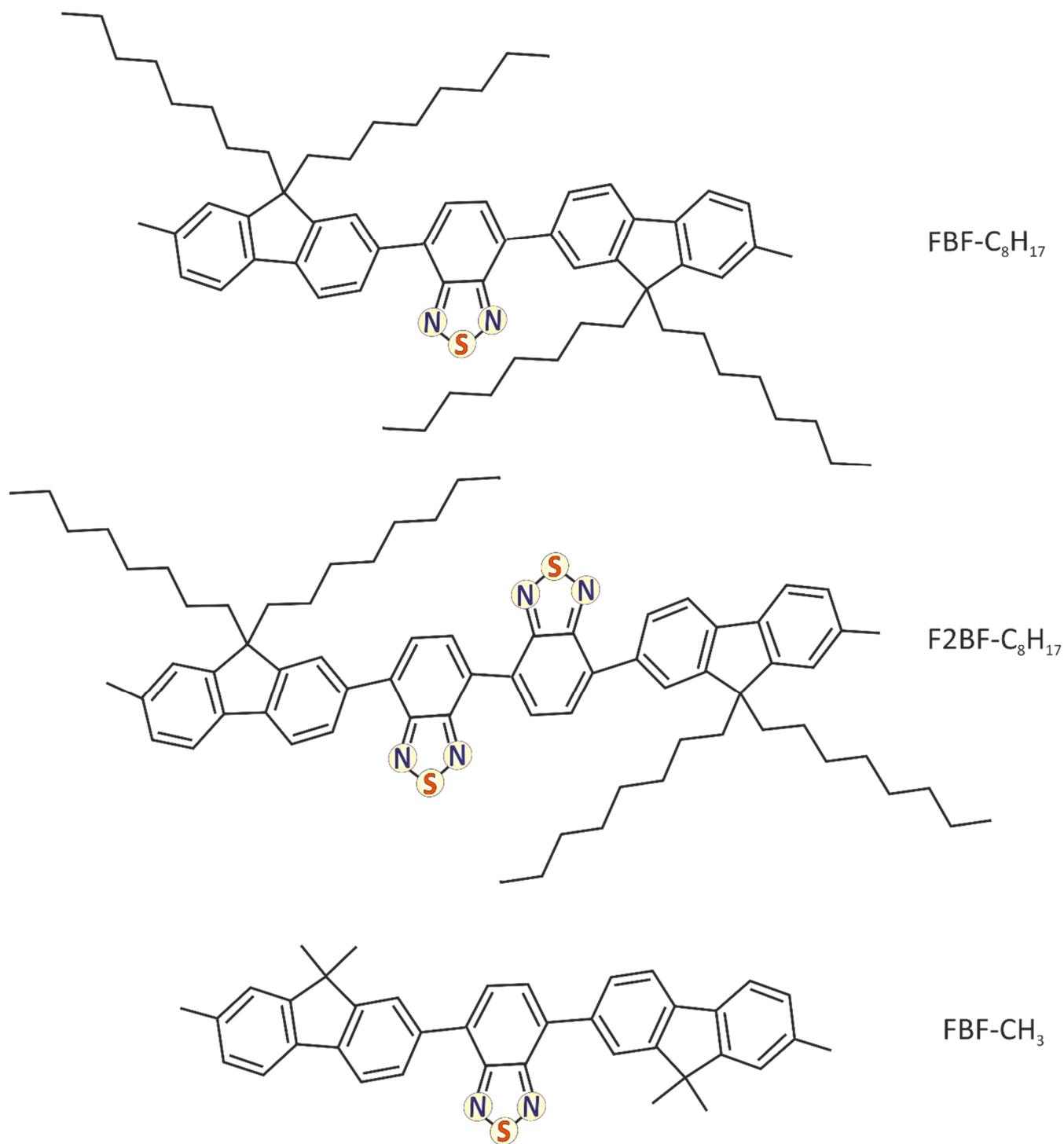


Рисунок 3.1 – Вторичные структуры исследуемых олигомеров

Сначала оптимизация геометрии проводилась с использованием полуэмпирического метода PM6 в программе MORAC2009, были выбраны конформеры с наименьшей энергией. Полученная геометрия оптимизировалась с использованием теории функционала плотности (DFT) и гибридного функционала B3LYP в базисе 6-31(p,d) в вакууме. В результате проведенной оптимизации диэдральный угол между структурной единицей флуорена и бензотиазолом в молекуле FBF-C₈H₁₇ составил ~ 38°, в то время как для молекулы F2BF-C₈H₁₇ с двумя звеньями БТ, угол между мономером флуорена и БТ составил ~ 40°. Далее проводился расчет спектров поглощения при помощи метода TD-DFT с использованием базиса 6-31(p,d). Фотофизические процессы, происходящие при возбуждении электронной плотности, анализировали путем построения молекулярных орбиталей. За переход S₀→S₁ для всех исследуемых олигомеров отвечают орбитали ВЗМО и НВМО. Для отдельно взятых звеньев бензотиазола (оного и двух) были рассчитаны не только спектры поглощения, но и спектры люминесценции. Расчеты проводились по схеме, представленной на рисунке 3.2.

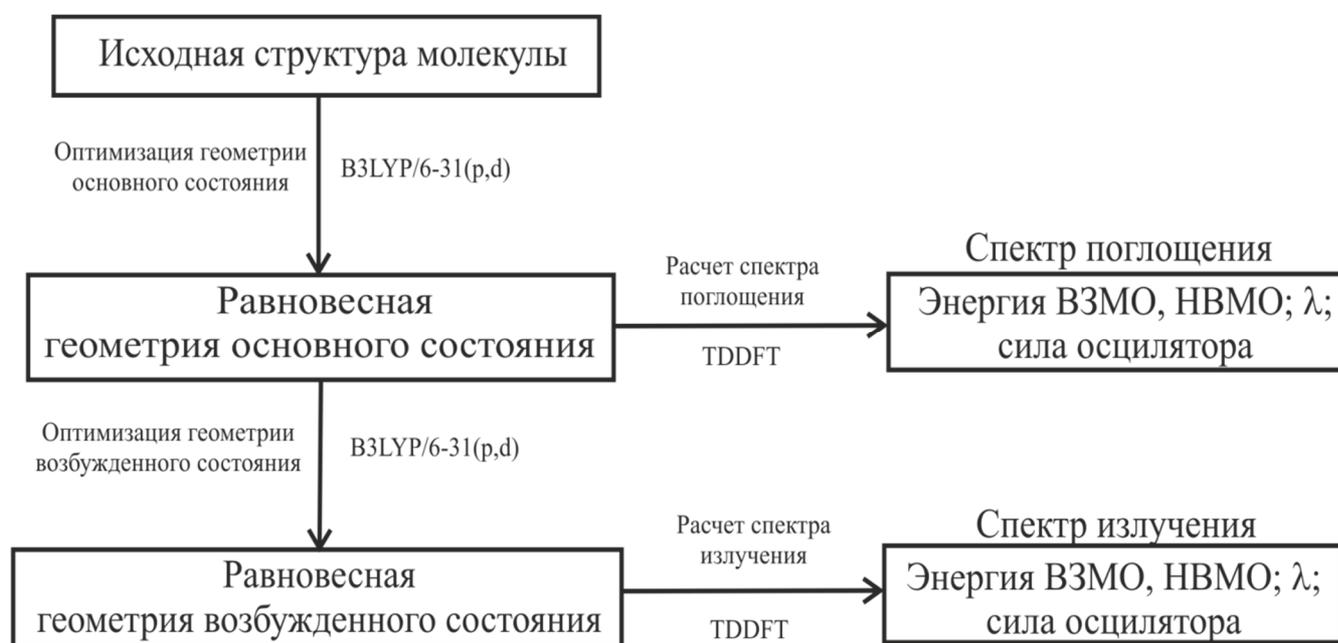


Рисунок 3.2 – Схема расчета спектров поглощения и люминесценции с использованием метода B3LYP в базисе 6-31(p,d)

3.2 Анализ электронной структуры, спектров поглощения синтетических олигомеров с различным числом звеньев бензотиазола

В ходе работы были рассчитаны спектры поглощения олигомеров с одним и двумя звеньями бензотиазола (рисунок 3.3). По полученным данным видно, что молекула FBF-C₈H₁₇, содержащая одно звено БТ имеет максимум поглощения на длине волны 515 нм (2,41 эВ), в то время как для молекулы, содержащей две структурные единицы БТ, F2BF-C₈H₁₇, максимум приходится в более длинноволновой части спектра – 532 нм (2,33 эВ). При этом величина красного, т.е. батохромного, сдвига составляет 0,08 эВ. Аналогичное поведение спектров поглощения олигомеров в растворе было отмечено в экспериментальных работах [75] и [76]. Максимумы экспериментальных спектров поглощения для олигомеров с одним и двумя звеньями бензотиазола составили 417 нм (2,97 эВ) и 436 нм (2,84 эВ), соответственно. Величина батохромного сдвига в эксперименте составила 0,13 эВ.

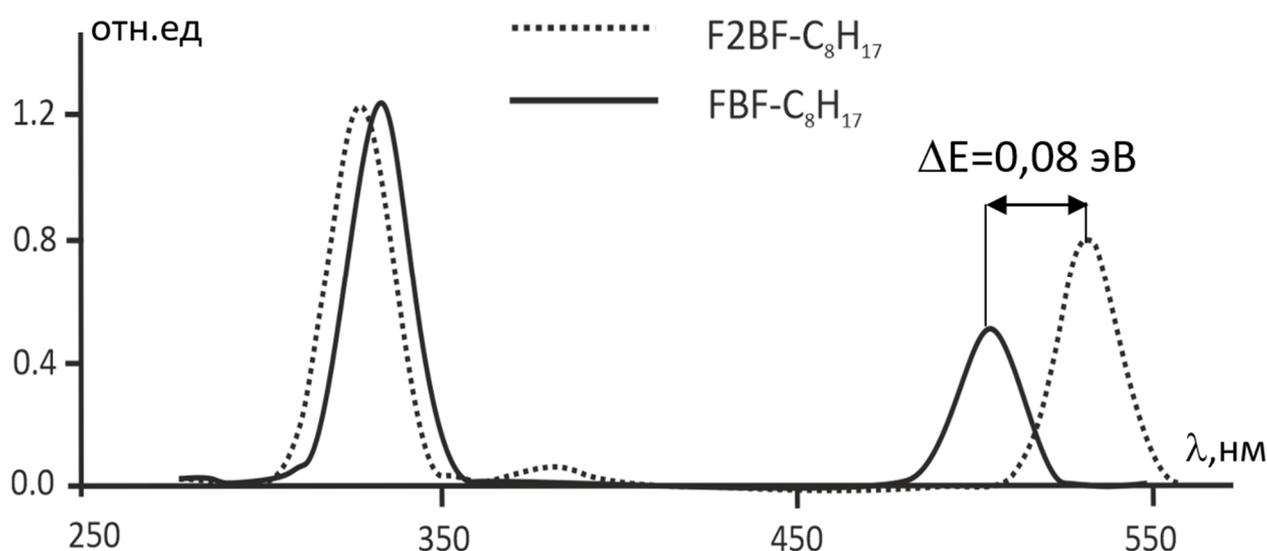


Рисунок 3.3 – Рассчитанные методом B3LYP/6-31(p,d) спектры поглощения олигомеров FBF-C₈H₁₇ и F2BF-C₈H₁₇

Для того чтобы проверить, как данные пики поглощения соотносятся с локальными переходами на звене бензотиазола, были рассчитаны спектры поглощения и люминесценции отдельно стоящих мономера и димера БТ (рисунок 3.4). При сравнении рассчитанных спектров поглощения одного звена БТ с двумя звеньями (2БТ) также наблюдается батохромный эффект. Сдвиг составляет 76 нм (0,62 эВ), при этом максимум одного звена БТ находится на длине волны 353 нм, а в случае с димером БТ на 429 нм. В случае люминесценции мономера БТ максимум длины волны излучения приходится на 443 нм, в то время как для димера на 531 нм, батохромный сдвиг составляет 88 нм (0,47 эВ).

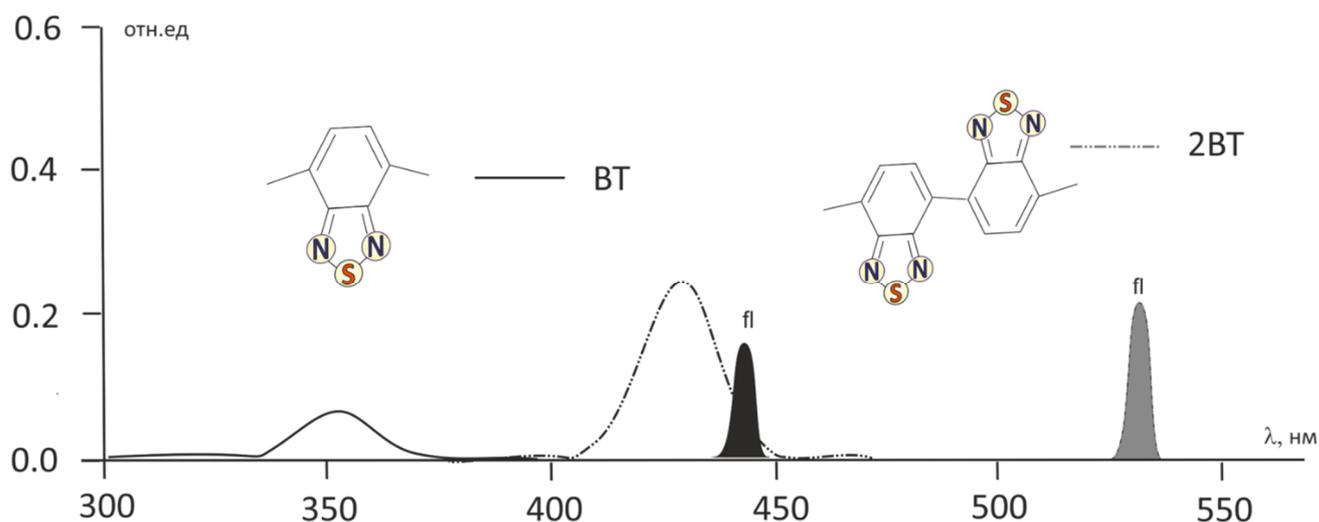


Рисунок 3.4 – Спектры поглощения и люминесценции молекул бензотиазола БТ и 2БТ, рассчитанные методом B3LYP в базисе 6-31(p,d)

Из рассчитанных спектров поглощения мы видим, что несмотря на то, что в структурах FBF-C₈H₁₇ и БТ есть пики в районе 350 нм их поведение при удвоении звеньев БТ кардинально отличается: в первом случае наблюдается незначительный гипсохромный сдвиг, а во втором случае – сильный батохромный сдвиг. Это указывает на различие в природе переходов соответствующим этим пикам. При этом более корректно будет сравнение пиков на 515 нм у FBF-C₈H₁₇ и на 353 нм БТ, которые смещаются в красную область при удвоении звеньев БТ. Однако, большое различие в величине соответствующих батохромных сдвигов

указывает на значительное влияние окружения. Таким образом поведение пиков поглощения в FBF-C₈H₁₇ и F2BF-C₈H₁₇ описывается переходами, не локализованными на БТ, а затрагивающими большую часть олигомеров.

Для того чтобы понять, как изменяется электронная структура основного и возбуждённого уровней в молекуле и причину батохромного сдвига спектра поглощения, в случае добавления еще одного звена БТ в основную цепь, были рассмотрены молекулярные орбитали ВЗМО и НВМО, представленные на рисунке 3.5. По молекулярным орбиталям видно, что в основном состоянии у молекул FBF-C₈H₁₇ и F2BF-C₈H₁₇ электрон делокализован по всей сопряженной цепи, которая мало подвержена искажениям в атомной структуре (рисунок 3.5 а,б). При этом энергия высшей занятой молекулярной орбитали для данных молекул практически не меняется и составляет 5,13 эВ и 5,17 эВ, соответственно (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Данные энергии ВЗМО и НВМО, энергетической щели (ΔE), рассматриваемых сополифлуоренов ($\Delta E = E_{\text{ВЗМО}} - E_{\text{НВМО}}$)

Энергетические характеристики	Модель олигомера		
	F2BF-C ₈ H ₁₇	FBF-C ₈ H ₁₇	FBF-CH ₃
E _{НВМО} , эВ	-2,44	-2,23	-2,24
E _{ВЗМО} , эВ	-5,17	-5,13	-5,14
ΔE , эВ	2,73	2,90	2,90

Из рисунка 3.5 видно, что *p*-электроны серы вносят вклад в образование молекулярных орбиталей, в то время как в образовании высшей занятой молекулярной орбитали они практически не участвуют. При переходе из основного состояния в возбужденное меняется характер связывания между атомами. Например, если рассматривать молекулу FBF-C₈H₁₇, видно, что, в основном состоянии у структурной единицы БТ, там, где раньше связь была разрыхляющей, в возбужденном, она стала связывающей (рисунок 3.5).

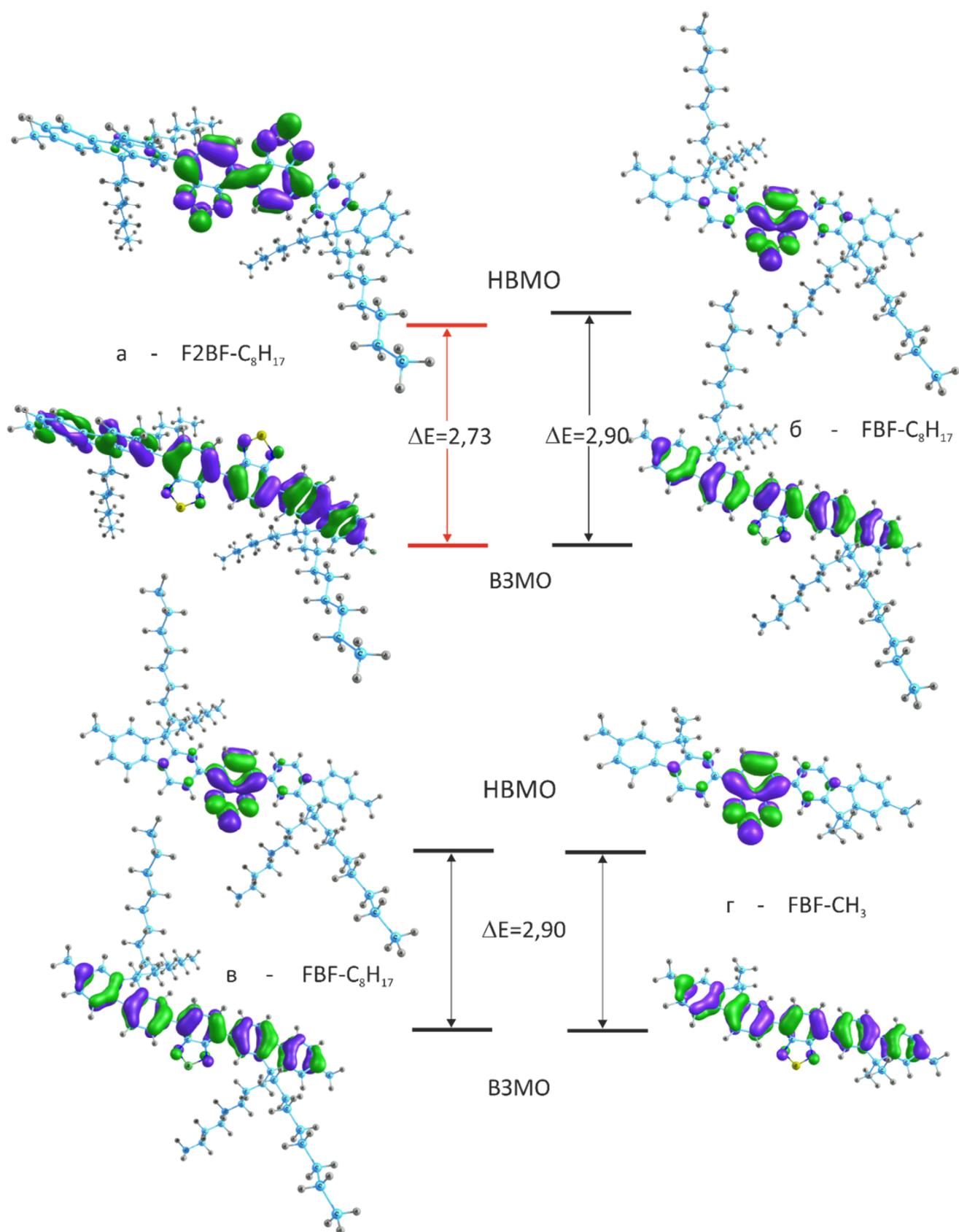


Рисунок 3.5 – Молекулярные орбитали олигомеров (F2BF-C₈H₁₇), (FBF-C₈H₁₇), (FBF-CH₃) участвующих в переходе S₀-S₁

Данное изменение наблюдается для всех моделей олигомеров. Так же стоит отметить, что электронная плотность на низшей вакантной молекулярной орбитали локализована на одном звене бензотиазола в случае молекулы FBF-C₈H₁₇ и на двух звеньях для молекулы F2BF-C₈H₁₇. Это в свою очередь вызывает понижение энергии низшей вакантной молекулярной орбитали с 2,23 эВ до 2,44 эВ и как следствие, уменьшение ширины энергетической щели (2,73эВ) (таблица 3.1).

3.3 Анализ электронной структуры, спектров поглощения синтетических олигомеров с различными алкильными заместителями

Для того чтобы понять, как влияет различная длина алкильных заместителей на оптические свойства олигомеров, были рассмотрены молекулярные орбитали молекул FBF-C₈H₁₇ и FBF-CH₃ (рисунок 3.5). Из рисунка 3.5 видно, что различные алкильные заместители, такие как: C₈H₁₇ и CH₃ не вносят существенно вклада в образование НВМО и ВЗМО и как следствие не должны существенно влиять на оптические свойства полимера в целом. Квантовохимические расчеты спектров поглощения это подтверждают (рисунок 3.6). Для молекул FBF-C₈H₁₇ и FBF-CH₃ спектры поглощения практически идентичны друг другу, длины волн составляют 501 нм и 504 нм, соответственно. При рассмотрении энергии высшей занятой молекулярной орбитали и низшей вакантной молекулярной орбитали, и энергетических щелей (таблица 3.1), видно, что увеличение длины углеродной цепи алкильной группы практически не влияет на значение энергий молекулярных орбиталей и как следствие на значение энергетической щели. Энергии ВЗМО и НВМО для молекул FBF-CH₃ и FBF-C₈H₁₇ отличаются на 0,01 эВ, при этом ΔE молекул равны, и составляют 2,90 эВ для обоих случаев.

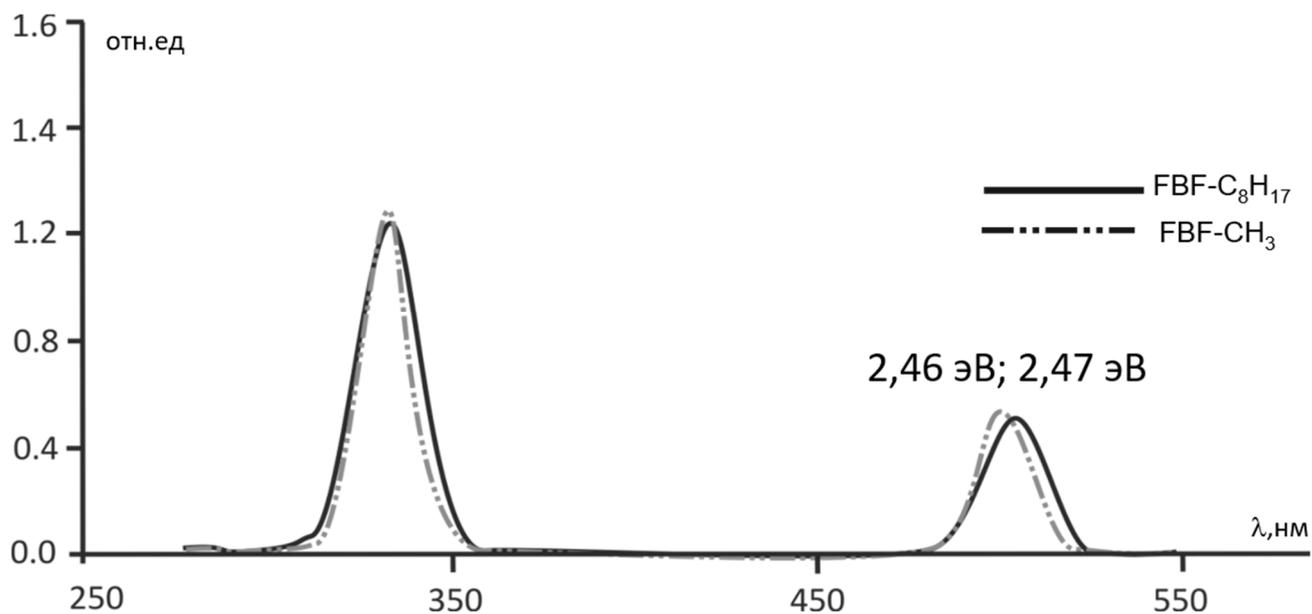


Рисунок 3.6 – Рассчитанные методом B3LYP/6-31(p,d) спектры поглощения олигомеров FBF-C₈H₁₇ и FBF-CH₃

Проведённые квантовохимические расчёты показали, что, увеличивая число звеньев бензотиазола в основной цепи, можно сдвигать спектр поглощения в более длинноволновую область. При этом рассчитанная величина красного сдвига хорошо согласуется с экспериментальными данными. В свою очередь, длина боковых алкильных заместителей мало влияет на оптические свойства олигомеров и в дальнейшем, для уменьшения временных затрат на расчет, данные группы можно будет укорачивать, не теряя в качестве расчета.

Глава 4. Моделирование атомной структуры ДНК-аптамеров

Разработка адресного медицинского препарата на основе аптамеров требует детального изучения механизмов связывания с мишенью, поэтому важной фундаментальной задачей является понимание их пространственной атомной структуры. Молекулярная структура аптамеров определяет их функцию и зависит от многих факторов: молекулярного окружения, температуры, рН раствора, сольватированных ионов и др. Компьютерное моделирование помогает создавать молекулярные модели в условиях реального раствора. Однако, ранжирование молекулярных структур по свободной энергии Гиббса, то есть предсказание того, какие из них более вероятны, является сложной вычислительной задачей. Поэтому теоретические модели могут проверяться экспериментально, например, путём сравнения со структурами из рентгеновской кристаллографии, однако, до сих пор, получение кристаллов аптамеров было невозможным, а процесс получения кристаллической структуры их белковых комплексов является трудоемкой и сложной задачей. Более того, данные рентгенографии не показывают возможные конформационные изменения в условиях реального раствора, которые могут быть более важными для моделирования реальных систем. В этой связи, для верификации смоделированных структур было предложено использовать малоугловое рассеяние рентгеновских лучей – физический метод изучения общей формы и линейных размеров макромолекул в растворе с нанометровым разрешением. Ключевым преимуществом этой технологии является возможность измерения образцов в растворе в физиологических условиях.

Данные МУРР для растворов аптамеров были получены коллегами из лаборатории физики магнитных явлений (ФМЯ) Института Физики (ИФ) ФИЦ КНЦ СО РАН на различных российских и европейских синхротронных источниках рентгеновского излучения. Для уточнения структур некоторых аптамеров в ИФ ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, также проводилась

Спектроскопия кругового дихроизма. Все аптамеры были синтезированы коллегами из лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий (БиоМед) Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

4.1 Моделирование пространственной структуры аптамера RE-31

В первую очередь, эффективность совместного применения метода молекулярной динамики и МУРР была показана на примере моделирования пространственной структуры аптамера RE-31. При этом, из литературы была заранее известна не только нуклеотидная последовательность, но и вторичная структура данного аптамера, что существенно упростило процесс апробации предлагаемой методики. Вторичная структура данного аптамера состоит из трёх частей [77]:

- 1) дуплексная часть (рисунок 4.1а, красный);
- 2) некомплементарных нуклеотидов (рисунок 4.1а, зеленый);
- 3) антипараллельный квадруплекс, состоящий из двух гуаниновых плоскостей и петель, соединяющих их (рисунок 4.1а, черный).

На основе данной вторичной структуры была смоделирована его пространственная структура. В программе 3DNus была построена модель антипараллельного квадруплекса, где восемь гуаниновых оснований образуют две плоскости, удерживаемые восемью водородными связями и стэкинг-взаимодействием (взаимодействие «плоскость к плоскости»), а также различными петлями, между которыми находится ион металла – K^+ . В программе Avogadro была смоделирована дуплексная часть, состоящая из шести пар оснований, и некомплементарный участок, состоящий из двух пар нуклеотидов 25G-7T и 24G-8A. Полученная конструкция была присоединена к квадруплексу по фосфатным связям.

Для полученной пространственной структуры сначала была проведена оптимизация геометрии полуэмпирическим методом РМ6 в газовой фазе в программе МОРАС. Затем были проведены расчеты молекулярной динамики, где в явном виде задавался растворитель (вода и ионы), температура, давление, которое соответствовало экспериментальным условиям в МУРР.

Для моделирования МД и анализа траекторий был использован программный пакет GROMACS, с параметрами силового поля Amber14sb. Моделирование МД в явно заданном растворителе проводилось при температуре 298 К под контролем термостата перемасштабирования скорости (velocity rescaling thermostat) [78], постоянном давлении под контролем алгоритма Парринелло-Рамана [79] и применением метода Particle-Mesh Ewald (PME) для учёта электростатических взаимодействий. Продолжительность динамики составила 200 нс.

Экспериментальные данные МУРР были получены коллегами из лаборатории физики магнитных явлений (ФМЯ) Института Физики им. Л.В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН на станции DICSY Курчатовского института в городе Москва. Сравнение кривых рассеяния двух полученных теоретических моделей с экспериментальной кривой показало, что наименьшее отклонение от эксперимента имеет модель, полученная из расчета МД, при этом χ^2 уменьшился почти в два раза (с 4,79 до 2,56) относительно модели, полученной из полуэмпирического метода РМ6 (рисунок 4.1).

Критерий невязки χ^2 рассчитывался по формуле:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left[\frac{I_{exp}(s_j) - cI_{calc}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2 \quad (25)$$

где N – число экспериментальных или теоретических точек, σ – стандартное отклонение, c – масштабный фактор, $I_{exp}(s_j)$ – экспериментально измеренная

интенсивность малоуглового рентгеновского рассеяния для данного вектора рассеяния s_j , $I_{calc}(s_j)$ – интенсивность рассеяния от теоретической модели.

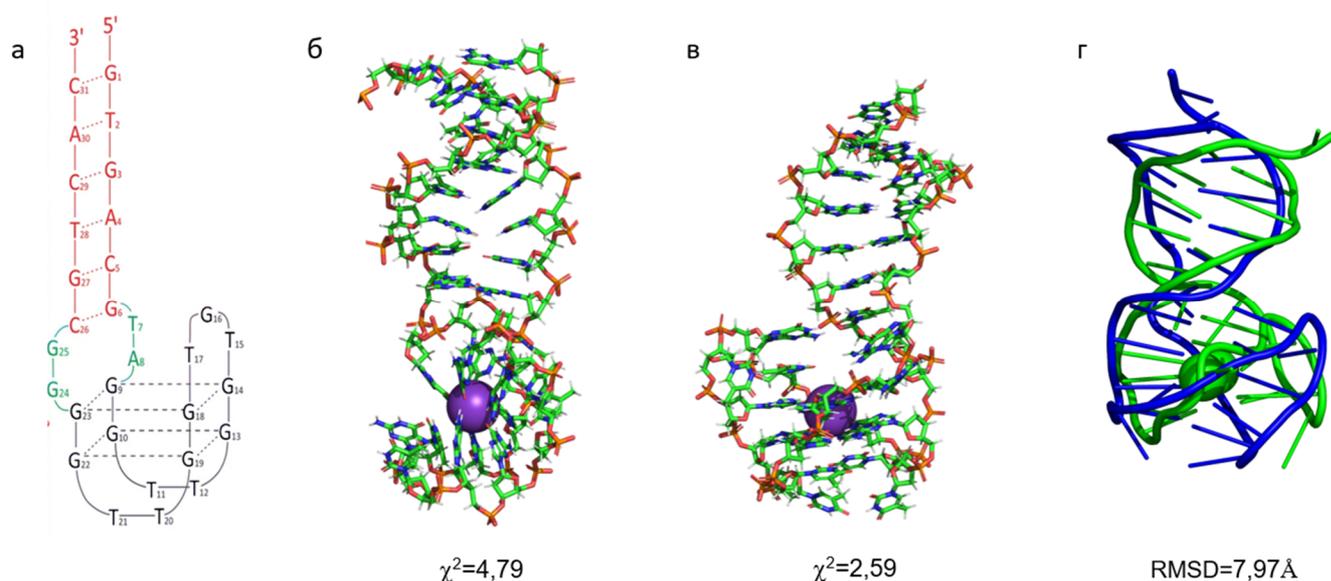


Рисунок 4.1 – Вторичная (а) и пространственные структуры аптамера RE-31, полученные разными методами: (б) PM6, (в) МД, (г) сравнение структур из МД (зеленый) и XRD (синий)

Далее было проведено сравнение модели из МД с кристаллической структурой аптамера RE-31 [77], при этом среднеквадратичное отклонение было достаточно велико (7,97 Å), что лишь подтверждает тот факт, что аптамер в растворе имеет другую конформацию по сравнению с кристаллом. При этом совместное применение МУРР и молекулярного моделирования дает представление о конформации аптамера именно в растворе, что более важно с точки зрения дальнейшего медицинского применения.

Для дальнейшей работы по моделированию атомных структур аптамеров, для которых известна лишь нуклеотидная последовательность, были предложены следующие основные этапы моделирования и соответствующий набор программ:

1. Моделирование вторичных структур на основе нуклеотидных последовательностей в программе mFold [25]. Данный этап дает понимание о том, как будут выглядеть основные структурные элементы аптамера, а именно, где

будут комплементарные и некомплементарные участки, петли, квадруплексы или одинарные нити нуклеотидов.

2. Моделирование атомной 3D-структуры на основе вторичной структуры в программе Avogadro [80]. Данный этап позволяет получить первоначальное понимание атомной структуры аптамера и расположение в пространстве основных структурных мотивов.

3. Проведение расчетов молекулярной динамики с силовым полем Amber14sb [81] и моделью воды TIP3P [82] в программном пакете GROMACS [83]. Результаты расчетов дают представление о конформационных изменениях аптамера в растворе с явным учетом растворителя, температуры и давления.

4. Проведение квантовохимических расчётов методом FMO2/DFTB3-Zob/PCM [84] с использованием программного пакета GAMESS [85]. Данный метод позволяет получить равновесную геометрию системы в заданной конформации, которая в дальнейшем важна для изучения взаимодействия аптамера с его белковыми мишенями. Подход FMO позволяет значительно сократить вычислительную сложность квантовохимических расчетов для больших систем. Фрагментация аптамеров методом FMO проводилась с помощью программы FACIO [86].

5. Сравнение теоретических кривых рассеяния, полученных от атомных моделей из 3 и 4 пункта, с экспериментальной кривой рассеяния МУРР в программе CRY SOL [87]. Данный этап помогает отобрать только те конформации аптамеров, которые имеют наименьшее отклонение от эксперимента.

4.2 Моделирование пространственной структуры аптамера LC-18t

Рак легкого является вторым наиболее распространенным и смертельным видом рака в мире [88]. Поэтому разработка препаратов для диагностики,

визуализации и адресной доставки лекарственных средств в очаг пораженной ткани является крайне важной и актуальной медицинской задачей. Аптамеры являются перспективными агентами, которые способны выполнить данные задачи. В настоящей работе была смоделирована пространственная структура аптамера LC-18t, который проявляет специфичное связывание с клетками аденокарциномы легкого.

4.2.1 Алгоритм расчетов

Для атомистического моделирования структуры аптамера LC-18t была пошагово выполнена процедура, предложенная в пункте 4.1. На основе экспериментально установленной последовательности аптамера LC-18t (рисунок 4.2 а), были предсказаны его возможные вторичные структуры. Моделирование проводилось при концентрации ионов 146 mM Na^+ и $0,5 \text{ mM Mg}^{2+}$ при $20 \text{ }^\circ\text{C}$, что соответствовало условиям, в которых проводился эксперимент МУРР.

Для предсказания пространственной структуры аптамеров последовательно использовались два вида вычислительных методов. Сначала проводили расчет молекулярной динамики. Аптамер помещался в периодическую кубическую ячейку с водой $10 \times 10 \times 10 \text{ нм}$, вся система нейтрализовалась ионами Na^+ и добавлялись дополнительные ионы $\text{Na}^+ \text{ Cl}^-$ до общей концентрации соли $0,1 \text{ M}$. В расчетах МД использовалось силовое поле Amber14sb [89] для аптамера и противоионов, а также была использована модель TIP3P [82] для воды. Продолжительность молекулярной динамики составляла 200 нс .

Затем, структуры, полученные из молекулярной динамики, рассчитывались с использованием метода DFTB3 с 3ob-3-1 набором параметров [61], объединённого с методом фрагментации молекулярных орбиталей FMO [90,91].

Растворитель (вода) описывался с помощью модели поляризуемого континуума (PCM) [84].

Моделирование вторичных структур проводилось на основе последовательности аптамера LC-18t, состоящего из тридцати пяти нуклеотидов, представленных на рисунке 4.2а.

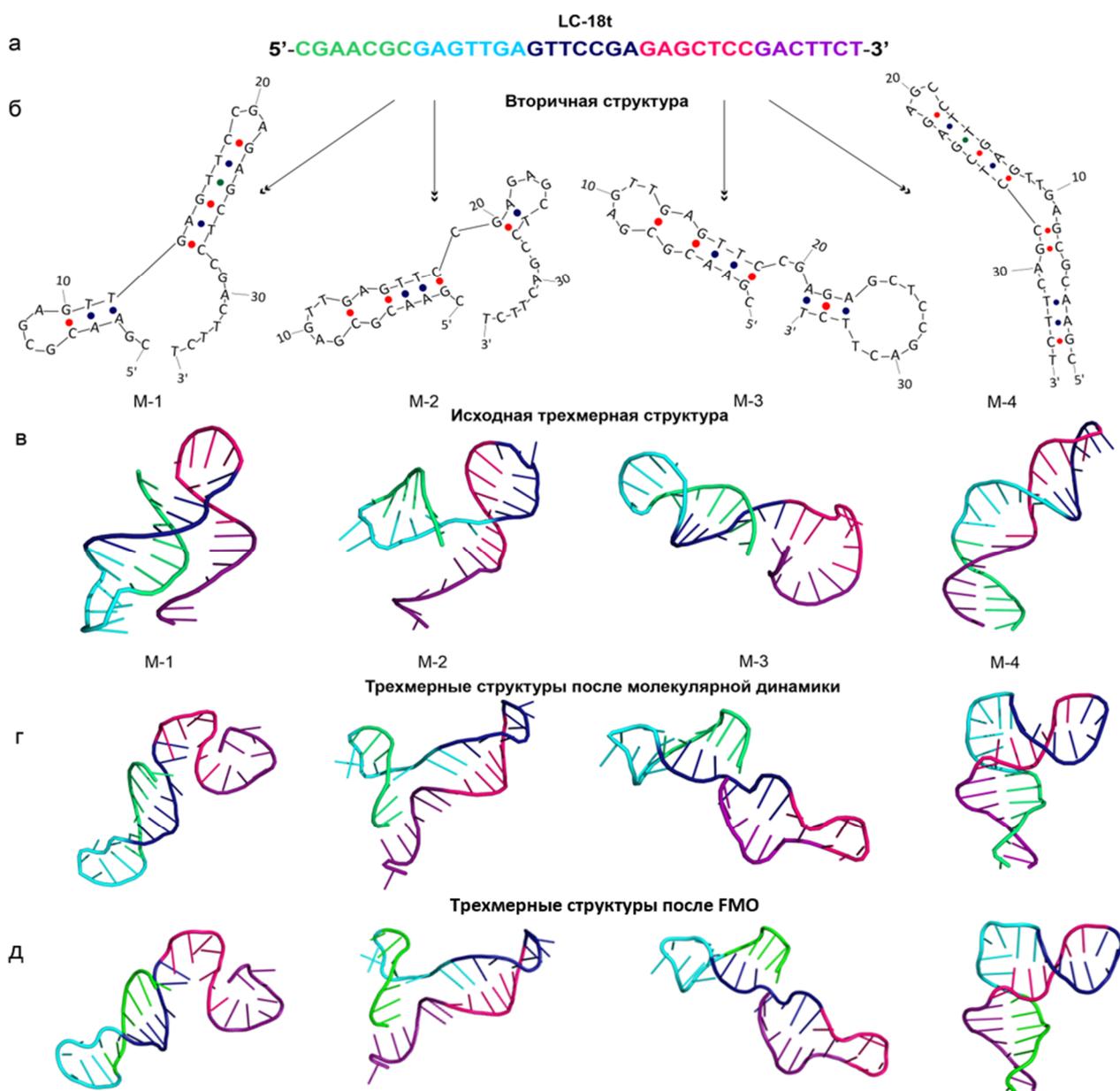


Рисунок 4.2 – Последовательность аптамера LC-18t, (б) вторичные структуры, (в) третичные структуры, (г) пространственные структуры после расчета МД, (д) пространственные структуры после проведения расчета FMO. 3'-конец – фиолетовый; 5'-конец - зелёный

Всего было получено четыре варианта вторичных структур, ранжированных по убыванию свободной энергии Гиббса (рисунок 4.2б). Соответствующие третичные структуры М-1, М-2, М-3, М-4 были построены с использованием программы Avogadro (рисунок 4.2 в). Далее для них проводилась молекулярная динамика с последующей кластеризацией траектории, номера кластеров указаны в скобках в названии моделей (рисунок 4.3).

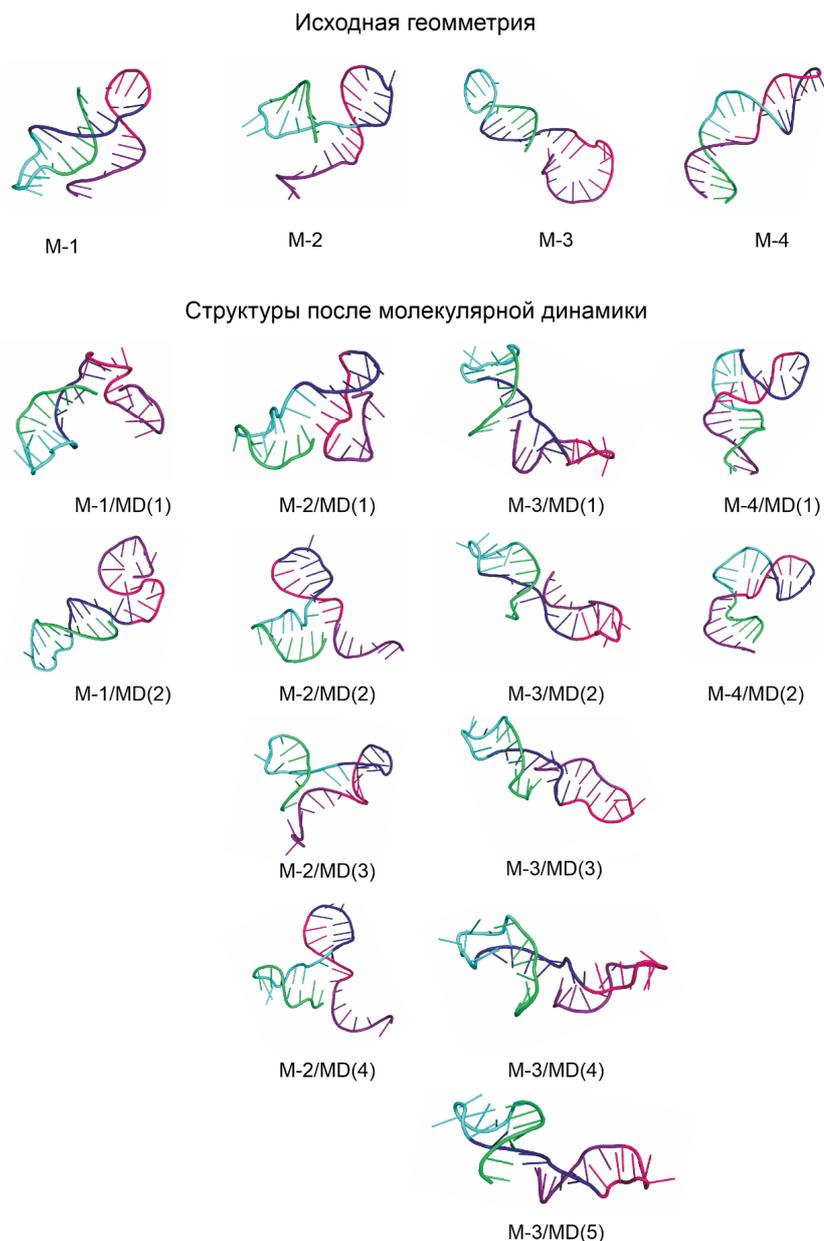


Рисунок 4.3 – Результаты МД моделирования аптамера LC-18t.

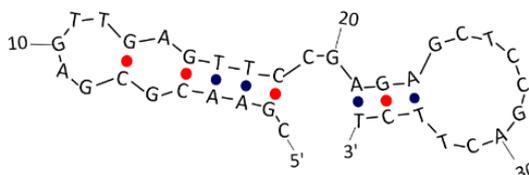
Аптамер представлен в виде разноцветных нитей (лент), где 5'-конец – зелёный, 3' конец – фиолетовый; число в скобках указывает номер кластера

Релаксация исходных моделей привела к значительным структурным изменениям в одинарных цепях как для М-1, так и для М-2 (рисунок 4.2 в, г выделены фиолетовым цветом), потому что одинарные цепи аптамеров очень гибкие, тогда как комплементарные участки довольно жесткие и мало подвержены конформационным изменениям. Несмотря на то, что структуры моделей М-1 и М-2 видоизменились по сравнению с исходными, их вторичная структура осталась прежней, т.е. сохранились основные структурные мотивы и нуклеотиды, образующие их (рисунок 4.2 в, г). В отличие от структур М-1 и М-2, структура модели М-3 не имеет длинных одноцепочечных нитей, и ее полноатомная структура выглядит как две шпильки на 3'- и 5'-концах, которые связаны между собой парой нуклеотидов, а именно С19 и G20 (рисунок 4.4б). Как показано на рисунке 4.2 геометрия М-3 не сильно изменилась после молекулярной динамики. Однако при рассмотрении ее вторичной структуры видно, что «шпилька» с 5'-концом сохраняется (рисунок 4.4), тогда как «шпилька» с 3'-концом претерпевает некоторые изменения. В частности, наблюдается сдвиг нуклеотидов относительно друг друга (рисунок 4.4). Эти сдвиги приводят к уменьшению количества комплементарных пар оснований, но в то же время между новыми парами нуклеотидов образуется большое количество водородных связей, поэтому данные изменения не сильно влияют на общую форму молекулы. Для М-4 существенные изменения геометрии молекулы после МД вызваны наличием выпуклости (нуклеотиды с 9 по 11) в средней части аптамера. Изначально данная структура имеет линейную форму с протяженными дуплексными участками, однако после проведения молекулярной динамики она становится более изогнутой.

После проведения молекулярнодинамических расчетов, для кластеров всех четырех моделей, проводилось сравнение теоретических кривых рассеяния с экспериментом МУРР. При этом, для кластеров, имеющих наименьшее отклонение от экспериментальных данных МУРР, была проведена оптимизация геометрии методом фрагментации молекулярных орбиталей для уточнения

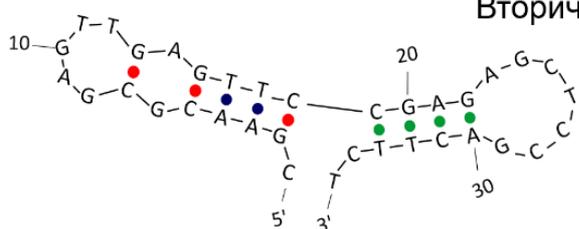
атомной структуры аптамеров. Полученные равновесные геометрии молекул практически не менялись относительно исходных (рисунок 4.2 г, д).

Вторичная структура

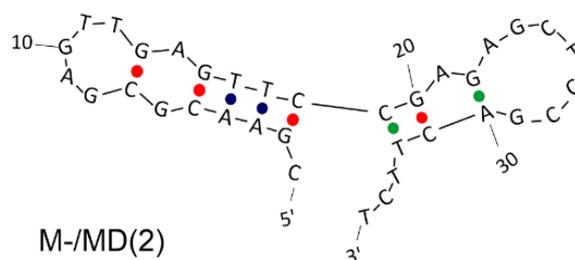


М-3

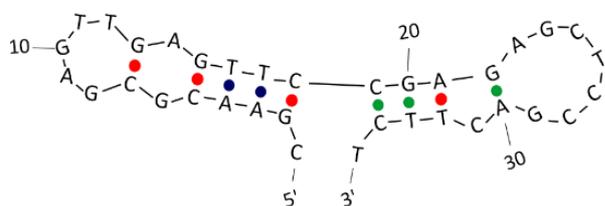
Вторичная структура после МД



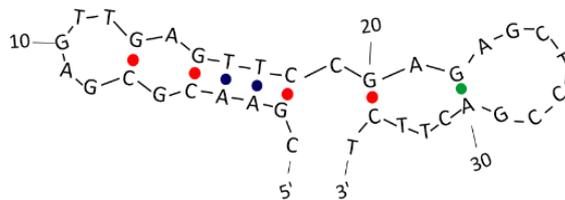
М-3/MD(1)



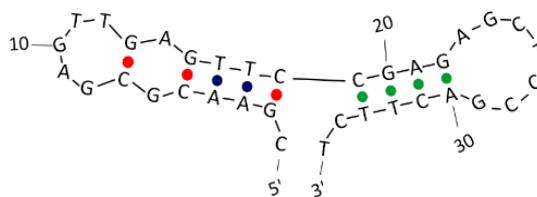
М-3/MD(2)



М-3/MD(3)



М-3/MD(4)



М-3/MD(5)

Рисунок 4.4 – Вторичные структуры модели М-3 после проведения молекулярной динамики и последующей кластеризацией траектории. Красные и синие круги - комплементарные связи, зеленые – не комплементарные

4.2.2 Верификация теоретических моделей с помощью МУРР

На всех этапах молекулярного моделирования проводилось сравнение кривых МУРР от теоретических моделей с экспериментальной кривой, используя программу CRY SOL. Значения отклонений χ^2 между экспериментальными и смоделированными профилями МУРР (рисунок 4.5) приведены в таблице 4.1. Данные МУРР были получены коллегами из лаборатории ФМЯ ИФ ФИЦ КНЦ СО РАН на синхротроне DESY в Германии.

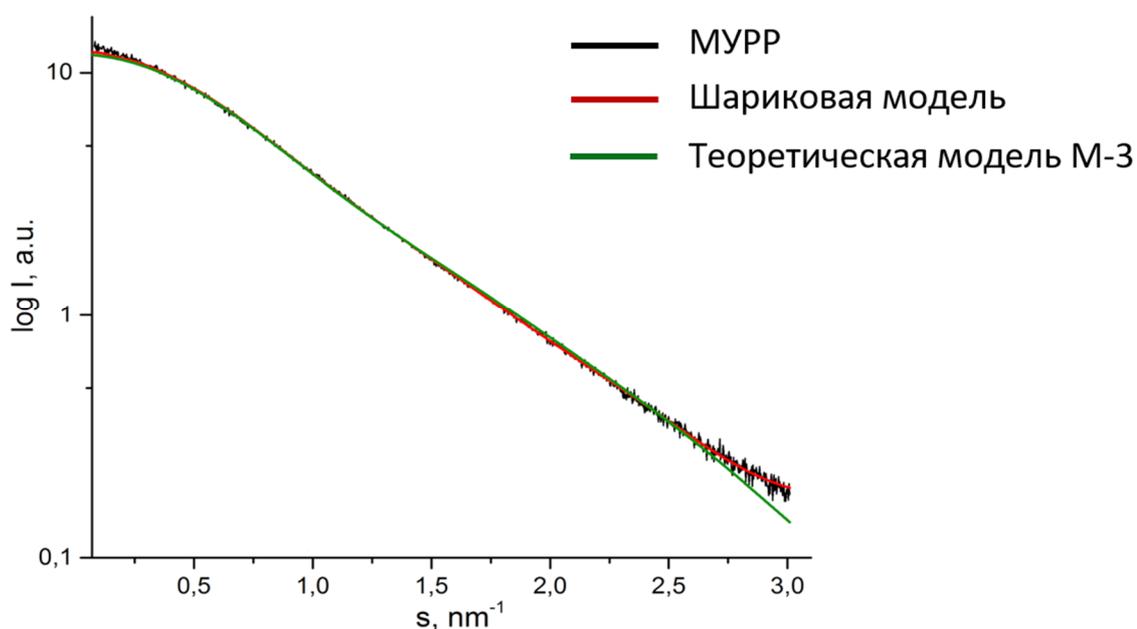


Рисунок 4.5 – Сравнение экспериментального графика с картиной рассеяния от теоретической модели М-3 и шариковой модели

По полученным данным видно, что наименьшее отклонение от эксперимента, среди структур, полученных из МД, имеют модели М-1/МД(2) и М-3/МД(3), а наибольшее отклонение имеет модель М-4/МД(2). Такая же тенденция наблюдается и для моделей, полученных из FMO расчета. Наименьшее отклонение от эксперимента по-прежнему имеют модели М1 и М3, а наибольшее модель М4. Так же стоит отметить, что вторичные структуры модели М-1 и М-3

очень близки. Они имеют схожие нуклеотиды, которые образуют петли или одинарные нити, а именно 8, 9, 19, 20 и участок с 28 по 32 нуклеотид (рисунок 4.2б). Свободные нуклеотиды в структуре очень важны, поскольку они отвечают за специфическое взаимодействие с белковыми мишенями [51]. Зная такой набор нуклеотидов, аптамер можно будет модифицировать для улучшения его связывания с мишенью.

Таблица 4.1. Отклонения χ^2 экспериментальной кривой МУРР для LC-18t от смоделированных кривых на основе расчетов МД и FMO.

Модели LC-18t	χ^2	
	МД	FMO
М-1(1)	17,56	
М-1(2)	3,28	2,48
М-2(1)	17,85	
М-2(2)	17,90	
М-2(3)	8,47	8,39
М-2(4)	19,08	
М-3(1)	7,04	
М-3(2)	7,51	
М-3(3)	2,62	2,69
М-3(4)	7,06	
М-3(5)	9,46	
М-4(1)	25,32	21,59
М-4(2)	29,25	

Поскольку в реальном растворе сольватированные молекулы аптамеров присутствуют в нескольких конформационных состояниях, эксперимент МУРР соответствует усредненной модели по всем возможным конформациям в растворе. Из рисунка 4.6 видно, что некоторые из моделей достаточно хорошо описывают

выпуклые части шариковой модели электронной плотности (модель 2 и 4), а некоторые хорошо описывают ее линейные размеры (модель 1 и 3). При этом не исключено, что некоторый объем, казавшийся пустым для моделей М-1 и М-3 на рисунке 4.6, может быть частично занят небольшими отклонениями в структуре, вызванными локальным вращением гибких групп.

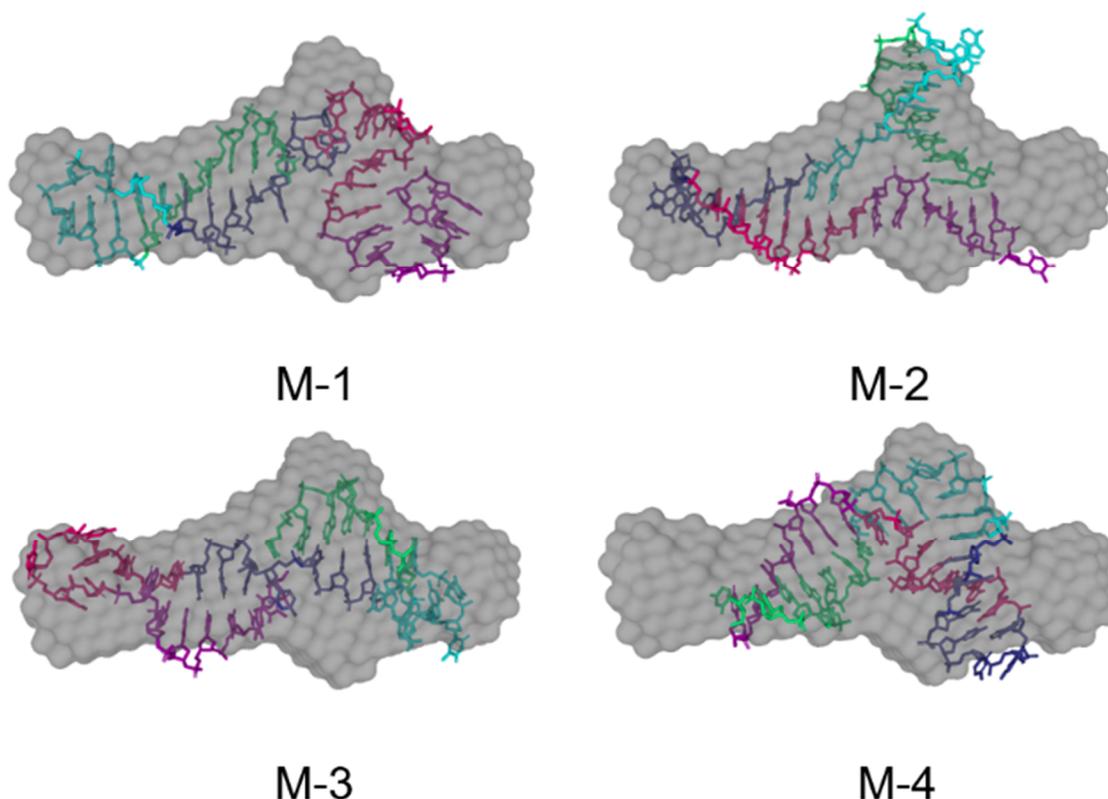


Рисунок 4.6 – Сопоставление возможных конформаций аптамера из расчета МД с его общей электронной плотностью (серый), полученной методом МУРР в программе DAMMIN

В целом видно, что одна и та же конформация аптамера LC-18t физически не может выполнять два условия сразу: описывать хорошо выпуклые части и соответствовать линейным размерам. Наиболее правдоподобное объяснение состоит в том, что несколько конформеров (моделей) релевантны, то есть, они возникают с сопоставимой вероятностью и имеют близкую полную энергию.

В ходе моделирования было показано, что молекулярная динамика позволяет восстанавливать правдоподобные 3D конформации аптамеров, которые имеют

небольшие отклонения от экспериментальных кривых МУРР. При этом дальнейшее проведение оптимизации геометрии полученных структур с помощью квантовохимического метода FMO не является необходимым шагом для установления наиболее вероятных атомных моделей аптамера, поскольку структура не претерпевает значительных геометрических изменений. Однако для проведения дальнейших исследований, а именно для определения энергии взаимодействия с белком, оптимизация геометрии FMO методом является необходимым этапом. В частности, с помощью квантовохимических расчетов можно построить карты электростатического потенциала, используемые для предсказания сайтов связывания. Таким образом молекулярная динамика позволят получить набор различных конформаций аптамера в растворе, а метод FMO в дальнейшем позволит провести более фундаментальные исследования взаимодействия аптамера с белками.

Экспериментальные данные МУРР для аптамера LC-18t и смоделированная атомная структура модели M-3 с наименьшим χ^2 депонированы в биологическую базу данных малоуглового рентгеновского рассеяния SASBDB с кодом: SASDK36.

4.3 Моделирование пространственной структуры аптамера Gli-233

Глиальные опухоли, или глиомы, являются наиболее частыми и агрессивными опухолями головного мозга у взрослых [92]. Низкая специфичность современных методов визуализации не позволяет надежно их дифференцировать, поэтому разработка новых методов для диагностики, визуализации и терапии таких опухолей является важным направлением в медицине. Одним из перспективных соединений для визуализации таких опухолей выявляется аптамеры Gli-55 и Gli-233, которые с высокой аффинностью и специфичностью связываются с клетками опухоли, а визуализация достигается за счет

использования ковалентно связанной с аптамерами флуоресцентной метки Brilliant Violet 650 [93].

Аптамер Gli-233 был синтезирован коллегами из лаборатории БиоМед КрасГМУ. Данный аптамер состоит из 33 нуклеотидов с последовательностью 5'ACT ATT CCA CTG CAA CAA CTG AAC GGA CTG GAA3'. На основе данной последовательности были смоделированы возможные вторичные структуры с помощью программы mFold. Моделирование проводилось в тех же условиях, что и эксперимент МУРР: в присутствии ионов Na^+ (146 мМ), Ca^{2+} (0,5 мМ) и Mg^{2+} (0,5 мМ) при температуре 4 °С. В этих условиях программа mFold выявила только одну возможную вторичную структуру. Предсказанная модель аптамера показана на рисунке 4.7 и включает в себя три структурных участка: петля (центральная часть последовательности), дуплекс В-типа и одноцепочечный сегмент на 5'-конце.

Третичная структура Gli-233 была смоделирована с помощью программы Avogadro. Далее, согласно методике расчета описанной в пункте 4.1, был выполнен расчет молекулярной динамики продолжительностью 200 нс, с последующим проведением кластерного анализа. МД-моделирование проводилось с использованием программного обеспечения GROMACS. В периодическую кубическую ячейку с водой размером $10 \times 10 \times 10$ нм помещался аптамер Gli-233. Затем вся система была нейтрализована ионами Na^+ . Также были добавлены дополнительные ионы Na^+ и Cl^- до общей концентрации соли 0,1 М. В расчетах использовалось силовое поле Amber14sb для аптамера и противоионов, а также модель TIP3P для воды. МД-моделирование было выполнено в рамках NPT ансамбля (при постоянном числе частиц N, давлении P и температуре T). Длины водородосодержащих связей были ограничены их равновесными значениями в силовом поле с помощью метода LINCS [95], который позволял использовать временной шаг 2 фс для интегрирования траектории по времени. Для структур, представляющих центры кластеров, были рассчитаны теоретические спектры МУРР с помощью сервиса CRY SOL и сопоставлены с экспериментом. Экспериментальные данные МУРР были получены коллегами из лаборатории

ФМЯ Института Физики им. Л.В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН на станции ESRF (Франция). График кривых рассеяния представлен на рисунке 4.7.

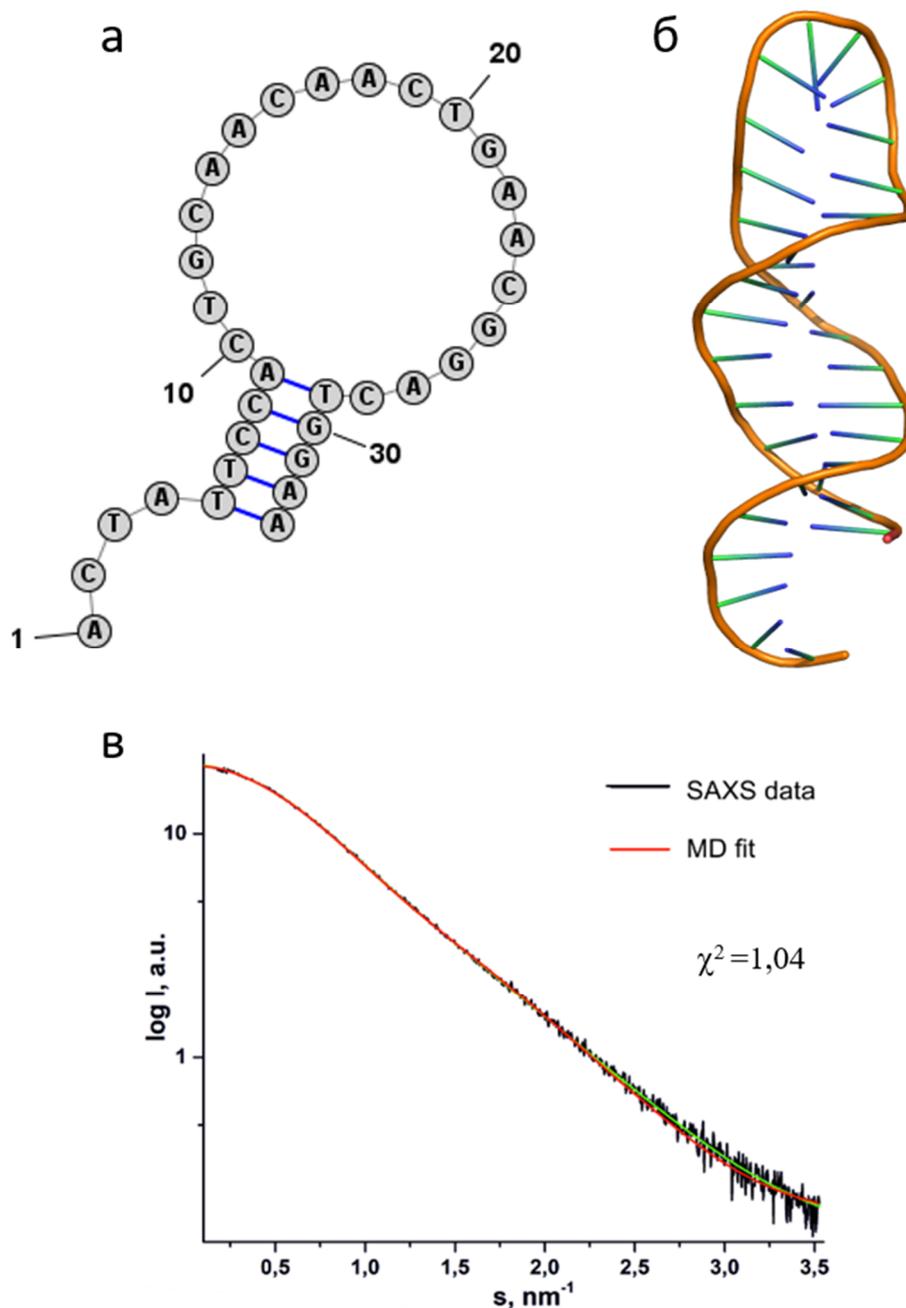


Рисунок 4.7 – Вторичная (а) и третичная (б) структуры аптамера Gli-233; (в) Сравнение экспериментального графика с картиной рассеяния от теоретической модели

По полученным данным видно достаточно хорошее совпадение с экспериментом, отклонение составило $\chi^2 = 1,04$. Это связано с тем, что структура аптамера Gli-233 имеет достаточно длинный жесткий дуплексный домен, который мало подвержен конформационным изменениям в растворе. Экспериментальные данные МУРР и атомная структура аптамера Gli-233 депонированы в биологическую базу данных малоуглового рассеяния SASBDB с кодом: SASDPZ8.

4.4. Моделирование пространственной структуры аптамера Gli-55

Алгоритм моделирования пространственной структуры и ее верификация практически соответствует процедуре, описанной в пункте 4.1, с той лишь разницей, что были дополнительно использованы данные кругового дихроизма. Моделирование вторичной структуры проведено на основе последовательности аптамера Gli-55, состоящего из 60 нуклеотидов, 5'-GTCCG GTTCA CCTCT AGCAT TCCTG GCGTT ATТАА CGGAG CAGTC CTGTG GAGTG GGTGA-3'. Программа mFold предсказала три возможные вторичные структуры аптамера, ранжированные по уменьшению свободной энергии Гиббса (рисунок 4.8 б). На основе полученных вторичных структур были смоделированы 3D-модели аптамеров в программе Avogadro. Построенные «жесткие» пространственные структуры не соответствуют конформациям данных олигонуклеотидов в растворе. Для того чтобы получить конформации моделей близких к эксперименту, были проведены расчеты молекулярной динамики с последующим кластерным анализом траекторий в программном пакете GROMACS. Аптамер сольватировался в периодической кубической ячейке с водой 10x10x10 нм. Затем вся система нейтрализовалась ионами Na^+ и добавлялись дополнительные ионы Na^+ и Cl^- до общей концентрации соли 0,1 М. Использовалось силовое поле Amber14sb для аптамера и противоионов, а также была использована модель

ТРЗР для воды. МД-моделирование продолжительностью 200 нс было выполнено при 310 К и 1 атм. Далее проводились расчёты методом FMO/DFTB3-Zob/PCM только для тех структур, которые имели наименьшее отклонение от эксперимента МУРР. В рамках подхода FMO, система разбивалась на несколько фрагментов, в данном случае фрагментом являлся нуклеотид (всего 55 штук), которые были рассчитаны в электростатическом поле всей системы. Данные МУРР были получены коллегами лаборатории ФМЯ Института Физики им. Л.В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН на станции МУРР P12 BioSAXS Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL), синхротронного центра DESY (Германия).

По рисунку 4.8 видно, что форма вторичной и соответствующей ей третичной структуры могут сильно отличаться. У модели 1 вторичная структура представляет собой “круглую” форму с четырьмя шпильками, соединенными одинарными нитями из пары-тройки нуклеотидов. После построения пространственной модели и проведения молекулярнодинамических и квантовохимических расчётов, модель 1 приобретает более сжатую линейную форму, за счет образования водородных связей между одинарными нитями из нуклеотидов. При рассмотрении вторичной структуры модели 2, сложно определить, как будут расположены четыре петли в пространстве и какие из нуклеотидов останутся доступными для связывания с белковыми мишенями, т. е. анализ только вторичных структур может привести к неправильному предположению о нуклеотидах, которые отвечают за связывание. Более того, модификация неверных нуклеотидов может привести к ухудшению или даже к потере связывания. Проведенные расчёты молекулярной динамики для модели 2 показали, что некоторые нуклеотиды, а именно с 50 по 60, стали недоступны для связывания. Третья модель имеет в своей вторичной структуре большое количество комплементарных участков, т.е. структура достаточно «жесткая» и меньше подвержена конформационным изменениям в растворе. Некая гибкость в структуре достигается за счет некомплементарных участков, образующих

небольшие выпуклости. При этом после проведения расчета МД все нуклеотиды сохранили доступность для связывания с мишенью.

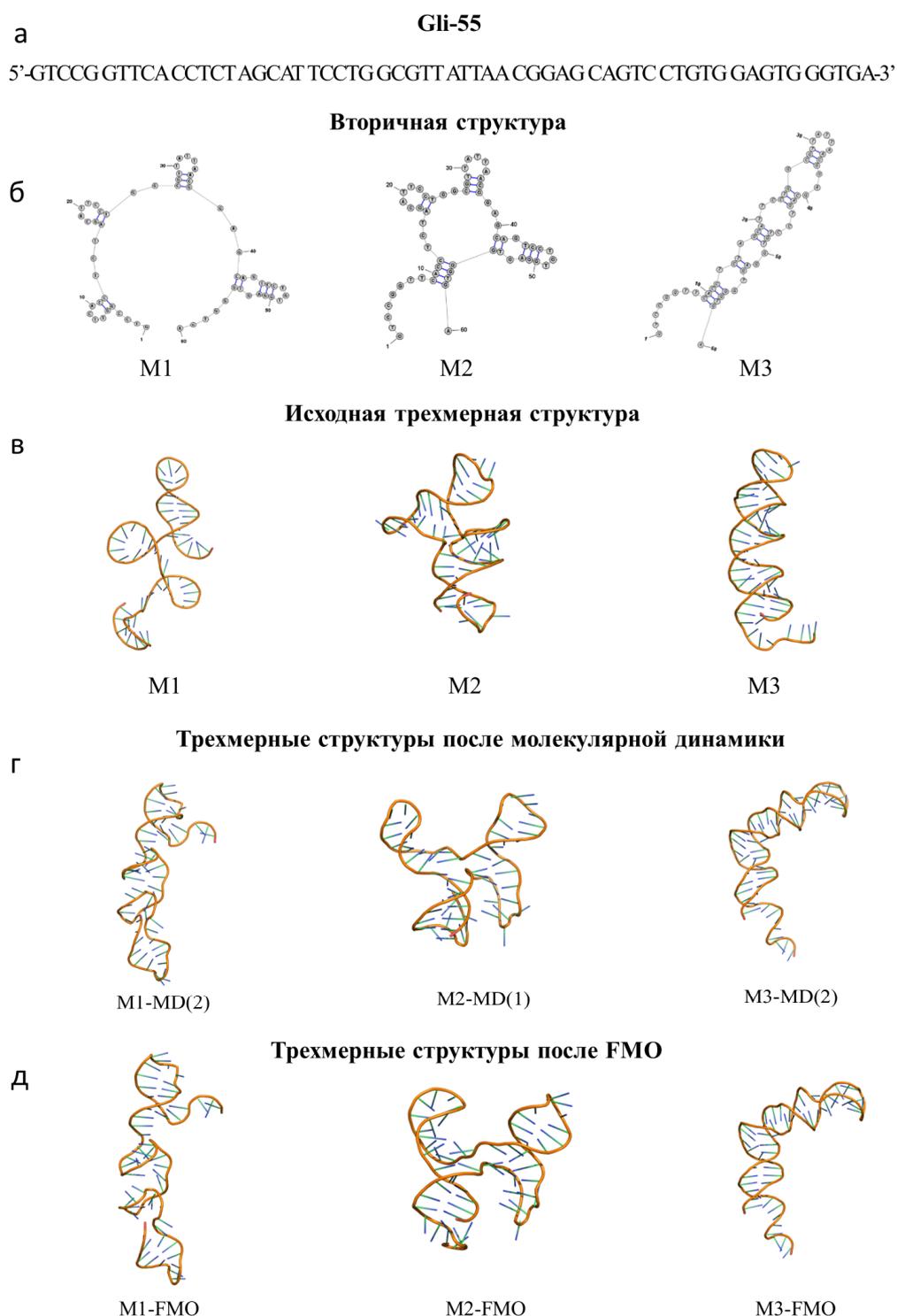


Рисунок 4.8 – (а) Последовательность аптамера Gli-55, (б) вторичные структуры, (в) пространственные структуры, (г) пространственные структуры после расчета МД, (д) пространственные структуры после проведения FMO расчета

4.4.1 Молекулярное моделирование квадруплекса аптамера Gli-55

Поскольку последовательность аптамера Gli-55 содержит большое количество гуанинов, то он может образовывать более сложную структуру, а именно G-квадруплекс (рисунок 4.9). С помощью онлайн сервера QGRS Mapper [83] было установлено, что данный аптамер может образовывать квадруплекс только в одной части последовательности (рисунок 4.9 подчеркнуто и выделено жирным). С помощью программы 3D-Nus [84] было смоделировано 3 возможных варианта, а именно: параллельный, антипараллельный и гибридный квадруплексы (рисунок 4.9). Необходимо отметить, что все структуры стабилизируются катионом калия, который был помещен в геометрический центр фигуры, образованной атомами кислорода гуаниновых оснований квадруплекса. Далее, аналогично структурам, построенным в пункте 4.4, был выполнен расчет МД.

а 5'- GTCCGGTTC ACCTCTAGCAT TCCT GGCGTT ATTAACGGAG CAGTCCTGTG GAGTGGGTGA - 3'



Рисунок 4.9 – а) Нуклеотидная последовательность аптамера Gli-55; б) антипараллельный; в) гибридный; г) параллельный

По полученным пространственным структурам, видно, что строение квадруплекса между моделями достаточно отличается. Гибридный и антипараллельный квадруплексы имеют петли, которые наложились друг на друга, и стали меньше доступны для связывания с потенциальной белковой

мишенью. При рассмотрении модели с параллельным квадруплексом видно, что петли визуально шире и больше и расположены на расстоянии друг от друга, что предоставляет большую поверхность контакта для образования водородных связей с мишенью.

4.4.2 Верификация теоретических моделей с помощью МУРР

Было проведено сравнение кривых рассеяния МУРР от всех возможных смоделированных пространственных структур аптамера Gli-55, используя программу CRY SOL. Значения отклонений χ^2 между экспериментальными и смоделированными профилями МУРР приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2. Отклонения χ^2 смоделированных кривых на основе расчетов МД и FMO от экспериментальной кривой МУРР для Gli-55.

Модели Gli-55	χ^2	
	МД	FMO
М-1	2,18	1,94
М-2	7,95	6,76
М-3	3,70	3,42
Параллельный	2,67	2,65
Гибридный	4,09	
Антипараллельный	4,18	

Наименьший χ^2 имели модель 1 и модель с параллельным квадруплексом, как в расчета МД (2,18 и 2,67), так и в расчетах FMO (1,94 и 2,65, соответственно). В данном случае установить конформацию аптамера только на основе сравнения теоретических моделей с данными МУРР оказывается затруднительным. Было

предложено уточнить возможность нахождения аптамера Gli-55 в структуре с квадруплексом с помощью спектроскопии кругового дихроизма, поскольку квадруплекс обладает хиральностью. Коллегами лаборатории ФМЯ Института Физики им. Л.В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН был снят спектр кругового дихроизма на портативном дихрометре СКД-2МУФ с использованием стандартной кюветы, имеющей оптическую длину пути 1 см, оптическое разрешение 1 нм, при температуре от 5 до 85 °С, с концентрацией исследуемого вещества 0,125 мМ. Спектр КД показал пики на длинах волн 220 и 280 нм, что не соответствует характерным пикам ни для одного из типов квадруплекса [94] (рисунок 4.10). Соответственно, такая конформация в растворе отсутствует, и наиболее близкая конформация аптамера к эксперименту МУРР соответствует модели 1.

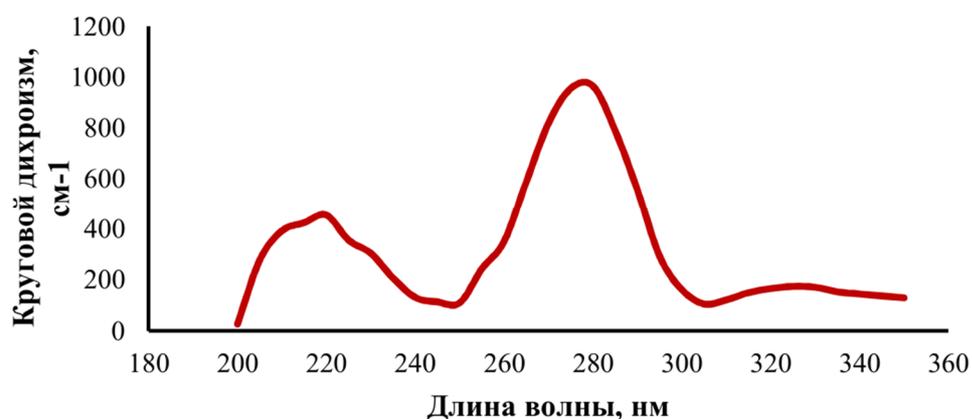


Рисунок 4.10 - Спектр кругового дихроизма для аптамера Gli-55 при 25°C

Таким образом, было установлено, что первая модель аптамера, полученная в ходе компьютерного моделирования, наиболее полно описывает геометрию молекулы в растворе. На рисунке 4.11 а представлен экспериментальный график МУРР совмещённый с теоретическими спектрами МУРР, вычисленными от пространственной теоретической модели и от шариковой модели аптамера. Пространственная форма аптамера Gli-55 (шариковая модель) (рисунок 4.11 б), основанна на парной функции распределения по расстояниям $p(r)$. При наложении

экспериментальной формы (зеленый) на пространственную модель 1 (розовый), которая имела наименьший χ^2 , видно, что смоделированная структура достаточно хорошо описывает общую форму экспериментальной модели (рисунок 4.11 б).

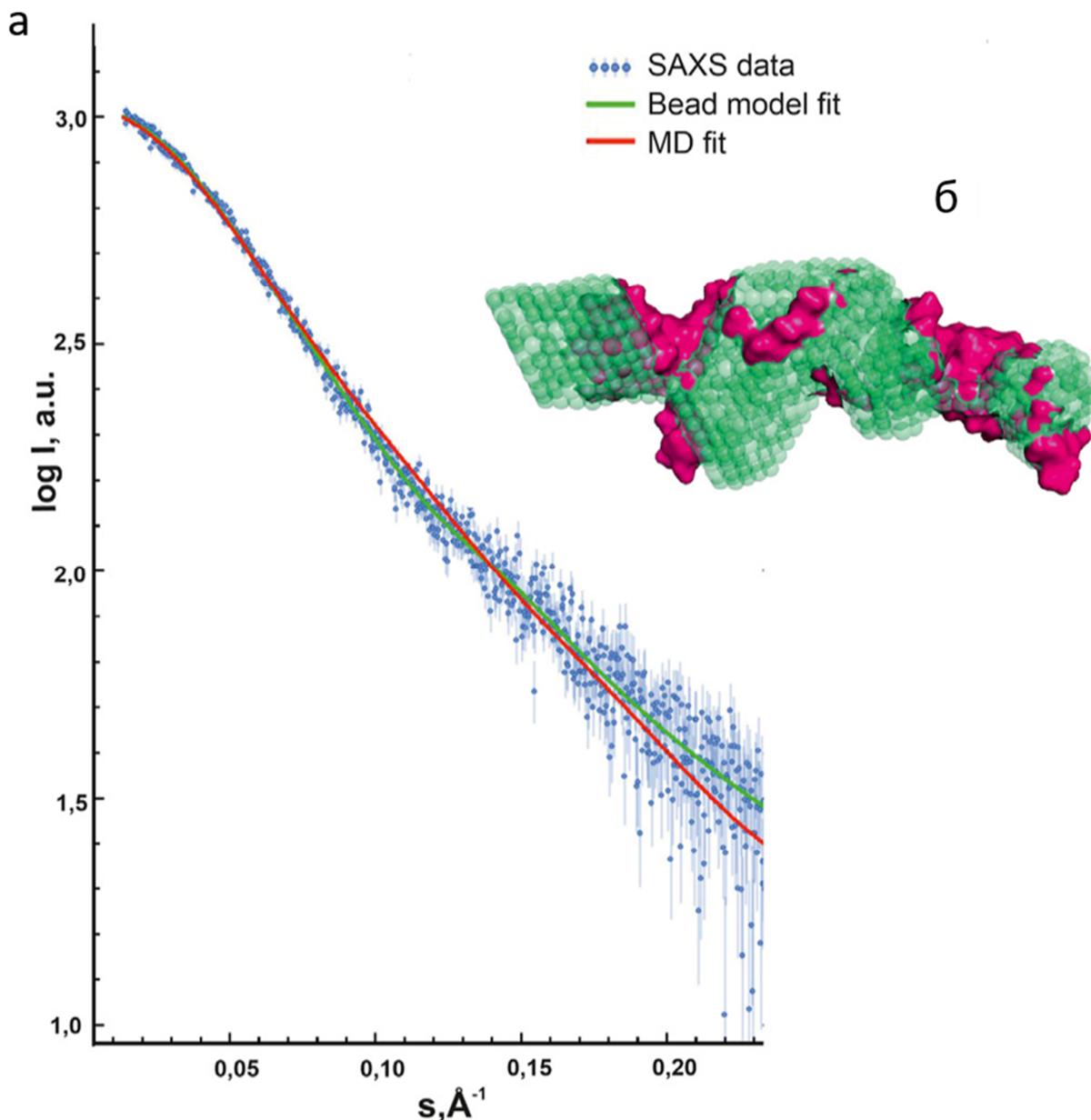


Рисунок 4.11 – а) Экспериментальные данные МУРР (синие точки с обозначением разброса ошибок) совмещённые с теоретическими спектрами МУРР, вычисленными от пространственной теоретической модели (красная линия) и от шариковой модели (зелёная линия) аптамера Gli-55. б) Пространственное совмещение 3D-моделей структуры аптамера Gli-55, полученной методом молекулярного моделирования (розовый) и шариковой модели МУРР (зелёный)

Экспериментальные данные МУРР и атомная структура аптамера Gli-55 депонированы в биологическую базу данных малоуглового рентгеновского рассеяния SASBDB с кодом: SASDRY7.

4.4.3 Укорачивание нуклеотидной последовательности аптамера Gli-55

Поскольку цена за синтез аптамера напрямую зависит от длины его нуклеотидной последовательности, то желательно получить более короткую версию аптамера, сохраняющую свойства полноразмерного предшественника. В работе был предложен вариант обрезки аптамера Gli-55 на основе его вторичной и третичной структуры. Так как за специфичное связывание отвечает не только нуклеотидная последовательность, но и уникальная пространственная структура, укорачивание необходимо было выполнить таким образом, чтобы максимально сохранить структурные мотивы исходного шестидесяти нуклеотидного аптамера Gli-55. Поскольку конформационным изменениям меньше всего подвержена жесткая дуплексная часть, аптамер был укорочен с сохранением наибольшего числа комплементарных участков.

Сначала был предложен вариант обрезки аптамера до 48 нуклеотидов с последовательностью 5'-ТСТ АГСАТ ТССТГ ГСГТТ АТТАА СГГАГ САГТС СТГТГ ГАГТГ ГГТГА-3' (рисунок 4.12). При таком варианте отсекались первые двенадцать нуклеотидов, формирующих небольшую шпильку со стороны 5'-конца. На основании полученной последовательности строилась вторичная структура в программе mFold. В результате была получена только одна структура, которая отличалась от полноразмерной модели первой шпилькой.

Основное отличие заключалось в том, что те нуклеотиды, которые раньше образовывали комплементарные участки (рисунок 4.12, выделены оранжевым цветом), стали некомплементарными и наоборот, те нуклеотиды, которые формировали петлю, либо были некомплементарными (рисунок 4.12, выделены

розовым и бирюзовым цветом), стали образовывать дуплексную часть. Даже такое незначительное отличие может вызвать потерю специфичности при взаимодействии с мишенью. Это связано с тем, что нуклеотид может образовывать водородные связи с мишенью либо через фосфатную группу, когда он находится в дуплексной части, либо через азотистое основание, когда это некоплементарный участок либо одинарная нить, при этом в зависимости от типа основания количество водородных связей может варьироваться. Поэтому очень важно понимание и сохранение расположения нуклеотидов в основных структурных мотивах укороченных версий аптамеров.

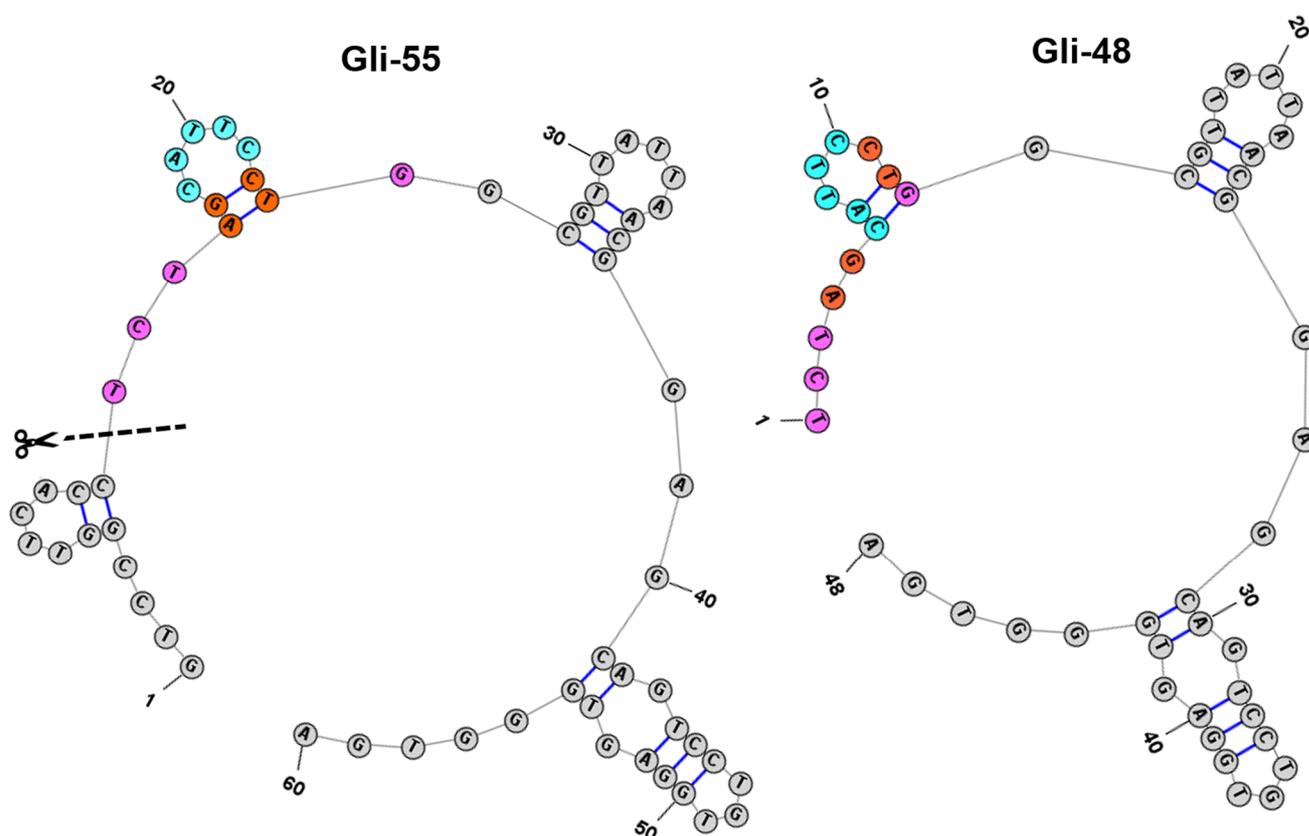


Рисунок 4.12 – Вторичная структура полноразмерного аптамера Gli-55 и его укороченной версии Gli-48

Второй вариант обрезки исключал изменяющуюся шпильку, из структуры было вырезано двадцать пять нуклеотидов со стороны 5'-конца (рисунок 4.13а, выделено серым цветом). В результате обрезки был получен аптамер Gli-35,

содержащий тридцать пять нуклеотидов с последовательностью 5'- GCGTT ATТАА CGGAG CAGTC CTGTG GAGTG GGTGA-3. На основе новой последовательности была получена вторичная структура. Из рисунка 4.13 а, б видно, что структурные мотивы из полноразмерного аптамера, а именно две шпильки и две одинарные нити, сохранились в укороченной версии. Более того, они образованы теми же нуклеотидами, что и у аптамера Gli-55. Далее была смоделирована полноатомная модель и проведен расчет молекулярной динамики, который показал, что атомная структура аптамера Gli-35 достаточно близка к геометрии полноразмерного аптамера (рисунок 4.13 а, б). Принципиальное отличие в структурах аптамеров Gli 55 и Gli-35 заключалось в одинарной нити нуклеотидов (рисунок 4.13 а, б), которая в растворе достаточно гибка. От полученной теоретической модели была смоделирована кривая рассеяния МУРР, которая в дальнейшем может быть использована для сравнения с экспериментальными данными, когда таковые будут проведены. Таким образом будет верифицирована смоделированная модель усеченного аптамера Gli-35.

Далее нашими коллегами из лаборатории БиоМед КрасГМУ было проверено связывание аптамеров с клетками глиобластомы головного мозга при помощи метода проточной цитометрии. Данный метод основан на регистрации флуоресценции и светорассеяния от отдельных клеток или частиц, проходящих через лазерный луч в струе жидкости. Из рисунка 4.14в видно, что доля клеток, связывающихся с аптамерами Gli-55 и Gli-35 составляет 45% и 40%, соответственно. Аптамеры проявляют близкие связывающие свойства, но при этом полученная укороченная последовательность почти в 2 раза меньше исходной. Более того, у укороченной версии аптамера повысилась специфичность, т.е. уменьшилась вероятность связывания с молекулами, отличными от мишени. Данный результат показывает эффективность применения молекулярного моделирования для установления пространственной структуры аптамеров и возможность проведения на ее основе укорачивания нуклеотидной последовательности с сохранением связывающих свойств.

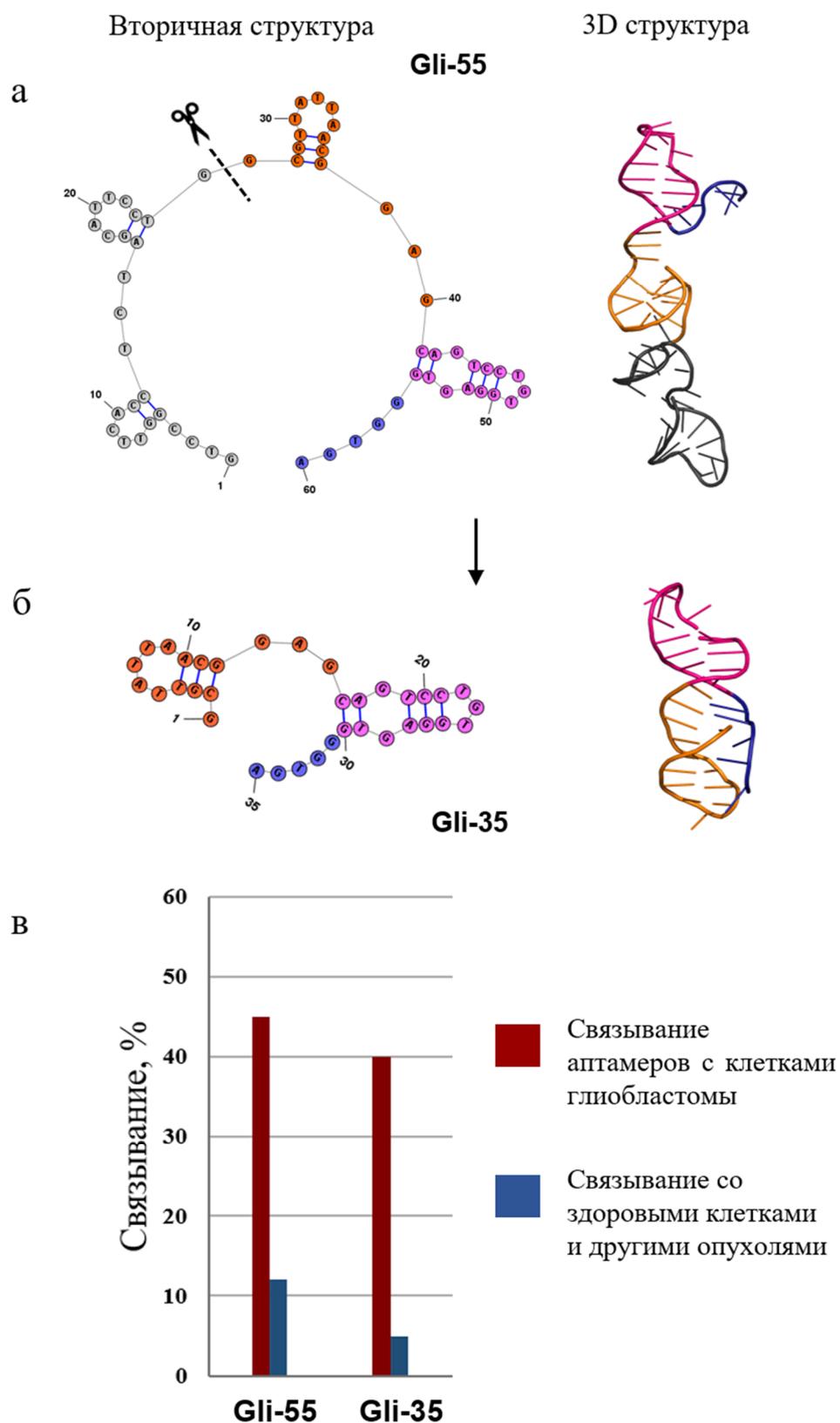


Рисунок 4.13 – Вторичная и пространственная структуры аптамеров Gli-55(а) и Gli-35 (б); Доля связанных клеток для исходного и укороченного аптамера (в) (красный- связывание аптамеров с клетками глиобластомы; синий – связывание со здоровыми клетками и другими опухолями)

В результате проведенного исследования была показана эффективность применения компьютерного моделирования для модификации структуры аптамера, а именно укорачивания его нуклеотидной последовательности с сохранением специфичности и связывающих свойств. Такой подход поможет избежать синтеза большого количества аптамеров с разными вариантами усеченных последовательностей, которые были бы получены “вслепую”, и проверки их связывающих свойств с целевой мишенью.

4.4 Моделирование пространственной структуры аптамера Apt-31

В основном, высокоспецифичные аптамеры получают с помощью процедуры SELEX, однако, с ростом вычислительных мощностей, все чаще стали появляться *in silico* подходы для разработки аптамеров. Так был получен аптамер Apt31, который с высокой специфичностью и селективностью связывается с рецептор-связывающим доменом RBD белка коронавируса SARS-CoV-2.

Аптамер Apt31 состоит из тридцати одного нуклеотида с последовательностью: 5' – CGGATGGAAT TTTG TTC GTTG ATTCCATCCG – 3'. С помощью программы mFold были смоделированы возможные вторичные структуры на основе данной последовательности. Моделирование проводилось в тех же условиях, что и эксперимент МУРР: в присутствии ионов Na⁺ (146 мМ), Ca²⁺ (0,5 мМ) и Mg²⁺ (0,5 мМ) при температуре 20 °С. При таких условиях была получена только одна возможная вторичная структура с наименьшей свободной энергией Гиббса, которая представлена на рисунке 4.14. Полученная теоретическая модель состоит из двух структурных мотивов: дуплексной части, состоящей из 10 пар нуклеотидов (на рисунке 4.14 отмечены синими и красными кружками), и петли, находящейся между 10G и 22A и включающей в себя одиннадцать оснований.

На основе вторичной структуры строилась атомная модель аптамера в программе Avogadro. Далее проводился расчет молекулярной динамики. Аптамер был помещен в периодическую кубическую ячейку с водой размером $10 \times 10 \times 10$ нм. Затем вся система нейтрализовалась ионами Na^+ и добавлялись дополнительные ионы Na^+ и Cl^- до общей концентрации соли 0,1 М. Расчет выполнен в рамках ансамбля NPT с использованием термостата перемасштабирования скорости (velocity rescaling thermostat) и с использованием баростата Парринелло-Рамана. Продолжительность динамики составила 200 нс. В расчетах использовалось силовое поле Amber14sb для аптамера и противоионов, а также модель TIP3P для воды.

Далее было проведено сравнение кривых рассеяния МУРР от теоретической атомной модели и кривой рассеяния от раствора аптамера. Полученное расхождение между молекулярной моделью и данными МУРР составило $\chi^2 = 1,298$, что свидетельствует о хорошем совпадении атомной структуры аптамера с экспериментом. Более того, при наложении экспериментальной пространственной формы МУРР (рисунок 4.15 д, зеленый) с 3D-моделью, видно, что структура, полученная молекулярным моделированием, достаточно хорошо описывает как линейные размеры (длина атомной модели составила 55 Å, а длина шариковой модели составила 57 Å), так и общую экспериментальную форму.

Данные МУРР были получены коллегами из лаборатории ФМЯ Института физики ФИЦ КНЦ СО РАН на станции МУРР 13A BioSWAN синхротронного центра NSRRC (Тайвань). Смоделированная атомная структура аптамера Apt31 и экспериментальные данные МУРР депонированы в базу данных SASBDB с кодом: SASDMU7.

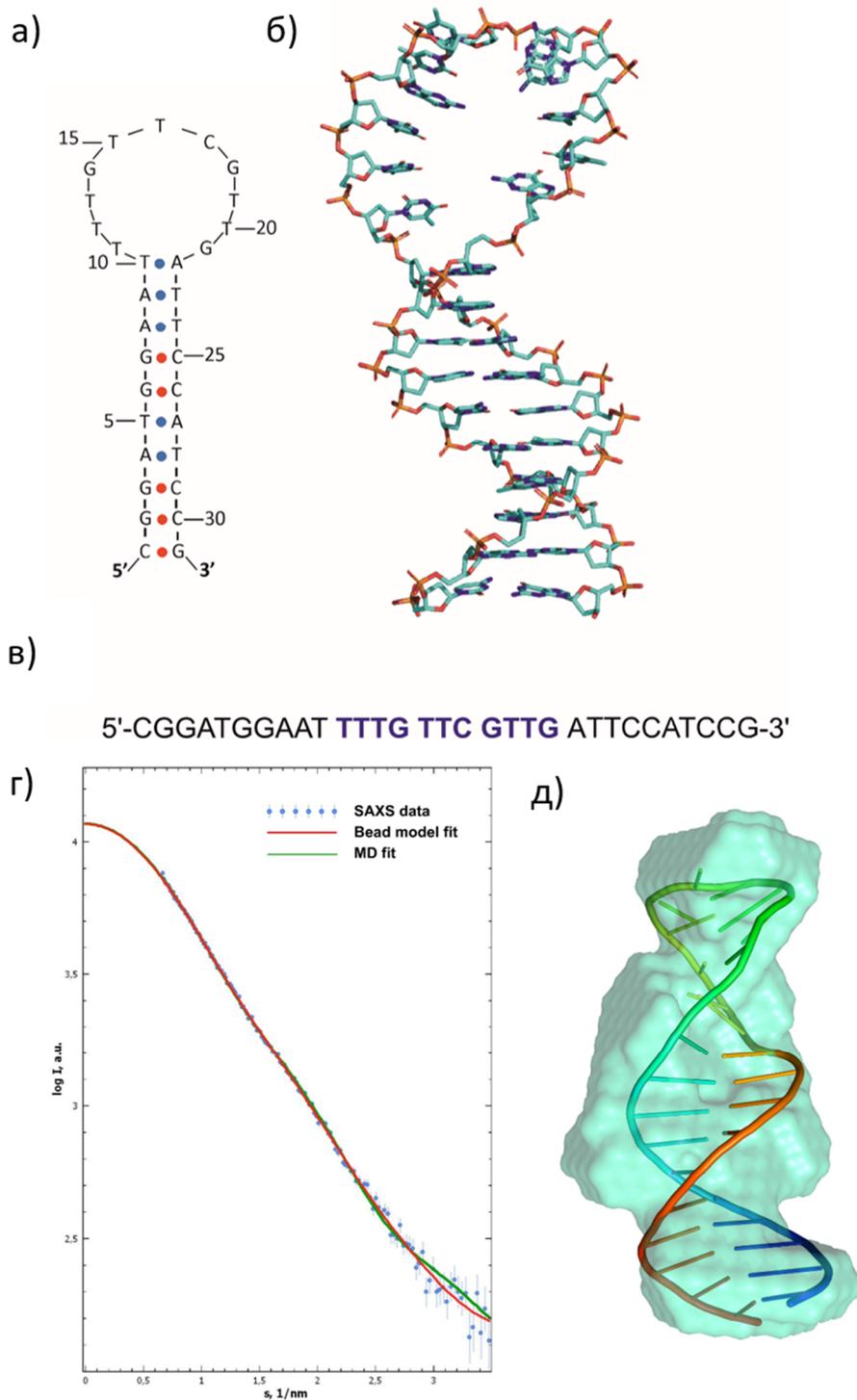


Рисунок 4.14 – (а) Вторичная структура аптамера Apt31; (б) Пространственная модель; (в) Нуклеотидная последовательность; (г) Экспериментальные данные МУРР (синие кружки), теоретические кривые МУРР, рассчитанные для шариковой модели, основанной на функции $\rho(r)$ (красный график) и 3D-модели (зеленый график). (д) Сравнение 3D-структуры Apt31 (разноцветная структура) с пространственной формой аптамера из МУРР (зеленый цвет)

В целом, из проведенной работы видно, что методы молекулярного моделирования позволяют изучить и спрогнозировать ключевые характеристики атомной и электронной структуры новых материалов на базе синтетических олигомеров, что в дальнейшем поможет разработать эффективные биосенсоры для различных медицинских задач.

Заключение

В рамках работы были получены следующие результаты:

1. Показано, что увеличение числа бензотиазольных групп в цепи сополифлуорена приводит к уменьшению энергетической щели с 2,90 эВ до 2,73 эВ и, как следствие, к изменению спектральных свойств. Теоретически рассчитанный спектр поглощения олигомера с двумя звеньями бензотиазола сдвигается в длинноволновую область спектра на 0,08 эВ по сравнению с олигомером, содержащим одно звено бензотиазола, что согласуется с экспериментальными данными для соответствующих олигомеров.

2. Расчеты олигомеров сополифлуоренов с боковыми алкильными заместителями показали, что электронные состояния цепи предельных углеводородов не вносят вклад в образование молекулярных орбиталей, определяющих основные электронные переходы в поглощении и люминесценции. Рассчитанные теоретические спектры поглощения олигомеров с различными алкильными заместителями показали, что их длина не оказывает существенное влияние на оптические свойства.

3. На примере аптамера RE-31 показано, что применение метода молекулярной динамики позволяет восстановить геометрию молекулы в растворе, которая лучше описывает экспериментальные кривые рассеяния малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) в сравнении с атомной структурой, полученной полуэмпирическим методом РМ6.

4. Смоделированы вторичные и третичные атомные структуры ряда ДНК-аптамеров в растворе на основе экспериментальных данных МУРР. Равновесные геометрии аптамеров Gli-55 и LC-18t полученные методами MD/Amber14sb/TIP3P и FMO/DFTB3 одинаково хорошо согласуются с экспериментом МУРР.

5. На основе сопоставления кривых рассеяния теоретических моделей аптамера LC-18t, полученных из расчётов методами молекулярной динамики и

функционала плотности, с экспериментальной кривой рассеяния МУРР, показано, что в растворе сосуществуют несколько конформаций.

6. В результате расчета атомной структуры аптамера Gli-55 с шестидесятью нуклеотидами были выявлены ключевые участки, ответственные за формирование пространственной конфигурации и предложена укороченная версия аптамера с тридцатью пятью нуклеотидами – Gli-35, сохраняющая их. Согласно экспериментальным данным упрощённая молекулярная структура повышает специфичность и сохраняет связывающую способность с клетками глиобластомы головного мозга, в сравнении с полноразмерным аптамером Gli-55.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Smyslov R. Yu. Synthesis and photophysical properties of copolyfluorenes for light emitting applications: Spectroscopic experimental study and theoretical DFT consideration / R. Yu. Smyslov, F. N. Tomilin, **I. A. Shchugoreva**, G. I. Nosova, E. V. Zhukova, L. S. Litvinova, A. V. Yakimansky, I. Kolesnikov, I. G. Abramov, S. G. Ovchinnikov, P. V. Avramov // *Polymer*. – 2019. – Т. 168. – P. 185 – 198.
2. Tomilin F. N. Four steps for revealing and adjusting the 3D structure of aptamers in solution by small-angle X-ray scattering and computer simulation / F. N. Tomilin, R. V. Moryachkov, **I. A. Shchugoreva**, V. N. Zabluda, G. Peters, M. Platunov, V. Spiridonova, A. Melnichuk, A. Atrokhova, S. S. Zamay, S. G. Ovchinnikov, G. S. Zamay, A. Sokolov, T. N. Zamay, M. V. Berezovski, A. S. Kichkailo // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2019. – Т. 411. – P. 6723 – 6732.
3. Morozov D. The role of SAXS and molecular simulations in 3D structure elucidation of a DNA aptamer against lung cancer / D. Morozov, V. Mironov, R. V. Moryachkov, **I. A. Shchugoreva**, P. V. Artyushenko, G. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, T. N. Zamay, A. V. Krat, D. S. Molodenskiy, V. N. Zabluda, D. V. Veprintsev, A. E. Sokolov, R. A. Zukov, M. V. Berezovski, F. N. Tomilin, D. G. Fedorov, Y. Alexeev, A. S. Kichkailo // *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. – 2021. – Т. 25. – P. 316 – 327.
4. Mironov V. Structure-and Interaction-Based Design of Anti-SARS-CoV-2 Aptamers / V. Mironov, **I. Shchugoreva**, P. Artyushenko, D. Morozov, N. Borbone. et. al. // *Chemistry–A European Journal*. – 2022. – Т. 28. – №. 12. – P. e202104481.
5. Kichkailo A. S. Development of DNA Aptamers for Visualization of Glial Brain Tumors and Detection of Circulating Tumor Cells / A. S. Kichkailo, A. A. Narodov, M. A. Komarova, T. N. Zamay, G. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, E. E. Erakhtin, Y. E. Glazyrin, D. V. Veprintsev, R. V. Moryachkov, V. V. Zabluda, **I. Shchugoreva**, P. Artyushenko, et. al. // *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. – 2023. – Т. 32. – P. 267 – 288.

Патенты:

1. RU 2751797 C1. Способ определения пространственной структуры биомолекул / Морячков Р. В, Слатинская О. В., **Щугорева И. А.**, Заблуда В. Н., Соколов А. Э. // № 2020140839 заявл. 11.12.2020., опубл. 19.07.2021.

Список сокращений

АО	Атомная Орбиталь
БТ	Бензотиазол
ВЗМО	Высшая Занятая Молекулярная Орбиталь (англ. HOMO - Highest Occupied Molecular Orbital)
ДНК	Дезоксирибонуклеи́новая кислота́
КД	Круговой Дихроизм
крио-ЭМ	Крио-Электронная Микроскопия
МД	Молекулярная Динамика
МО	Молекулярная Орбиталь
МУРР	Метод Малоуглового Рентгеновского Рассеяния (англ. SAXS - Small-Angle X-ray Scattering)
НВМО	Низшая Вакантная Молекулярная Орбиталь (англ. LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
ОТ-ПЦР	Полимеразная Цепной Реакция с Обратной Транскрипцией
оцДНК	одноцепочечная дезоксирибонуклеи́новая кислота́
ПЦР	Полимеразной Цепной Реакции
РНК	Рибонуклеи́новая кислота́
СП	Сопряженный Полимер
ЯМР	спектроскопия Ядерного Магнитного Резонанса
DFT	Density Functional Theory (рус. Теория функционала плотности)
GAMESS	General Atomic and Molecular Electronic Structure System
GROMACS	Groningen Machine for Chemical Simulation
LDA	Local Density Approximation
PME	Particle-Mesh Ewald
SASBDB	Small Angle Scattering Biological Data Bank

SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment (рус. систематическая эволюция лигандов путём экспоненциального обогащения)
TD-DFT	Time-Dependent Density Functional Theory (Временно-зависимая теория функционала плотности)
TIP3P	Transferable Intermolecular Potential 3P
XRD	X-Ray Diffraction (рус. Рентгеновская дифракция)

Благодарности

Выражаю особую благодарность своему научному руководителю Томилину Феликсу Николаевичу за чуткое руководство и конструктивные советы при выполнении и интерпретации исследований, заведующей лабораторией Цифровых управляемых лекарств и тераностики Кичкайло Анне Сергеевне за актуальную и востребованную тему исследования и ценные советы, близким друзьям и коллегам Артюшенко Полине Владимировне, Роговой Анастасии Владимировне и Высотину Максиму Александровичу за отзывчивость, понимание и невероятную поддержку, всем соавторам статей и в особенности Морячкову Роману Владимировичу, Миронову Владимиру Андреевичу и Морозову Дмитрию Ивановичу за успешное многолетнее сотрудничество.

Отдельная благодарность Межведомственному суперкомпьютерному центру Российской академии наук за предоставление вычислительных мощностей.

Список литературы

1. Biosensors: fundamentals and applications / ed. Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. Oxford [Oxfordshire] ; New York: Oxford University Press, 1987. 770 p.
2. Cai, S. Investigations on the interface of nucleic acid aptamers and binding targets / S. Cai, J. Yan, H. Xiong et.al. // *Analyst*. – 2018. – Vol. 143, № 22. – P. 5317–5338.
3. Hamaguchi, N. Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins / N. Hamaguchi, A. Ellington, M. Stanton// *Analytical Biochemistry*. – 2001. – Vol. 294, № 2. – P. 126–131.
4. Ho, H.-A. Optical Sensors Based on Hybrid Aptamer/Conjugated Polymer Complexes / H.-A. Ho, M. Leclerc // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – Vol. 126, № 5. – P. 1384–1387.
5. Bao, B. Rapid aptasensor capable of simply detect tumor markers based on conjugated polyelectrolytes / B. Bao, P. Su, J. Zhu et.al. // *Talanta*. – 2018. – Vol. 190. – P. 204–209.
6. Schlick, T. Biomolecular modeling thrives in the age of technology / T. Schlick, S. Portillo-Ledesma // *Nat Comput Sci*. – 2021. – Vol. 1, № 5. – P. 321–331.
7. Schlick, T. Biomolecular Structure and Modeling: Historical Perspective / T. Schlick // *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*. New York, NY: Springer New York, – 2010. – Vol. 21. – P. 1–40.
8. Shavitt I., Bartlett R.J. Many-body methods in chemistry and physics: MBPT and coupled-cluster theory. Cambridge ; New York: Cambridge University Press, 2009. 532 p.
9. Riniker, S. On developing coarse-grained models for biomolecular simulation: a review / S. Riniker, J. R. Allison and W. F. van Gunsteren // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2012. – Vol. 14, № 36. – P. 12423.

10. Bahadır, E.B. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses / E.B. Bahadır, M.K. Sezgintürk // *Analytical Biochemistry*. – 2015. – Vol. 478. – P. 107–120.
11. Lim, Y.C. Aptasensors Design Considerations // *Computational Intelligence and Intelligent Systems* / Y.C. Lim, A.Z. Kouzani, W. Duan // ed. Cai Z. et al. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg – 2009. – Vol. 51. – P. 118–127.
12. Huang, R. A Sensitive Aptasensor Based on a Hemin/G-Quadruplex-Assisted Signal Amplification Strategy for Electrochemical Detection of Gastric Cancer Exosomes / R. Huang, L. He, Y. Xia, H. Xu, et.al. // *Small*. – 2019. – Vol. 15, № 19. – P. 1900735.
13. Choi, N. SERS biosensors for ultrasensitive detection of multiple biomarkers expressed in cancer cells / N. Choi, H. Dang, A. Das, et.al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2020. – Vol. 164. – P. 112326.
14. Rahtuvanoglu, A. Biomimetic Nanoparticles Based Surface Plasmon Resonance Biosensors for Histamine Detection in Foods / A. Rahtuvanoglu, S. Akgönüllü, S. Karacan, et.al. // *ChemistrySelect*. – 2020. – Vol. 5, № 19. – P. 5683–5692.
15. Zhao, X. Aptamer-based fluorescent sensors for the detection of cancer biomarkers / X. Zhao, X. Dai, S. Zhao et.al. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – Vol. 247. – P. 119038.
16. Liu, X. DNA biosensors based on water-soluble conjugated polymers / X. Liu, Q. Fan, W. Huang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – Vol. 26, № 5. – P. 2154–2164.
17. Thomas, S.W. Chemical Sensors Based on Amplifying Fluorescent Conjugated Polymers / S.W. Thomas, G.D. Joly, T.M. Swager // *Chem. Rev.* – 2007. – Vol. 107, № 4. – P. 1339–1386.
18. Feng, F. Fluorescent Conjugated Polyelectrolytes for Biomacromolecule Detection / F. Feng, F. He, L. An, S. Wang, et al.// *Adv. Mater.* – 2008. – Vol. 20, № 15. – P. 2959–2964.

19. Zhuo, Z. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine / Z. Zhuo, Y. Yu, M. Wang, et al. // *IJMS*. – 2017. – Vol. 18, № 10. – P. 2142.
20. Gold, L. SELEX: How It Happened and Where It will Go / L. Gold // *J Mol Evol*. – 2015. – Vol. 81, № 5–6. – P. 140–143.
21. Murphy C. Antibody, Aptamer and Affimer-Based Affinity Tools for Marine Toxin Biosensing. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2023.
22. Keefe, A.D. Aptamers as therapeutics / A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington // *Nat Rev Drug Discov*. – 2010. – Vol. 9, № 7. – P. 537–550.
23. Sharifi, J. Improving monoclonal antibody pharmacokinetics via chemical modification / J. Sharifi, L.A. Khawli, J.L. Hornick, et.al. // *Q J Nucl Med*. 1998. – Vol. 42, № 4. – P. 242–249.
24. White, R. R. Developing aptamers into therapeutics / R. R. White, B. A. Sullenger and C. P. Rusconi // *J. Clin. Invest*. – 2000. – Vol. 106, № 8. – P. 929–934.
25. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction / M. Zuker // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31, № 13. – P. 3406–3415.
26. Mironov, V. Structure- and Interaction-Based Design of Anti-SARS-CoV-2 Aptamers / V. Mironov, I. A. Shchugoreva, P.V. Artyushenko et.al. // *Chemistry A European J*. – 2022. – Vol. 28, № 12.
27. Ringquist, S. High-Affinity RNA Ligands to Escherichia coli Ribosomes and Ribosomal Protein S1: Comparison of Natural and Unnatural Binding Sites / S. Ringquist, T. Jones, E. E. Snyder, et al. // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34, № 11. – P. 3640–3648.
28. Hermann, T. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers / T. Hermann, D.J. Patel // *Science*. – 2000. – Vol. 287, № 5454. – P. 820–825.
29. Yang, Y. Structural Basis of Ligand Discrimination by Two Related RNA Aptamers Resolved by NMR Spectroscopy / Y. Yang, M. Kochoyan, P. Burgstaller, et al. // *Science*. – 1996. – Vol. 272, № 5266. – P. 1343–1347.

30. Chayen, N.E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal / N.E. Chayen, E. Saridakis // *Nat Methods*. – 2008. – Vol. 5, № 2. – P. 147–153.
31. Li, J. Not so crystal clear: the structure of the human telomere G-quadruplex in solution differs from that present in a crystal / J. Li, J. J. Correia, L. Wang, et.al. // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33, № 14. – P. 4649–4659.
32. Adrian, M. NMR spectroscopy of G-quadruplexes / M. Adrian, B. Heddi, A.T. Phan // *Methods*. Academic Press, – 2012. – Vol. 57, № 1. – P. 11–24.
33. Van Buuren, B.N.M. NMR Spectroscopic Determination of the Solution Structure of a Branched Nucleic Acid from Residual Dipolar Couplings by Using Isotopically Labeled Nucleotides / B. N. Van Buuren, J. Schleucher, V. Wittmann, C. Griesinger, et.al. // *Angewandte Chemie International Edition*. John Wiley & Sons, Ltd, – 2004. – Vol. 43, № 2. – P. 187–192.
34. Hammel, M. Validation of macromolecular flexibility in solution by small-angle X-ray scattering (SAXS) / M. Hammel // *European Biophysics Journal*. Springer, – 2012. – Vol. 41, № 10. – P. 789–799.
35. Rambo R.P., Tainer J.A. Super-resolution in solution x-ray scattering and its applications to structural systems biology / R.P. Rambo, J.A. Tainer // *Annual Review of Biophysics*. Annual Reviews, – 2013. – Vol. 42, № 1. – P. 415–441.
36. Viéville, J.M.P. Duplex formation and secondary structure of γ -PNA observed by NMR and CD / J. M. P. Viéville, S. Barluenga, N. Winssinger, M. A. Delsuc // *Biophysical Chemistry*. Elsevier B.V., – 2016. – Vol. 210. – P. 9–13.
37. Handbook of conducting polymers. 2nd ed., rev.expanded / ed. Skotheim T.A., Elsenbaumer R.L., Reynolds J.R. New York: M. Dekker, 1998. 1097 p.
38. Shirakawa, H. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, $(\text{CH})_x$ / H. Shirakawa, E. J. Louis, A. G. MacDiarmid, C. K. Chiang, A. J. Heeger // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* – 1977. – № 16. – P. 578.

39. Rochat, S. Conjugated Amplifying Polymers for Optical Sensing Applications / S. Rochat, T.M. Swager // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2013. – Vol. 5, № 11. – P. 4488–4502.
40. Hodgkinson W.R., Matthews F.E. XXIII.—Note on some derivatives of fluorene, C₁₃H₁₀ / W.R. Hodgkinson, F.E. Matthews // J. Chem. Soc., Trans. – 1883. – Vol. 43, № 0. – P. 163–172.
41. Inaoka S., Advincula R. Synthesis and Oxidative Cross-Linking of Fluorene-Containing Polymers To Form Conjugated Network Polyfluorenes: Poly(fluorene-9,9-diyl-*alt*-alkan- α,ω -diyl) / S. Inaoka, R., Advincula // Macromolecules. – 2002. – Vol. 35, № 7. – P. 2426–2428.
42. Jiang, H. Conjugated Polyelectrolytes: Synthesis, Photophysics, and Applications / H. Jiang, P. Taranekekar, J. R. Reynolds, Schanze, K. S. // Angew. Chem. Int. Ed. – 2009. – Vol. 48, № 24. – P. 4300–4316.
43. Li K., Liu B. Water-soluble conjugated polymers as the platform for protein sensors / K. Li, B. Liu // Polym. Chem. – 2010. – Vol. 1, № 3. – P. 252–259.
44. Xue, C. Highly Water-Soluble, Fluorescent, Conjugated Fluorene-Based Glycopolymers with Poly(ethylene glycol)-Tethered Spacers for Sensitive Detection of *Escherichia coli* / C. Xue, S. Velayudham, S. Johnson, R. Saha, A. Smith, W. Brewer, et al. // Chemistry—A European Journal – 2009. – Vol. 15, № 10. – P. 2289–2295.
45. Çarbaş B.B., Kivrak A., Önal A.M. A new processable electrochromic polymer based on an electron deficient fluorene derivative with a high coloration efficiency / B.B. Çarbaş, A. Kivrak, A.M. Önal // Electrochimica Acta. – 2011. – Vol. 58. – P. 223–230.
46. He Z. et al. Miniemulsion polymerization-formulated poly(fluorene-*alt*-6-(2-ethylhexyl)-[1,2,5]thiadiazole[3,4-*f*]benzotriazole) for cancer cell imaging / Z. He, X. Han, H. Xie, Z. Yan, B. Guo, Y. Yao // Reactive and Functional Polymers. – 2022. – Vol. 170. – P. 105130.
47. Mei, D. De novo design of single white-emitting polymers based on one chromophore with multi-excited states / Mei, D., Yan, L., Liu, X., Zhao, L., Wang, S. Tian, H. et.al. // Chemical Engineering Journal. – 2022. – Vol. 446. – P. 137004.

48. Guo, F. Efficient polyfluorene derivatives for blue light-emitting diodes enabled by tuning conjugation length of bulky chromophores / F. Guo, M. Zhang, S. Zhao, L. Hu, B. Xiao, L. Ying, et al. // *Dyes and Pigments*. – 2022. – Vol. 199. – P. 110059.
49. Kim, J. Simultaneous Enhancement of Electron Injection and Air Stability in N-Type Organic Field-Effect Transistors by Water-Soluble Polyfluorene Interlayers / J. Kim, D. Khim, R. Kang, S. H. Lee, et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2014. – Vol. 6, № 11. – P. 8108–8114.
50. Liu, H. Polyfluorene Electrolytes Interfacial Layer for Efficient Polymer Solar Cells: Controllably Interfacial Dipoles by Regulation of Polar Groups / H. Liu, L. Hu, F. Wu, L. Chen, et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2016. – Vol. 8, № 15. – P. 9821–9828.
51. Joshi, V. Mini-Review on Conjugated Polymer-Based Fluorescence Probes for Bilirubin Detection. / V. Joshi, T. Senthilkumar // *Biomedical*. – 2022 – Vol. 44, № 1. – P. 5.
52. Liu, J. Conjugated Polymer Synthesis // *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials* / J. Liu, J.-B. Baek, L. Dai // ed. Kobayashi S., Müllen K. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, – 2014. – P. 1–7.
53. Hohenberg, P., Inhomogeneous Electron Gas / P. Hohenberg, W. Kohn // *Phys. Rev.* – 1964. – Vol. 136, № 3B. – P. B864–B871.
54. Kohn, W. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects / W. Kohn, L.J. Sham // *Phys. Rev.* American Physical Society, – 1965. – Vol. 140, № 4A. – P. A1133–A1138.
55. Koskinen, P. Density-functional tight-binding for beginners / P. Koskinen, V. Mäkinen // *Computational Materials Science*. – 2009. – Vol. 47, № 1. – P. 237–253.
56. Elstner M. The SCC-DFTB method and its application to biological systems / M. Elstner // *Theoretical Chemistry Accounts* – 2006. – Vol. 116, № 1–3. – P. 316–325.

57. Gaus M., Cui Q., Elstner M. DFTB3: Extension of the Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding Method (SCC-DFTB) / M. Gaus, Q. Cui, // Journal of chemical theory and computation – 2011. – Vol. 7, № 4. – P. 931–948.
58. Goyal, P. Molecular Simulation of Water and Hydration Effects in Different Environments: Challenges and Developments for DFTB Based Models / P. Goyal, H. J. Qian, S. Irle, X. Lu, D. Roston, et al. // J. Phys. Chem. B. –2014. – Vol. 118, № 38. – P. 11007–11027.
59. Goyal P., Elstner M., Cui Q. Application of the SCC-DFTB Method to Neutral and Protonated Water Clusters and Bulk Water / P. Goyal, M. Elstner, Q. Cui // The Journal of Physical Chemistry B. – 2011. – Vol. 115, № 20. –P. 6790–6805.
60. Gaus M., Goez A., Elstner M. Parametrization and Benchmark of DFTB3 for Organic Molecules / M. Gaus, A. Goez, M. Elstner // J. Chem. Theory Comput. – 2013. – Vol. 9, № 1. – P. 338–354.
61. Gaus M. Parameterization of DFTB3/3OB for sulfur and phosphorus for chemical and biological applications / M. Gaus, X. Lu, M. Elstner, Q. Cui // Journal of Chemical Theory and Computation. American Chemical Society, – 2014. – Vol. 10, № 4. – P. 1518–1537.
62. Parr R.G., Pearson R.G. Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity / R.G. Parr, R.G. Pearson // J. Am. Chem. Soc. – 1983. – Vol. 105, № 26. – P. 7512–7516.
63. Elstner, M. SCC-DFTB: What Is the Proper Degree of Self-Consistency? / M. Elstner // J. Phys. Chem. A. – 2007. – Vol. 111, № 26. – P. 5614–5621.
64. Elstner, M. Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties / M. Elstner, D. Porezag, G. Jungnickel, J. Elsner, M. Haugk, et al.// Phys. Rev. B. American Physical Society, 1998. Vol. 58, № 11. P. 7260–7268.
65. Runge E., Gross E.K.U. Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems / E. Runge, E.K.U. Gross // Phys. Rev. Lett. – 1984. – Vol. 52, № 12. – P. 997–1000.

66. Jacquemin, D. Extensive TD-DFT benchmark: Singlet-excited states of organic molecules /, V. Wathelet, E. A. Perpète, C. Adamo, // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2009. – Vol. 5, № 9. – P. 2420–2435.
67. Becke A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange // *The Journal of Chemical Physics*. 1993. Vol. 98, № 7. P. 5648–5652.
68. Fedorov D.G., Kitaura K. Theoretical development of the fragment molecular orbital (FMO) method / D.G. Fedorov, K. Kitaura // *Modern Methods for Theoretical Physical Chemistry of Biopolymers*. Elsevier B.V., – 2006. – P.3–38.
69. Fletcher, G.D. Large-scale MP2 calculations on the blue gene architecture using the fragment molecular orbital method / G. D. Fletcher, D. G. Fedorov, S. R. Pruitt, T. L. Windus, M. S. Gordon // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2012. – Vol. 8, № 1. – P. 75–79.
70. Fedorov, D.G. The fragment molecular orbital method: theoretical development, implementation in GAMESS, and applications / D.G. Fedorov // *WIREs Comput Mol Sci*. – 2017. – Vol. 7, № 6.
71. Fedorov, D.G. The importance of three-body terms in the fragment molecular orbital method / D.G. Fedorov, K. Kitaura // *Journal of Chemical Physics*. – 2004. – Vol. 120, № 15. – P. 6832–6840.
72. Wang W. Recent advances in atomic molecular dynamics simulation of intrinsically disordered proteins / W. Wang // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2021. – Vol. 23, № 2. – P. 777–784.
73. Nosrati, M. Three-dimensional modeling of streptomycin binding single-stranded DNA for aptamer-based biosensors, a molecular dynamics simulation approach / M. Nosrati, M. Roushani // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2022. – P. 1–10.
74. Paul, R. Translocation of Endo-Functionalized Molecular Tubes across Different Lipid Bilayers: Atomistic Molecular Dynamics Simulation Study / R. Paul, S. Paul // *Langmuir*. – 2021. – Vol. 37, № 34. – P. 10376–10387.

75. Anant P. A Simple Route toward the Synthesis of Bisbenzothiadiazole Derivatives / P. Anant, N.T. Lucas, J. Jacob // *Organic letters* 2008. Vol. 10, № 24. P. 5533–5536.
76. Wu, F.-I. Efficient White-Electrophosphorescent Devices Based on a Single Polyfluorene Copolymer / F. I. Wu, X. H. Yang, D. Neher, R. Dodda, Y. H. Tseng, et al. // *Adv. Funct. Mater.* – 2007. – Vol. 17, № 7. – P. 1085–1092.
77. Russo Krauss, I. Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding / I. Russo Krauss, V. Spiridonova, A. Pica, V. Napolitano, F. Sica, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44, № 2. – P. 983–991.
78. Bussi, G. Canonical sampling through velocity rescaling / G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello // *Journal of Chemical Physics. American Institute of PhysicsAIP*, – 2007. – Vol. 126, № 1. – P. 014101.
79. Parrinello, M. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method / M. Parrinello, A. Rahman // *Journal of Applied Physics. American Institute of PhysicsAIP*, – 1981. – Vol. 52, № 12. – P. 7182–7190.
80. Hanwell, M.D. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform / M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G. R. Hutchison // *Journal of Cheminformatics.* – 2012. – Vol. 4, № 1. – P. 17.
81. Ivani, I. Parmbsc1: A refined force field for DNA simulations / I. Ivani, P. D. Dans, A. Noy, A. Pérez, et al. // *Nature Methods. Nature Publishing Group*, – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 55–58.
82. Jorgensen, W.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water / W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, et al. // *The Journal of Chemical Physics. American Institute of PhysicsAIP*, – 1983. – Vol. 79, № 2. – P. 926–935.
83. Abraham, M.J. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, et al. // *SoftwareX. Elsevier B.V.*, – 2015. – Vol. 1–2. – P. 19–25.

84. Nishimoto, Y. The fragment molecular orbital method combined with density-functional tight-binding and the polarizable continuum model / Y. Nishimoto, D.G. Fedorov // *Physical Chemistry Chemical Physics*. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 18, № 32. P. 22047–22061.

85. Barca, G.M.J. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system / G. M. Barca, C. Bertoni, L. Carrington, et al. // *The Journal of Chemical Physics*. – 2020. – Vol. 152, № 15. – P. 154102.

86. Suenaga M. Facio: New Computational Chemistry Environment for PC GAMESS // *Journal of Computer Chemistry, Japan*. Society of Computer Chemistry Japan, 2005. Vol. 4, № 1. P. 25–32.

87. Svergun, D. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates / D. Svergun, C. Barberato, M.H. Koch // *Journal of Applied Crystallography*. International Union of Crystallography, 1995. Vol. 28, № 6. P. 768–773.

88. Torre, L.A. Lung Cancer Statistics/ L.A. Torre, R.L. Siegel, A. Jemal // *Lung Cancer and Personalized Medicine* / ed. Ahmad A., Gadgeel S. Cham: Springer International Publishing, – 2016. – Vol. 893. – P. 1–19.

89. Maier, J.A. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB / J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, et al. // *Journal of Chemical Theory and Computation*. American Chemical Society, 2015. Vol. 11, № 8. P. 3696–3713.

90. Fedorov D.G. The fragment molecular orbital method: theoretical development, implementation in GAMESS, and applications / D.G. Fedorov // *WIREs: Comput. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 7. – P. e1322.

91. Nishimoto, Y. Density-functional tight-binding combined with the fragment molecular orbital method / Y. Nishimoto, D.G. Fedorov, S. Irle // *Journal of Chemical Theory and Computation*. American Chemical Society, – 2014. – Vol. 10, № 11. – P. 4801–4812.

92. Ostrom Q.T. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013 / Q. T. Ostrom,

H. Gittleman, J. Xu, et al. // *Neuro-Oncology*. – 2016. – Vol. 18, № suppl_5. – P. v1–v75.

93. Kichkailo, A.S. Development of DNA aptamers for visualization of glial brain tumors and detection of circulating tumor cells / A. S. Kichkailo, A. A. Narodov, M. A. Komarova, et al. // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. – 2023. – Vol. 32. – P. 267–288.

94. del Villar-Guerra, R. G-quadruplex secondary structure obtained from circular dichroism spectroscopy / R. del Villar-Guerra, J. O. Trent, J. B. Chaires // *Angewandte Chemie*. – 2018. – T. 130. – №. 24. – C. 7289-7293.

95. Hess, B. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations / B. Hess, H. Bekker, H. J. Berendsen et al. // *Journal of Computational Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, – 1997. – Vol. 18, № 12. – P. 1463–1472.