

# ОТЧЕТ О ПРОДЕЛАННОЙ РАБОТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБОРУДОВАНИЯ ИВЦ НГУ

## 1. Аннотация

Разработка агентов, способных направленно, специфично, селективно и эффективно воздействовать на целевые нуклеиновые кислоты (НК) является актуальной задачей для разработки терапевтических агентов, в том числе и для нужд персонализированной медицины. Проведено исследование взаимодействия пептида находящегося в составе конъюгата ДНК с целевой РНК при формировании ДНК/РНК комплекса. Собраны молекулярные модели РНК с олигодезокрибонуклеотид-пептидным конъюгатов и проведено моделирование методом молекулярной динамики. Показано сильное взаимодействие положительно заряженного пептида с отрицательно заряженным рибозофосфатным остовом НК, а так же формирование сети водородных связей НК-пептид. Это не позволяет эффективно покрыть конформационное пространство. Для решения данной проблемы был использован метод отжига (simulation annealing). С использованием этого подхода для ряда конъюгатов показана возможность и предложены вероятные молекулярные механизмы расщепления РНК. Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментально полученными данными об эффективности расщепления РНК и показывают его возможный молекулярный механизм.

## 2. Тема работы

Моделирование комплексов нуклеиновых кислот и их производных методами молекулярной динамики и квантовой химии.

## 3. Состав команды

1. Ломзов Александр Анатольевич, к.ф.-м.н., с.н.с., ИХБФМ СО РАН, руководитель, исполнитель
2. Burusco Kera. K., Ph.D., School of Medical Sciences, University of Manchester

## 4. Информация о гранте

Грант: РФФИ № 14-44-00068, «Новое поколение РНК-направленных агентов на основе производных олигонуклеотидов – платформа для создания инновационных терапевтических препаратов.»

## 5. Научное содержание работы

### 1. Постановка задачи

Созданные химическим путем искусственные (или химические) рибонуклеазы предлагают уникальные возможности для каталитического разрушения РНК, относящейся к заболеванию, без задействования сложных многокомпонентных механизмов (например, RISC, РНКазы H), которые обычно действуют с

использованием направляющей РНК или ДНК. Недавно были разработаны конъюгаты пептидил-олигонуклеотид (РОС) как новый класс безметаллических химических рибонуклеаз, который состоит из антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на определенную последовательность РНК, и катализатора расщепления РНК (например, амфифильный пептид). Такие биоконъюгаты способны индуцировать фосфодиэфирную трансэтерификацию РНК-мишени. Необходимо разработать полностью независимые, самодостаточные РНК-специфические конъюгаты, сочетающих в себе также специфичность к комплементарной последовательности. Целью данного исследования является анализ взаимодействия конъюгатов пептидил-олигонуклеотид с РНК используя методы молекулярного моделирования.

## ***2. Современное состояние проблемы***

Предложенные ранее биоконъюгаты (РОС) способны вызывать фосфодиэфирную переэтерификацию РНК-мишени без потребности в ферментах, дополнительных кофакторов (например, ионах металлов). Недавно было продемонстрировано избирательное подавление высокоонкогенную микроРНК (miR-21) путем необратимого расщепления и тем самым вызывать апоптоз в опухолевых клетках, подавлять их инвазивные свойства и подавлять пролиферацию опухолей *in vitro*. Однократная обработка опухолевых клеток такими каталитическими конъюгатами устраняла их злокачественное поведение и сохраняла способность замедлять последующий рост опухоли *in vivo* после их трансплантации мышам. Вместе с тем, данным РОС присущи ряд недостатков, которые необходимо невелировать. К ним относятся необходимость функционирования РОС в каталитическом режиме, обеспечение высокого уровня точности распознавания РНК, а так же увеличение скорости и эффективносности специфичного расщепления РНК. Был предложен новый тип конъюгатов, которые по предварительным данным удовлетворяют большинству данных требований. В месте с тем анализ молекулярных механизмов работы таких конъюгатов до сих про проведен не был. Такми образом, необходимо было провести анализ структуры и динамики комплекса РОС/РНК используя методы молекулярной динамики.

## ***3. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы***

Для проведения молекулярного моделирования методом молекулярной динамики необходимо было подготовить файлы библиотек с фрагментами молекул РОС, содержащими нестандартные остатки. Для этого на первом этапе проведены расчеты методом квантовой химии с использованием программного пакета gaussian09. Была минимизована структура и рассчитано распределение электронной плотности. Используя эти данные рассчитаны частичные заряды атомов (алгоритм RESP, программа antechamber из пакета программ AMBER16) и подготовлены МД библиотеки (пакет программ AMBER16). На следующем этапе работы осуществлена сборка молекулярной модели РОС/РНК в программе xleap (из пакета программ AMBER16). Созданные молекулярные модели были исследованы

методами молекулярной динамики в явной водной оболочке используя методику описанную ранее в [Lomzov et al., JPCB, 2016]. Было установлено, что методы классической молекулярной динамики не позволяют достаточно эффективно покрыть конформационное пространство (см. ниже) и необходимо использовать дополнительные алгоритмы. Для этого был использован алгоритм отжига (simulation annealing) предполагающий следующие стадии (i) нагрев за 0.5 нс от 300 К до 800 К, (ii) равновесное моделирование в течение 5.0 нс при 800К, (iii) охлаждение за 0.5 нс 800 К до 300 К и (iv) равновесное моделирование 5 нс при 300 К. При моделировании накладывали дополнительные ограничения (в виде мягкого гармонического потенциала  $0.01 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-1}$ ) на длину водородных связей в участках двойной спирали. Такой отжиг повторялся 100 раз для каждой молекулярной системы. Моделирование проводили с использованием программы `pmemd.cuda` из пакета программ AMBER16. Последние равновесные 5 нс каждой МД траектории использовали для анализа. Структуры визуализировали с помощью UCSF Chimera и анализировали методами кластерного анализа используя программы UCSF Chimera и `cpptraj`. Для проведения квантово-химических расчетов были использованы алгоритмы, позволяющие проводить расчеты с использованием центральных процессоров, а решение молекулярно-динамических задач осуществляется наиболее успешно с использованием графических процессоров.

#### ***4. Полученные результаты***

Показано, что после нескольких наносекунд при равновесном МД-моделировании реализуется сильное взаимодействие положительно заряженного пептида с отрицательно заряженным рибозофосфатным остовом НК, а так же формирование сети водородных связей НК-пептид. Это не позволяет эффективно покрыть конформационное пространство для последующего структурного анализа за время моделирования достаточное для расчетов (микросекундный диапазон). Для решения данной проблемы был использован метод отжига (simulation annealing). С использованием данного подхода, для ряда конъюгатов показана возможность получения набора разнообразных конформаций РОС/РНК (рис. 1). Проведенный анализ показал, возможность рекликации «in-line» конформации в участках РНК, которая необходима для расщепления (рис. 2). Показана возможность сближения гуанидиниевых и аминогрупп пептида (в соответствии с классическими представлениями являются участниками акта расщепления фосфодиэфирной связи) с РНК в «in-line» конформации (рис. 3). Таким образом, с использованием методов компьютерного моделирования и анализа показаны вероятные молекулярные механизмы расщепления РНК.

#### ***5. Иллюстрации, визуализация результатов.***

На иллюстрациях приведены исследованные модельные системы и полученные при анализе молекулярно-динамических траекторий результаты.

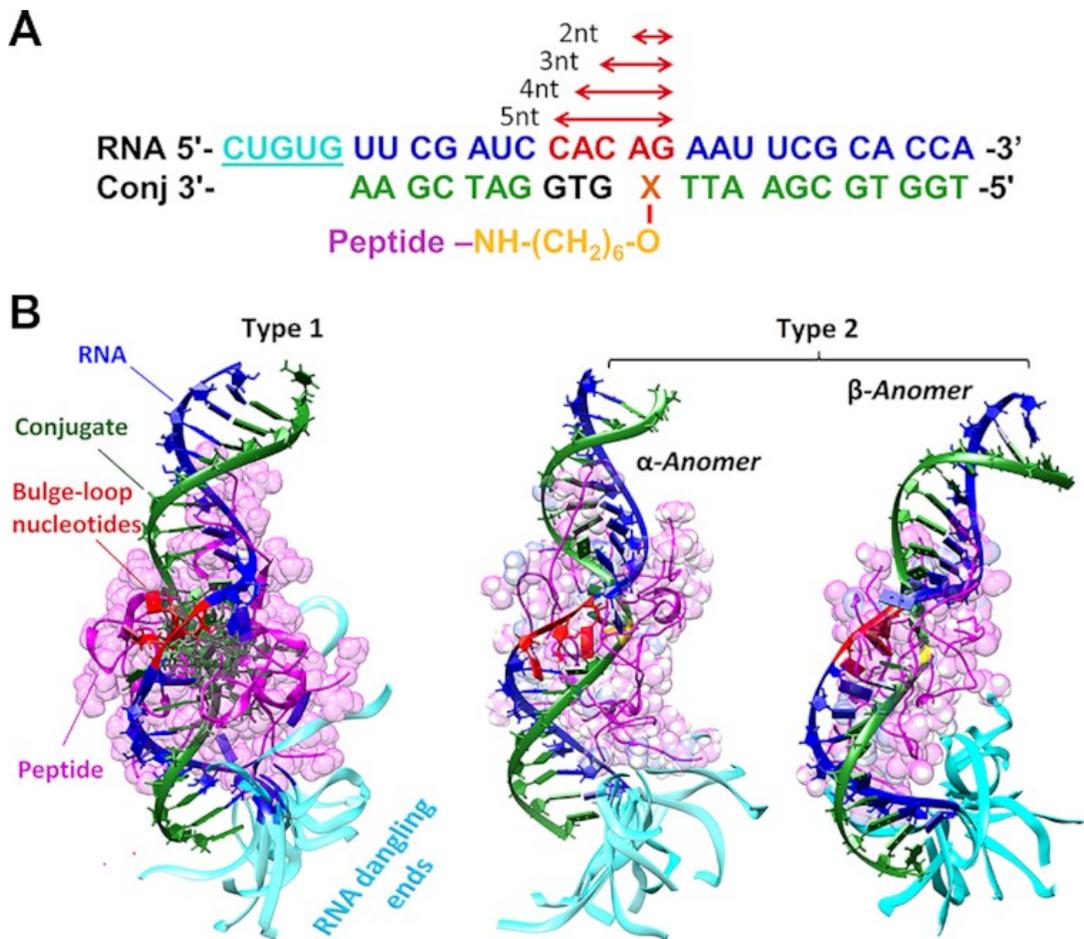


Рисунок 1. Модельные системы, использованные при моделировании (А) и пример результатов анализа МД траекторий — наиболее представленные в траекториях структуры, полученные методом кластерного анализа наложены друг на друга (В).

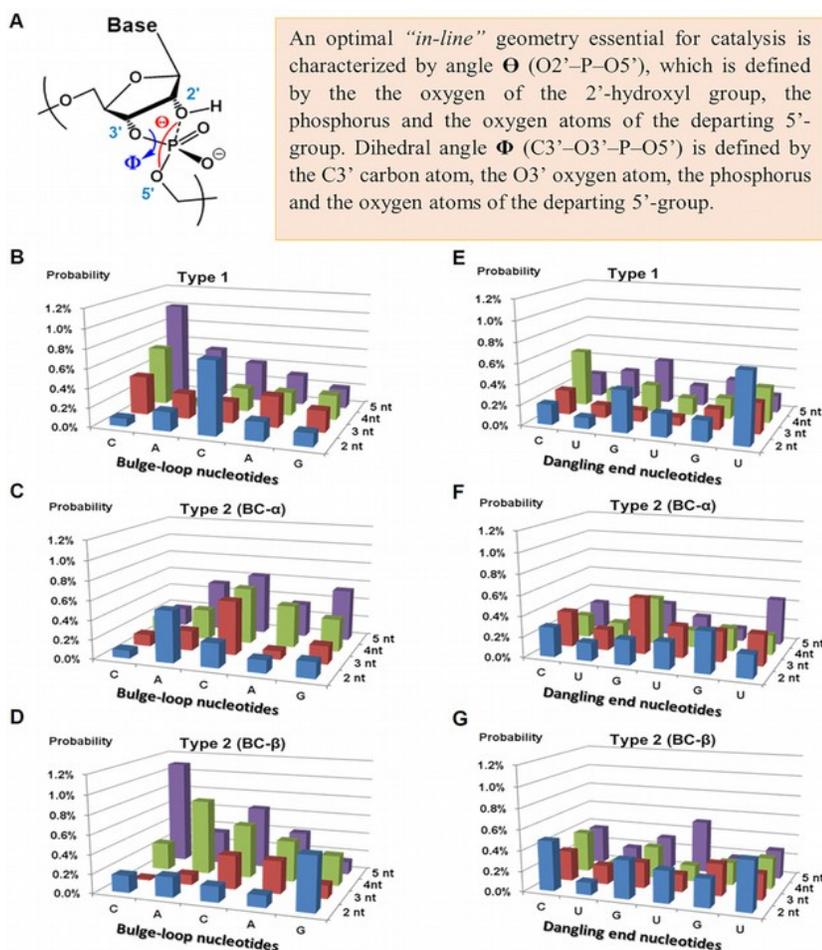


Рисунок 2. (А) Иллюстрация наиболее оптимальной для расщепления РНК геометрии - «in-line» конформации. (В-Г) Вероятность реализации «in-line» конформации для всех исследованных конъюгатов в области выпетливания и в области одноцепочечного нависания.

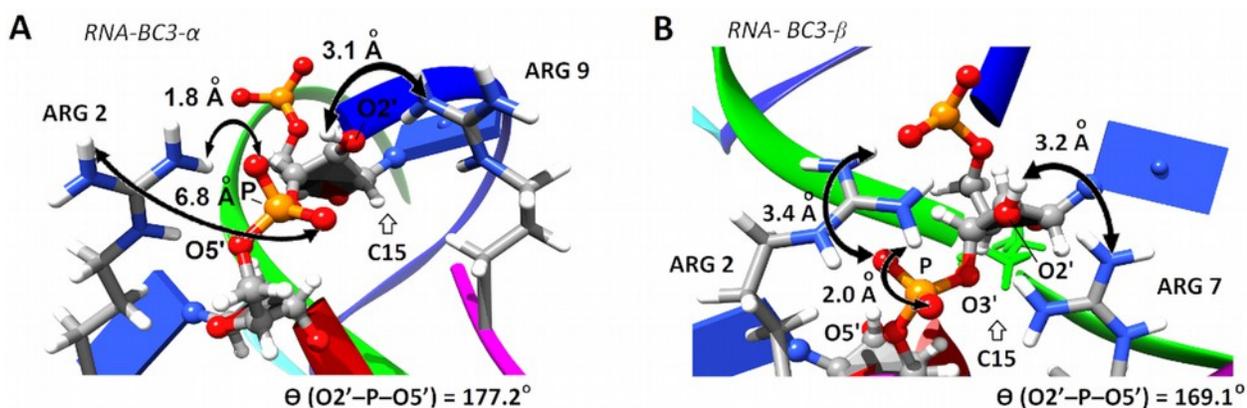


Рисунок 3. Увеличинная область взаимодействия пептида с РНК в «in-line» конформации для двух типов конъюгатов.

### **6.Эффект от использования кластера**

Ряд задач работы были решены с использованием персональных компьютеров (создание МД библиотек и анализ полученных результатов). Наиболее трудоемкие задачи проведения квантово-химических и молекулярно-динамических расчетов были решены с использованием суперкомпьютера. Их можно было бы решить и на обычных компьютерах, однако при этом время проведения расчетов значительно выросло. Наличие суперкомпьютера в режиме постоянной доступности принципиально упростило и ускорило решение поставленных задач за счет возможности их распараллеливания (на центральных и графических процессорах) внутри отдельных задач, а так же одновременного запуска нескольких задач.

### **7.Перечень публикаций, содержащих результаты работы**

Staroseletz, Y., Amirloo, B., Williams, A., Lomzov, A., Burusco, K. K., Clarke, D. J., ... & Bichenkova, E. V. (2020). Strict conformational demands of RNA cleavage in bulge-loops created by peptidyl-oligonucleotide conjugates. *Nucleic Acids Research*, 48(19), 10662-10679.

DOI: 10.1093/nar/gkaa780

Q1, IF = 11.501

<https://academic.oup.com/nar/article/48/19/10662/5917654>