

doi 10.18699/vjgb-25-112

Структурные основы влияния фосфорамидной *N*-бензимидазольной группы на эффективность удлинения модифицированного праймера Taq ДНК-полимеразой

А.А. Бердюгин ^{1, 2}, В.М. Голышев ^{1, 2}, А.А. Ломзов ^{1, 2} 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 lomzov@1bio.ru

Аннотация. Недавно нами был предложен новый класс производных нуклеиновых кислот – фосфорамидные бензоазольные олигонуклеотиды. В них один из немостиковых атомов кислорода замещен на фосфорамидную *N*-бензоазольную группу: бензимидазольную, диметилбензимидазольную, бензоксазольную или бензотиазольную. Изучение свойств таких производных показало, что их применение в ПЦР увеличивает специфичность и селективность анализа. Данное исследование посвящено изучению влияния фосфорамидной *N*-бензимидазольной модификации ДНК-праймеров на эффективность их удлинения Taq ДНК-полимеразой при помощи метода молекулярной динамики. Мы рассматривали совершенные комплексы нуклеиновых кислот с модификациями в положениях с первого по шестое считая от 3'-конца праймера. Ранее было показано, что степень подавления элонгации зависит от положения модификации: чем ближе к 3'-концу, тем сильнее ингибирование, а максимальное подавление наблюдается при модификации в первом положении, особенно в несовершенных комплексах. Кроме того, в экспериментах наблюдались продукты неполного удлинения праймеров с модификацией в четвертом положении. Проведенные компьютерное моделирование и анализ позволили выявить молекулярные механизмы взаимодействия модифицированных праймеров с ферментом, включая стерические препятствия для продвижения полимеразы по модифицированной цепи и локальные нарушения структуры ДНК, которые объясняют наблюдаемые экспериментально закономерности. Установлено, что как различные стереоизомеры фосфорамидных групп, так и конформеры фосфорамидной *N*-бензимидазольной группы по-разному влияют на структуру фермент-субстратного комплекса и эффективность взаимодействия Taq ДНК-полимеразы с модифицированным ДНК комплексом. Модификация первого и второго межнуклеозидного фосфатного остатка с 3'-конца праймера в наибольшей степени возмущает структуру белково-нуклеинового комплекса, а при расположении модификации в четвертом фосфатном остатке *N*-бензимидазольная модификация располагается в кармане фермента. Полученные результаты открывают перспективы для рационального конструирования специфичных, обладающих заранее заданными свойствами ДНК праймеров с модифицированными *N*-бензимидазольными олигонуклеотидными звеньями для использования в ПЦР диагностики.

Ключевые слова: *N*-бензимидазольные олигонуклеотиды; ФАО; молекулярная динамика; структура; Taq ДНК-полимераза; молекулярная диагностика

Для цитирования: Бердюгин А.А., Голышев В.М., Ломзов А.А. Структурные основы влияния фосфорамидной *N*-бензимидазольной группы на эффективность удлинения модифицированного праймера Taq ДНК-полимеразой. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(7):1073-1083. doi 10.18699/vjgb-25-112

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-01116, <https://rscf.ru/project/23-74-01116/>) в части построения и первичного анализа модельных систем и проекта государственного задания ИХБФМ СО РАН № 123021600208-7 в части проведения молекулярно-динамического моделирования и анализа полученных данных.

Structural basis of the phosphoramidate *N*-benzimidazole group's influence on modified primer extension efficiency by Taq DNA polymerase

А.А. Berdugin ^{1, 2}, V.M. Golyshev ^{1, 2}, A.A. Lomzov ^{1, 2} 

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 lomzov@1bio.ru

Abstract. We recently proposed a novel class of nucleic acid derivatives – phosphoramidate benzoazole oligonucleotides (PABAOs). In these compounds, one of the non-bridging oxygen atoms is replaced by a phosphoramidate *N*-benzoazole group, such as benzimidazole, dimethylbenzimidazole, benzoxazole, or benzothiazole. Studies of the properties of these derivatives have shown that their use in PCR enhances the specificity and selectivity of the analysis. The

study investigates the effect of phosphoramidate *N*-benzimidazole modification of DNA primers on their elongation by Taq DNA polymerase using molecular dynamics simulations. We examined perfectly matched primer-template complexes with modifications at positions one through six from the 3'-end of the primer. Prior experimental work demonstrated that the degree of elongation suppression depends on the modification position: the closer to the 3'-end, the stronger the inhibition, with maximal suppression observed for the first position, especially in mismatched complexes. Furthermore, incomplete elongation products were experimentally observed for primers modified at the fourth position. Our molecular dynamics simulations and subsequent analysis revealed the molecular mechanisms underlying the interaction of modified primers with the enzyme. These include steric hindrance that impedes polymerase progression along the modified strand and local distortions in the DNA structure, which explain the experimentally observed trends. We established that both different stereoisomers of the phosphoramidate groups and conformers of the phosphoramidate *N*-benzimidazole moiety differentially affect the structure of the enzyme-substrate complex and the efficiency of Taq DNA polymerase interaction with the modified DNA complex. Modification of the first and second internucleoside phosphate from the 3'-end of the primer causes the most significant perturbation to the structure of the protein-nucleic acid complex. When the modification is located at the fourth phosphate group, the *N*-benzimidazole moiety occupies a specific pocket of the enzyme. These findings provide a foundation for the rational design of specific DNA primers bearing modified *N*-benzimidazole moieties with tailored properties for use in PCR diagnostics.

Key words: *N*-benzimidazole oligonucleotides; PABAO; molecular dynamics; structure; Taq DNA polymerase; molecular diagnostics

For citation: Berdugin A.A., Golyshev V.M., Lomzov A.A. Structural basis of the phosphoramidate *N*-benzimidazole group's influence on modified primer extension efficiency by Taq DNA polymerase. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(7):1073-1083. doi 10.18699/vjgb-25-112

Введение

ДНК-зависимая ДНК-полимераза I бактерии *Thermus aquaticus* (ДНК-полимераза Taq) является широко распространенным ферментом, используемым для амплификации нуклеиновых кислот методом ПЦР в разных приложениях. Она обладает ДНК-полимеразной и 5'→3' экзонуклеазной активностями, но не обладает корректирующей 3'→5' экзонуклеазной активностью (Terpe, 2013). Данный фермент широко применяют для выявления нуклеиновых кислот и однонуклеотидных замен (точечных мутаций) в них при диагностике различных заболеваний с помощью разных методов ПЦР анализа, например ПЦР в реальном времени, аллель-специфичной ПЦР, цифровой ПЦР (Kalender et al., 2022; Starza et al., 2022). Метод аллель-специфичной ПЦР основан на ингибировании реакции удлинения праймеров, которые образуют с матричной цепью дуплексы с одним или несколькими мисматчами в области 3'-конца короткой цепи (Rejali et al., 2018). Часто наличие одиночной замены, нарушающей его полную комплементарность с ДНК, не обеспечивает достаточной специфичности выявления полиморфизмов. Для ее повышения в ДНК вводят дополнительные однонуклеотидные несоответствия и/или дополнительные модификации в структуру праймера. Последние вводят как в основание, так и в рибозофосфатный остов и располагают вблизи 3'-конца (Kutyavin, 2011; Ishige et al., 2018; Chubarov et al., 2023). В частности, замещение немостикового атома кислорода в фосфодиэфирном остове влияет на термодинамическую стабильность дуплекса праймер/матрица, а также на координацию концевой 3'-ОН группы в активном центре фермента. Например, введение фосфотиоатной модификации в последний или предпоследний межунолеозидный фосфат с 3'-конца праймера незначительно снижает эффективность элонгации (5–15 %), но в то же время увеличивает специфичность амплификации (Di Giusto, King, 2003). Введение фосфорилгуанидиновой модификации в структуру праймеров также приводит к изменению эффективности и селективности выявления целевых последовательностей НК (Chubarov et al., 2020).

Недавно в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН был разработан новый класс производных нуклеиновых кислот – фосфорамидные бензоазольные олигонуклеотиды (ФАО), в которых немостиковый атом кислорода фосфатного остатка замещен на *N*-бензоазольную группу (бензимидазольную, бензоксазольную или бензотиазольную) (рис. 1). ФАО можно получать автоматическим твердофазным фосфитамидным методом синтеза (Vasilyeva et al., 2023).

В настоящее время ведется исследование физико-химических свойств ряда *N*-бензоазольных производных (Golyshev et al., 2024; Yushin et al., 2024; Novgorodtseva et al., 2025) и показана возможность их применения в качестве праймеров в ПЦР, в том числе в аллель-специфичной ПЦР (Chubarov et al., 2024). Нами изучена эффективность удлинения тринадцатизвенных праймеров, со-

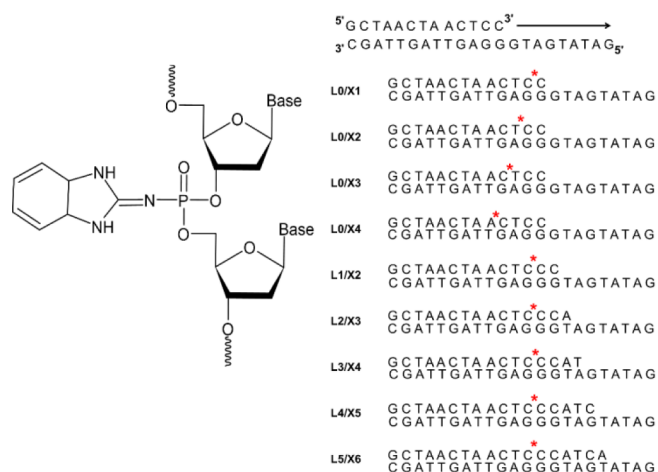


Рис. 1. Структура динуклеотидного шага ФАО, содержащего *N*-бензимидазольную группу, и модельные системы, использованные в исследовании.

Положение фосфорамидной *N*-бензимидазольной группы обозначено красной звездочкой.

держащих *N*-бензимидазольную модификацию, по двадцатидвухзвенной ДНК матрице с использованием Таq ДНК-полимеразы (Golyshev et al., 2025). Введение модификации в первый или второй межнуклеозидный фосфат с 3'-конца праймера для совершенных комплексов позволяет им удлиняться до полноразмерного продукта с эффективностью ~50 % и значительно сокращает выход полноразмерного продукта для комплексов с одонуклеотидными несоответствиями в предконцевой паре от 3'-конца короткой цепи. Введение модификации в третье положение типично снижает выход полноразмерного комплекса в наименьшей степени. Кроме того, для всех совершенных комплексов с модификациями отчетливо наблюдался продукт промежуточного удлинения, соответствующий частично удлиненному праймеру, содержащему модификацию в 4-й позиции от 3'-конца праймера.

В данной работе для объяснения закономерностей, наблюдаемых в экспериментах по удлинению ФАО праймеров Таq ДНК-полимеразой, проведено детальное изучение влияния фосфорамидной *N*-бензимидазольной группы в различных положениях праймерной цепи на структуру и динамику фермент-субстратного комплекса с использованием методов молекулярной динамики (МД) и анализа. Для этого мы сконструировали молекулярные модели и провели МД моделирование нативного и набора модифицированных НК субстратов, содержащих одиночные модификации с 1-го по 6-е положение межнуклеозидных фосфатных остатков с 3'-конца праймера, а также их комплексов с Таq ДНК-полимеразой. Полученные данные коррелируют с экспериментальными результатами и объясняют наблюдающиеся *in vitro* эффекты.

Методы

Построение моделей. Структуру комплекса Таq полимеразы с ДНК строили на основании экспериментально полученной структуры белка с идентификатором PDB ID: 1QTM следующим образом. Структуру белка с нуклеозидтрифосфатом и ионами магния брали из этой модели. Структуру ДНК комплекса матрицы с праймером получали путем построения белково-нуклеинового комплекса с применением программы AlphaFold3 (Abramson et al., 2024). В качестве входных данных для расчетов подавали аминокислотную последовательность ДНК-полимеразы I бактерии *Thermus aquaticus* (UniProt ID: P19821), а также нуклеотидные последовательности ДНК матрицы и неудлиненных или удлиненных праймеров, трифосфат и два иона магния. Рассчитанную структуру выравнивали по аминокислотным остаткам и по Ca атомам со структурой 1QTM. Далее в модели 1QTM заменяли нуклеиновые кислоты на построенные с помощью AlphaFold3. Для каждой построенной модели нуклеозидтрифосфат заменяли на комплементарный нуклеотид в матричной цепи.

Поскольку *N*-бензимидазольная модификация в большинстве случаев требовала дополнительного пространства для геометрического размещения внутри комплекса ДНК/Таq полимеразы, использовали библиотеки ротамеров аминокислотных остатков (Shapovalov, Dunbrack, 2011) в программе UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) для снижения пересечения ван-дер-ваальсовых радиусов атомов белка и модификации.

Заряды аминокислотных остатков белка для каждого из комплексов рассчитывали с помощью программы pdb2pqr версии 3.7.1 (Unni et al., 2011). Значение pH устанавливали равным 8.3, для того чтобы условия моделирования соответствовали условиям удлинения праймера (Golyshev et al., 2025). В результате некоторые комплексы имели различающиеся протонированные и депротонированные остатки. Семь из 36 комплексов демонстрировали различия в состоянии протонирования следующих остатков. В комплексах L0/X2/R1, L0/X2/R2, L0/X3/R1, L0/X3/R2 и L1/X2/R2 (обозначения см. ниже) четыре аминокислотных остатка – LYS540, ASP610, LYS663 и ASP785 – находились в протонированной форме. В комплексах L0/X4/R1 и L0/X4/R2 остатки LYS663, LYS762 и GLU786 также были протонированы.

Комплекс праймер/матрица получали из структуры белково-нуклеинового комплекса путем удаления всех остатков, кроме принадлежащих ДНК.

Молекулярно-динамическое моделирование. Исследование структуры комплексов нативных и модифицированных ДНК с Таq ДНК-полимеразой проводили методами молекулярно-динамического (МД) моделирования и анализа, используя программный пакет AMBER20 (Case et al., 2020) с параллельными вычислениями на центральных процессорах (CPU) и графических ускорителях (GPU) с архитектурой CUDA. Все МД расчеты выполняли с использованием силового поля ff19SB (Tian et al., 2020) для Таq полимеразы, OL21 (Zgarbová et al., 2021) для ДНК, параметрами gaff2 для модифицированных *N*-бензимидазолом остатков фосфорной кислоты, для ионов магния и натрия – описанные в работе (Li Z. et al., 2020). Данные силовые поля считаются наиболее современными и рекомендованы разработчиками программного пакета AMBER для проведения достоверного моделирования. Из работы (Meagher et al., 2003) брали параметры для нуклеозидтрифосфатов, которые являются единственными опубликованными для семейства силовых полей AMBER.

Протокол МД-моделирования. Начальные модели релаксировали в неявном растворителе (saltcon = 0.10, igb = 1, T = 1 K) методом сопряженных градиентов в течение 2500 шагов. Далее помещали в водную оболочку (модель воды OPC (Izadi et al., 2014), усеченная октаэдрическая ячейка, расстояние от молекулы до грани ячейки 14 Å) с добавлением ионов Na⁺ для нейтрализации заряда периодической ячейки. После этого проводили минимизацию системы с ограничениями на положение атомов белка (позиционные ограничения с потенциалом 1.0 ккал/(моль·Å)) в течение 10000 шагов, из которых первые 200 шагов выполняли методом наискорейшего спуска. Затем комплексы нагревали от 0 до 300 K в течение 2 нс и стабилизировали давление с помощью баростата Монте-Карло в течение 1 нс. Для контроля температуры использовали динамику Ланжевена (ntt = 3, gamma_ln = 1.0). Шаг интегрирования уравнений движения выбирали равным 2 фс. На следующем этапе сольватированные комплексы минимизировали без наложения ограничений в течение 10000 шагов (200 шагов – метод наискорейшего спуска). И на финальном этапе проводили МД моделирование в течение 100 нс с параметрами, аналогичными этапу на-

гревания, но без наложения позиционных ограничений на атомы модельной системы.

Результаты МД моделирования анализировали в программе *srptraj* из пакета AMBER20 (Roe, Cheatham, 2013). Наиболее представленные 10 структур в каждой траектории находили методом иерархического кластерного анализа.

Рисунки структур готовили с помощью программы UCSF Chimera версии 1.15 (Pettersen et al., 2004).

Результаты

Выбор и построение молекулярных моделей

Изучение структуры и динамики комплексов ФАО с Taq ДНК-полимеразой проводили с использованием набора модельных комплексов. За основу был взят ДНК комплекс праймера 5'-GCTAACTAATCC-3' с матрицей 5'-GATATGATGGGAGTTAGTAGC-3', удлинение праймера в котором было изучено нами экспериментально ранее (Golyshev et al., 2025). Было показано, что введение бензоазольных модификаций в различные положения праймера влияет на эффективность и специфичность его удлинения. В рамках данной работы выполнено МД моделирование набора белково-нуклеиновых комплексов, а также отдельных ДНК комплексов. Были изучены как нативные ДНК комплексы, так и комплексы с единичными *N*-бензимидазольными модификациями, введенными в межнуклеотидную фосфатную группу, находящуюся с 1-го по 6-е положение от 3'-конца праймера. Для оценки влияния удлинения праймера и получения более достоверных данных рассматривали олигомеры с неудлиненной праймерной цепью с модификациями в положениях с 1-го по 4-е. Также исследовали системы с удлинением праймера от одного до пяти нуклеотидов, у которого до добавления нуклеотидов модификация находилась в 1-м положении, что соответствует расположению модификации во 2–6-м положениях от 3'-конца. Последовательности

модельных олигонуклеотидных комплексов и их обозначения приведены на рис. 1.

Построение модели проводили на основании модели с идентификационным номером PDB (Protein Data Bank, PDB ID) 1QTM, как описано в разделе Методы. Данная модель представляет собой фрагмент ДНК-полимеразы I бактерии *Thermus aquaticus* без эндонуклеазного домена в закрытом состоянии с ddNTP и Mg^{2+} , что, во-первых, является единственной трехмерной структурой ДНК-полимеразы I бактерии *T. aquaticus* в таком состоянии из описанных в литературе, а во-вторых, в нем отсутствует эндонуклеазный домен. Модификацию в структуру праймера вводили путем замены нативного фосфатного остатка на фосфорамидный, содержащий *N*-бензимидазольный остаток (см. рис. 1). Мы рассматривали два стереоизомера фосфорамидного остатка – Sp и Rp.

Анализ построенных молекулярных моделей модифицированной ДНК с Taq полимеразой выявил возможность двух положений бензимидазольной группы для каждого из стереоизомеров. Они соответствуют двугранному углу $OP-P-N-C$ около -100 или $+100^\circ$. Предварительное моделирование белково-нуклеиновых комплексов показало отсутствие переходов между ними. Поэтому мы изучали эти конформеры (ротамеры) для каждой из исследованных структур. Для модельных ДНК комплексов мы использовали следующие обозначения: *Li/Xj/Rk* или *Li/Xj/Sk*, где $i = 0-5$ – число нуклеотидов, на которое удлинен праймер; $j = 1-6$ – положение межнуклеотидного фосфатного остатка с 3' стороны праймера, в которое введена модификация; $k = 1, 2$ – номер конформера для каждого из изомеров Rp или Sp. Для конформеров R1 и S2 двугранный угол, образованный атомами $OP2-P-N-C$ и $OP1-P-N-C$, составлял -100° , для R2 и S1 – $+100^\circ$. При этом пространственная ориентация изомеров для структур R1 и S1 соответствует ориентации бензоазольного кольца модифицированного остатка в сторону от большой бороздки, а R2 и S2 – в сторону малой (рис. 2). Для моделирования

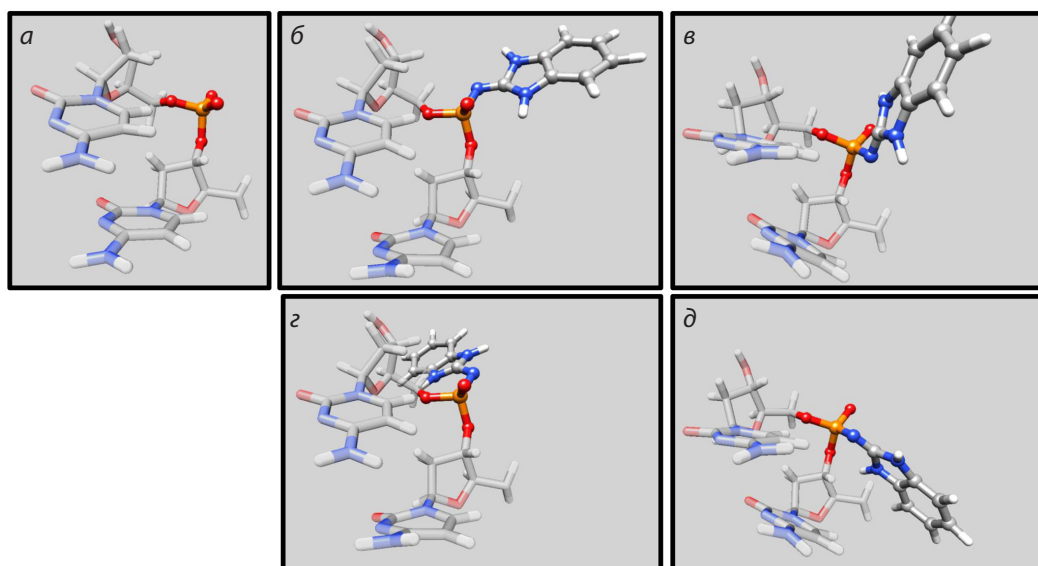


Рис. 2. Пространственная структура динуклеотидных шагов ДНК: нативного (а) и модифицированных для изученных стереоизомеров и конформеров R1 (б), S1 (в), R2 (г) и S2 (д).

было построено 36 комплексов с модифицированной ДНК и три – с нативной: неудлиненный и два удлиненных на 3 и 5 нт (L0, L3 и L5). Также моделирование было проведено для всех ДНК из этих моделей.

При построении комплексов белка с L3/X4/S2, L0/X4/S2, L0/X2/S2 и L4/X5/S2 наблюдается значительное стерическое перекрытие модифицированного остатка ДНК с белком, что не позволяет провести моделирование, или же при моделировании в течение первых нескольких наносекунд осуществляется переход S2 конформера в S1. В случае изомера S2 мы брали релаксированную структуру комплекса с изомером S1 и выполняли МД моделирование длиной 25 нс с наложением потенциала на двугранный угол OP1–P–N–C с возрастающим значением потенциала (0–0.2 нс, возрастание вклада от потенциала от 0 до 1, плоскодонный потенциал со стенками от –130.0 до –125.0 и от –115.0 до –110.0 с константой 200.0 ккал/моль/рад). После такой релаксации комплекса ротамер модифицированного остатка принимал необходимое положение в комплексе. Далее получали 100 нс МД траекторию, которую анализировали таким же образом, как и остальные.

Анализ конформационной подвижности

Устойчивость структуры белково-нуклеинового комплекса

В ходе МД моделирования структура белка для некоторых моделей претерпевала перестройки, что хорошо видно по увеличению величин среднеквадратичного отклонения (СКО) для белков (рис. S1)¹. В полученных траекториях СКО для белка варьировало достаточно сильно на первых 50 нс МД траектории. Для достоверного анализа мы продлили траектории таких комплексов на равновесном участке дополнительно на 50 нс. СКО для 150 нс траекторий таких комплексов приведены на рис. S1. Последние 50 нс были взяты для анализа.

Анализ МД траекторий показал, что одноцепочечный фрагмент матричной цепи оказывается чрезвычайно подвижным при МД моделировании и типично не занимает каких-либо предпочтительных положений. Поэтому при анализе структурированных участков белково-нуклеинового комплекса он был исключен из рассмотрения. На рис. S2 показана зависимость СКО вдоль траектории для всех исследованных комплексов. Видно, что на 50 нс участке траектории все структуры стабильны, о чем свидетельствуют постоянство величин СКО после кратковременного роста в первые 1–5 нс, а также малые значения флуктуаций графиков. Среднее значение СКО составляет 2.63 ± 0.29 Å, среднее стандартное отклонение вдоль траектории – 0.39 ± 0.11 Å.

Устойчивость структуры белка

Чтобы оценить изменение структуры белков при МД моделировании, были построены зависимости СКО от времени для белков в течение последних 50 нс траекторий относительно первой структуры в каждом из анализируемых участков траектории (рис. S3). Из представленных

данных видно, что структура белка во всех моделях очень стабильна после релаксации в течение первых 50 нс.

Проведенный анализ распределений СКО в траекториях, представленный на рис. S4, показывает, что значения СКО лежат в диапазоне до 3.5 Å, а распределения являются достаточно узкими, что свидетельствует о стабильности конформации белка. Наличие нескольких пиков в распределениях свидетельствует о существовании нескольких устойчивых конформаций в МД траектории, что подтверждается результатами кластерного анализа структуры (см. ниже). Вместе с тем такие структуры близки между собой.

Устойчивость структуры ДНК в составе комплекса

Изменение структуры ДНК при МД моделировании оценивали по величине СКО от времени в течение последних 50 нс траекторий относительно первой структуры в каждой из траекторий (рис. S5). Мы рассматривали структуру как только дуплексного участка, так и комплекса с одноцепочечным нависанием матричной цепи. Это связано с высокой конформационной подвижностью последнего. Из представленных данных видно, что структура дуплексной части ДНК во всех траекториях очень стабильна после релаксации в течении первых 50 нс. Анализ СКО вдоль траекторий для ДНК в комплексе с белком при рассмотрении ДНК с одноцепочечным нависанием матричной цепи и без учета одноцепочечного участка показал, что средние величины СКО и его стандартного отклонения (усреднение по всем моделям) существенно выше в первом случае (3.46 ± 0.97 и 0.84 ± 0.31 Å), чем во втором (1.97 ± 0.77 и 0.39 ± 0.12 Å). Таким образом, для достоверного анализа мы не рассматривали положение одноцепочечного фрагмента ДНК, который вдоль МД траекторий принимал различные положения.

Устойчивость структуры при моделировании свободной ДНК

Среднеквадратичное отклонение вдоль траекторий ДНК без белка показало существенно более высокую подвижность ДНК в сравнении с белковым комплексом (рис. S6). Средние величины СКО и его стандартного отклонения (усреднение по всем моделям) для всей ДНК составили 5.11 ± 1.72 и 1.29 ± 0.61 Å соответственно, а без одноцепочечного фрагмента – 2.45 ± 0.41 и 0.50 ± 0.12 Å. Таким образом, ожидаемо белок значительно ограничивает конформационную подвижность дуплексного фрагмента ДНК и его одноцепочечного фрагмента. Разнообразие принимаемых конформаций в свободной ДНК тоже выше, чем в составе комплекса, о чем говорят более высокие значения средних величин стандартного отклонения.

Анализ структуры белка, ДНК и белково-нуклеинового комплекса

Влияние модификации в ДНК на структуру белка проводили, анализируя величины СКО между Cα атомами белков для наиболее представленных структур в МД траекториях (последние 50 нс), полученных методом кластерного анализа. На основании этого была построена двумерная тепловая карта СКО (рис. S7). Для нативных и модифици-

¹ Рис. S1–S10 и табл. S1–S6 Приложения см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx39.pdf>

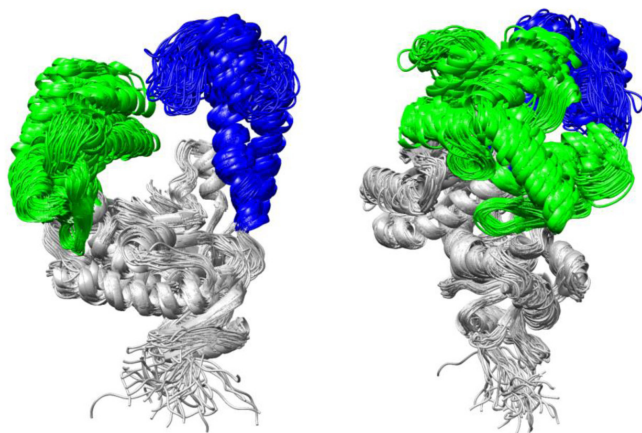


Рис. 3. Сопоставление наиболее представленных структур белков в МД траекториях всех исследованных комплексов, полученных методом кластерного анализа.

Серым цветом показан домен «ладонь», синим – «большой палец», зеленым – «пальцы». Выравнивание структуры белков проведено по домену «ладонь». Справа приведена структура, повернутая относительно левой вокруг вертикальной оси на 90°.

рованных комплексов усредненные значения СКО близки между собой и составляют в среднем 2.60 Å. В случае введения модификаций в различные положения для различных изомеров и ротамеров величины СКО значительно варьируют (от 1.31 до 4.37 Å). Средние значения СКО для каждой из структур в сравнении с другими лежат в диапазоне от 2.33 до 3.26 Å (табл. S1), что свидетельствует о близости всех рассматриваемых структур. Средние величины СКО для каждого из положений модификации в цепи ДНК после усреднения по стереоизомерам и конформерам могут быть выстроены в следующий ряд: $X1 < X2 < X6 < X4 < X3 < X5$, т.е. в положениях 3 и 5 модификации в наибольшей степени влияют на структуру Taq полимеразы. Анализ значений СКО, усредненных по различным положениям модификации для различных ротамеров и стереоизомеров, показывает, что величины СКО для белков располагаются в ряду $S1 > R1 > R2 > S2$. Это коррелирует с расположением модификации относительно ДНК цепи: при ориентации *N*-бензимидазольной группы в сторону большой бороздки нарушения в структуре белка оказываются наибольшими.

Сопоставление наиболее представленных в МД траекториях структур белка для всех модельных комплексов показывает, что отличие в их структуре наблюдается главным образом в расположении доменов «пальцы» и «большой палец» и сохранении структуры домена «ладонь», при этом *N*-конец белка обладает высокой конформационной подвижностью (рис. 3). Такие вариации связаны как с конформационной подвижностью доменов «большой палец» и «пальцы», так и с влиянием модификации на их расположение.

Структура ДНК

Известно, что НК субстрат в комплексе с полимеразой претерпевает значительные конформационные перестройки по сравнению со структурой в растворе (например, (Вино-

градова, Пышный, 2010)). Основные изменения в ДНК, наблюдаемые в экспериментально определенных структурах их комплексов с полимеразой, – изменение конформации сахара, изменение ширины малой бороздки и появление изгиба цепей. Проведен анализ структур, полученных в ходе моделирования как свободного НК субстрата, так и в комплексе с Taq ДНК-полимеразой. Для этого использовали наиболее представленные в МД моделировании структуры, определенные методом кластерного анализа. Среднеквадратичные отклонения между структурами для дуплексных фрагментов, рассчитанные при моделировании в комплексе с белком и в свободном состоянии для обоих типов стереоизомеров и двух типов конформеров для удлиненных и неудлиненных модельных систем, приведены в табл. S2.

Среднее значение СКО для всех комплексов составило ~2.4 Å. Наибольшее различие между структурой дуплексных участков НК при моделировании с белком и без белка наблюдалось для модификации, введенной по четвертому положению (L0/X4/S1), СКО которой было равно 3.3 Å. Данный факт связан с наибольшей шириной малой бороздки у этой структуры в комплексе с белком, чему способствует положение модификации, которая «экранирует» основания в большой бороздке от взаимодействия с водой и растягивает сахарофосфатный остов. Наименьшие отличия для структур НК с белком и без белка отмечены у структур X5 и X6 (см. табл. S2). СКО между немодифицированным и модифицированным НК субстратами в комплексе с Taq полимеразой составляет ~1.75 Å и в среднем меньше для тех модификаций, которые ориентированы в сторону большой бороздки, в результате чего они в меньшей степени взаимодействуют с белком.

Средняя по различным конформерам и изомерам величина СКО для ДНК в комплексе с белком составляет 2 Å. Меньшие значения соответствуют структурам, у которых модификация ориентирована в одном и том же направлении. Анализ структуры показывает, что даже значительные взаимодействия модификации с белком существенно не нарушают глобальную структуру дуплексной части НК субстрата. В целом структура субстрата с модификацией в большей степени зависит от того, с какими участками белка она взаимодействует, что определяется как изомером, так и конформером *N*-бензимидазольного остатка.

Структурные параметры исследованных НК субстратов в основном типичны для В-формы двойной спирали ДНК, при этом выявлены локальные изменения формы спирали вблизи 3'-конца праймера и места введения модификации. Для неудлиненных модельных систем (L0) показано значительное увеличение значения параметров крена (Roll) и прогиба (Buckle) для АТ пар оснований вблизи каталитического центра. Как для удлиненных, так и для неудлиненных комплексов значение угла кручения (Propeller) было в отрицательной области для таких пар (АТ), что характерно для А-трактов ДНК, но не последовательностей гетеронуклеотидного состава (Strahs, Schlick, 2000). Отклонение от главной оси спирали пар оснований было тем больше, чем ближе было расположение модификации к каталитическому центру, и значительно снижалось для ДНК с увеличенной дуплексной частью

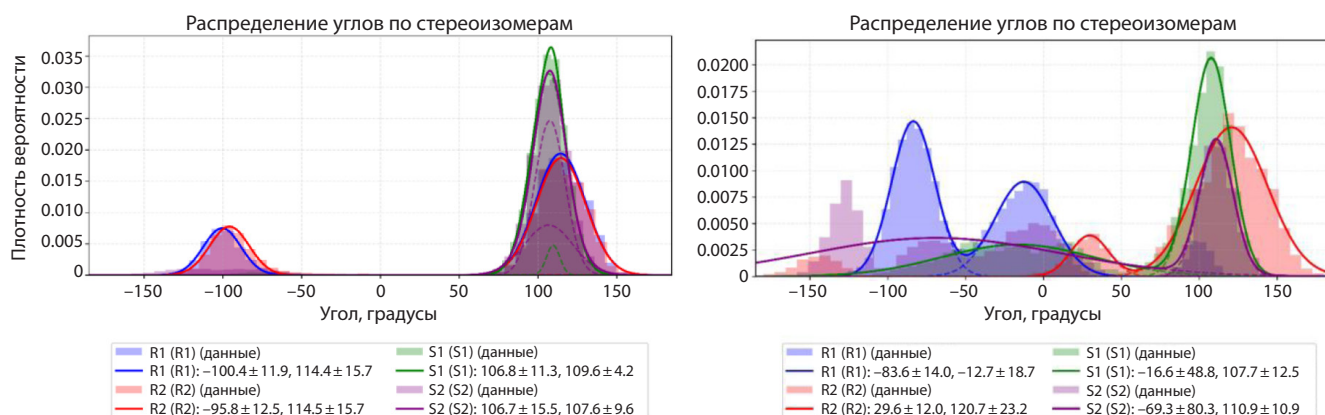


Рис. 4. Величины двугранного угла Р—N связи фосфорамидного остатка для конформеров 1 и 2 вдоль МД траектории для свободной ДНК (слева) и ДНК в составе комплекса с белком (справа) для всех исследованных комплексов.

(комплексы L1–L5). Значение параметра поворота (Twist) в среднем составляет 34° и не зависит от длины дуплекса. Это свидетельствует о том, что плотность упаковки ДНК практически не меняется при удлинении дуплексного участка или при введении модификации.

Во всех исследованных комплексах ширина малой бороздки ДНК вблизи каталитического центра значительно увеличена (расстояние между фосфорными атомами противоположных цепей достигает 15–18 Å) и дополнительно возрастает в модифицированных системах по мере увеличения длины дуплекса, что связано с удалением модификации от 3'-конца праймера. У нативных комплексов этот параметр изменялся в меньшей степени. Зависимости структурных параметров НК субстрата от пространственного расположения модификации не выявлено ввиду намного большего влияния положения модификации относительно 3'-конца праймера.

Анализ конформации сахара в ДНК показывает, что в большинстве случаев дезоксирибоза находится в С2'-эндо или близкой к ней конформации, но вблизи 3'-конца праймера наблюдались С1'-экзо и О4'-эндо конформации отдельных нуклеотидов. Это характерно для напряженных состояний, требуемых для акта катализа – присоединения нуклеотида к цепи праймера.

Наличие модификации в цепи ДНК в составе комплекса с Таq полимеразой вызывало значительное изменение канонического плоского спаривания оснований только в случае концевых и предконцевых пар оснований и модификации в первом или втором положении праймера. Структурный анализ показывает, что модификация не влияет на характер спаривания оснований: формируются уотсон-криковские пары со стандартными длинами водородных связей, за исключением концевых пар, что наблюдалось ранее как экспериментально, так и при МД моделировании (Nonin et al., 1995; Zgarbová et al., 2014). Таким образом, наибольшее влияние на локальную структуру ДНК в комплексе с полимеразой оказывала модификация первого межнуклеозидного фосфатного остатка. В целом наличие модификации не сильно изменяет структуру ДНК в составе как свободных дуплексов, так и фермент-субстратного комплекса.

Исследованы расположения *N*-бензимидазольного остатка в составе ДНК дуплекса в свободном состоянии и в комплексе с белком. Для этого анализировали двугранный угол Р—N связи, образованный немостиковым атомом кислорода фосфатного остатка (OP1 для Rp изомера и OP2 для Sp изомера), атомами фосфора, азота и атомом углерода бензоазольного кольца. Полученные результаты показали достаточно высокую подвижность остатков и возможность перехода из одного конформера в другой (рис. S8).

Популяционный анализ величин углов в МД траекториях показывает, что в случае свободной ДНК для удлиненных и неудлиненных комплексов в целом наблюдаются одинаковые закономерности (рис. S8 и S9). Из приведенных данных видно, что Rp изомер модифицированного остатка преимущественно ориентирован в сторону малой бороздки, а Sp изомер – в сторону большой бороздки, что соответствует углу около $+100^\circ$. В ряде случаев происходит выворачивание модификации в сторону от двойной спирали, что соответствует углу около -100° (конформеры R1 и S2). Меньшая доля такой ориентации связана с тем, что гидрофобный остаток стремится минимизировать контакт с водой путем взаимодействия с ДНК цепями. Следует отметить, что в большинстве случаев различий в форме распределений между двумя изомерами не выявляется: как правило, наличие двух пиков у изомера 1 сопровождается их наличием и у изомера 2. Разная амплитуда пиков в распределениях указывает на то, что мы не в достаточной степени покрыли конформационное пространство для положения модификации в рамках 50 нс траекторий для каждой из моделей. Однако если построить вероятностное распределение углов для всех положений в цепи каждого из изомеров, то средние значения для конформеров 1 и 2 каждого из стереоизомеров практически полностью совпадут (рис. 4).

В комплексе с белком положение модификации претерпевает значительные изменения в сравнении со свободной ДНК (см. рис. 4). На графиках величин углов и их вероятностей (см. рис. 4, рис. S9 и S10) в МД траекториях присутствуют углы, как лежащие между пиками, характерными для свободной ДНК ($+100^\circ$ и -100°), так и

смещенные относительно них в большую по абсолютной величине сторону. Это свидетельствует о значительном взаимодействии модифицированного остатка с белком.

Сопоставление средних величин вероятностей для разных типов изомеров в комплексах показывает, что они сильно отличаются между собой как для различных положений модификации, так и для данных, полученных в случае свободной ДНК (см. рис. 4, рис. S8 и S10). Видно, что распределение вероятностей для конформеров R1 и R2 радикально различается. Основной пик для R1 лежит в области -80° , что соответствует ориентации модификации в сторону большой бороздки (в сторону от ДНК). Это связано с тем, что нативный фосфатный остов ДНК при взаимодействии с белком координируется амикислотными остатками и, как следствие, модифицированный остаток вытесняется из малой бороздки ДНК. Основной пик распределения для конформера R2 лежит в районе $+100^\circ$, что соответствует ориентации модификации в область малой бороздки. В случае изомера S1 угол составляет $+100^\circ$, и модификация ориентирована преимущественно в сторону большой бороздки. Значительно от нее отличается изомер S2, в графике вероятности которого имеется набор равных по амплитуде пиков практически во всем диапазоне. Это говорит о том, что модификация может занимать в различных положениях цепи (X_j) разные пространственные положения, что обусловлено ее взаимодействием с белком.

Следует отметить, что для всех рассмотренных изомеров возникает пик в области 0° (см. рис. 4), что соответствует ориентации модификации в сторону от ДНК. При этом одна из аминогрупп пятичленного кольца *N*-бензимидазола формирует водородную связь с немостиковым атомом кислорода фосфатного остатка. Отсутствие таких ориентаций в свободной ДНК свидетельствует о том, что это положение стабилизируется дополнительным взаимодействием с белком.

Анализ взаимодействия модификации и Taq полимеразы

Проведен кластерный анализ последних 50 нс МД траекторий для получения наиболее представленных структур в них. Изучено расположение *N*-бензоазольных групп относительно активного центра и рассчитано количество атомов белка и карты контактов модификации с Taq полимеразой. Все атомы аминокислотных остатков, которые находились ближе 3 Å к модифицированному фосфатному остатку, считали взаимодействующими с ней (табл. S3 и S4). Размер дуплексного участка ДНК, который взаимодействует с Taq полимеразой, составляет 5–8 пар оснований, а во взаимодействии с ним принимает участие около 40 аминокислотных остатков, роль которых состоит в узнавании и удержания НК, а также акте катализа (Eom et al., 1996; Li Y. et al., 1998).

Анализ контактов между фосфорамидным *N*-бензимидазольным остатком и Taq полимеразой позволил выявить несколько закономерностей. Во-первых, в комплексах L0/X1/R1, L1/X2/R2, L0/X3/R2, L2/X3/R1 и L4/X5/R2 бензимидазольная модификация находилась в карманах белковой молекулы, а в случае четвертого положения для

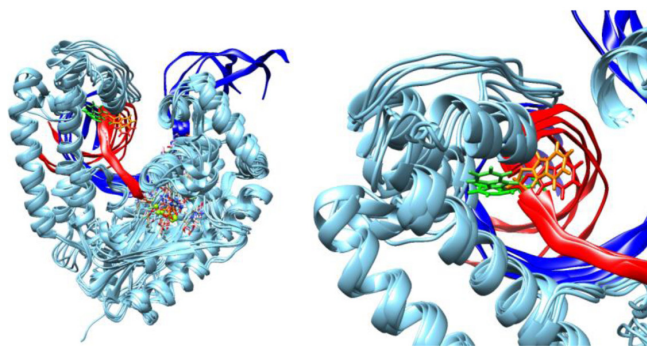


Рис. 5. Сопоставление структуры комплексов L0/X4: общий вид (слева) и приближение области взаимодействия модификации с доменом фермента «большой палец» (справа).

Taq ДНК-полимераза показана голубым цветом, матричная цепь ДНК – синим, праймер – красным. Модифицированные *N*-бензоазольные группы показаны в виде атомарной модели, Sp изомеры – красным и оранжевым цветом, Rp – зеленым.

R стереоизомеров оба конформера (X4/R1 и X4/R2) находились в кармане, причем с образованием стабильных связей между электроотрицательными атомами модификации и положительно заряженными аргининами белка (рис. 5).

В целом модификация в положениях с первого по пятое (X1–X5) формирует обширную сеть водородных связей и ван-дер-ваальсовых контактов с белком, в то время как для шестого положения такие взаимодействия намного менее выражены. Стереои́зомерия также значительно влияет на характер связывания: Sp стереоизомеры демонстрировали преимущественное взаимодействие с положительно заряженными остатками, тогда как Rp стереоизомеры чаще образовывали контакты с гидрофобными аминокислотами. Sp изомеры часто ориентированы в сторону большой бороздки и «экранируют» гетероциклические основания в структуре дуплекса от взаимодействия с водой, а Rp изомеры в основном направлены от ДНК в сторону белка. Наличие модификаций нередко приводит к нарушению регулярной структуры НК за счет взаимодействия бензимидазольной группы в кармане белка и возникновения напряжения в сахарофосфатном остове. Введение модификации в первое и второе положение праймера (X1 и X2) приводит к значительному нарушению спаривания концевой и предконцевой пар, а в случае комплексов L1/X2/S2, L0/X3/R1 и L0/X2/R1 наблюдается разрушение уотсон-криковских пар вблизи модификации.

Из литературных данных известно, что остаток Arg660 из домена «пальцы» координирует фосфатную группу в первом положении праймера от 3'-конца, Arg587 из домена «ладонь» координирует второй межнуклеозидный фосфат, а Arg536 из «большого пальца» – четвертый (Виноградова, Пышный, 2010). Наличие *N*-бензимидазольной модификации должно приводить к нейтрализации заряда фосфатной группы, а также к стерическим затруднениям при координировании фосфатной группы аргининами, что должно способствовать снижению скорости катализа. Однако структурный анализ показывает, что в случае Sp изомеров во второй и четвертой позиции (X2 и X4)

для обоих конформеров немостиковый атом кислорода фосфатного остатка все же координируется Arg536, как и один из конформеров Rp изомера при расположении модификации в первом (X1) или втором (X2) положении праймера.

Оба конформера Rp изомера в четвертом положении (X4/R1 и X4/R2) находятся в гидрофобном кармане домена большого пальца, в то время как Sp изомер значительно с белком не взаимодействует. В результате Rp фосфатная группа не позволяет переместить фермент в следующее положение вдоль цепи ДНК, необходимое для присоединения следующего нуклеотида к праймеру. Скорее всего, именно поэтому наблюдаются продукты неполного удлинения при расположении модификации в четвертом положении.

Нами было показано (Golyshev et al., 2025) в экспериментах по удлинению праймеров с *N*-бензимидазольной модификацией Таq ДНК-полимеразой, что введение модификации во вторую позицию демонстрирует наименьшее снижение эффективности удлинения в случае совершенных комплексов, что коррелирует с наименьшим количеством контактов модификации с белком среди первых трех межнуклеозидных фосфатных остатков. Кроме того, для всех совершенных комплексов с модификациями отчетливо наблюдалась полоса, соответствующая частично удлиненному праймеру, содержащему модификацию в четвертой позиции от 3'-конца. Эффект был более выражен в случае праймеров, несущих модификации в первой и третьей позициях. Эти наблюдения хорошо коррелируют с данными о расположении обоих конформеров R стереоизомеров (X4/R1 и X4/R2), которые находятся в кармане белка и эффективно взаимодействуют с ферментом (см. рис. 5).

Таким образом, стерические взаимодействия Rp изомеров с карманами белка способны замедлять или, как в случае четвертого положения модификации, препятствовать перемещению Таq ДНК полимеразы по субстрату. Это находит экспериментальное подтверждение в снижении скорости работы полимеразы и возникновении продуктов abortивного удлинения модифицированного праймера, содержащего фосфорамидную *N*-бензимидазольную группу.

Энергия взаимодействия субстрата с полимеразой

Описанные в предыдущем разделе взаимодействия могут находить отражение в энергии взаимодействия фермента с субстратом. Поэтому мы рассчитали энергию взаимодействия между субстратом и Таq полимеразой при помощи метода молекулярной динамики по обобщенной модели Борна (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area, MMGBSA), используя только МД траекторию комплекса. Для расчета брали в рассмотрение только дуплексную часть НК субстрата, чтобы снизить вариации рассчитываемой свободной энергии, связанные со свободным движением одноцепочечного участка матрицы. Величины энергий ДНК, белка, их комплекса, а также энергии комплексообразования приведены в табл. S5 и S6. Анализ энергий взаимодействия между модифицированным НК субстратом и Таq полимеразой выявил следующие за-

кономерности. Для нативных комплексов энергия связи увеличивалась по модулю с увеличением длины дуплексного участка, тогда как для модифицированных комплексов не обнаружено корреляции между энергией и длиной НК субстрата. В то же время наличие модификаций в 5-й и 6-й межнуклеозидных фосфатных группах показывало снижение эффективности связывания по сравнению со всеми остальными модельными системами, что коррелировало с уменьшением количества контактов ДНК с белком.

В случае неудлиненных модельных систем (L0) с наименьшей длиной дуплексного участка энергия комплексообразования оказалась в среднем значительно ниже (примерно -200 ккал/моль), чем в случае удлиненных комплексов (примерно -180 ккал/моль). Для большинства комплексов более энергетически выгодное связывание НК субстрата с белком наблюдалось для S стереоизомеров, что, скорее всего, обусловлено большей доступностью немостикового атома кислорода модифицированной фосфатной группы для взаимодействия с белком путем координации фосфатного остатка аминокислотами. Среди двух конформеров наибольшей по модулю энергией связи обладали конформации S1, где *N*-бензимидазольная модификация ориентирована в сторону большой бороздки, позволяя аминокислотным остаткам взаимодействовать с немостиковым атомом кислорода модифицированного фосфата. При этом мы не обнаружили связи между количеством атомов, близлежащих к модификации (атомов, находящихся на расстоянии менее 3 \AA от атомов *N*-бензимидазольной модификации, см. табл. S3), и энергией комплексообразования. Однако наибольшая энергия связывания фермента с субстратом наблюдалась для комплексов L0/X4/R1 и L0/X4/R2, для которых модификация располагается в кармане белка, взаимодействуя с наибольшим числом аминокислотных остатков (см. табл. S4).

Закключение

В настоящей работе методами молекулярного моделирования и анализа мы провели исследование структуры, динамики и энергии взаимодействия ДНК субстратов, которые содержат фосфорамидную *N*-бензимидазольную группу в праймерной цепи в различных положениях, с Таq ДНК-полимеразой. Было установлено, что положение модификации вблизи 3'-конца праймера и его стереоизомерия влияют на взаимодействие с ферментом. При этом в составе фермент-субстратного комплекса возникает два устойчивых конформера для каждого из изомеров фосфорамидной *N*-бензимидазольной группы. Анализ влияния стереометрии модификации на взаимодействие праймера с ферментом показывает более сильное взаимодействие Rp изомеров с полимеразой; наиболее сильное взаимодействие наблюдается при расположении модификации в четвертом межнуклеозидном фосфатном остатке с 3'-конца праймера. Структурный анализ ДНК и белка не выявил значимых структурных перестроек в биополимерах, а нарушения структуры при введении модификации в большинстве исследованных модельных систем либо незначительные, либо носят локальный характер. Наибольшее влияние на локальную структуру ДНК в ком-

плексе с полимеразой оказывала модификация первого межнуклеозидного фосфатного остатка.

Эти данные хорошо коррелируют с экспериментальными данными по процессированию ФАО Таq ДНК-полимеразой. В частности, со сниженной скоростью наработки продуктов полноразмерного удлинения ФАО праймеров, образования продуктов неполного удлинения праймера, содержащего модификацию в четвертой позиции от 3'-конца праймера, а также со значительным снижением эффективности удлинения праймера при введении модификации в первое положение (Chubarov et al., 2024; Golyshev et al., 2025).

Полученные нами результаты раскрывают молекулярные основы влияния фосфорамидной *N*-бензимидазольной группы на удлинении фосфорамидных бензоазольных праймеров. Эти данные будут применяться для рационального дизайна структуры ФАО при разработке систем молекулярной диагностики на основе методов ПЦР. Кроме того, существенные различия в эффективности взаимодействия полимеразы с Rp и Sp изомерами ФАО указывают на необходимость разработки методов стереоселективного синтеза таких олигомеров для более точного управления свойствами фосфорамидных бензоазольных олигонуклеотидов.

Список литературы / References

- Виноградова О.А., Пышный Д.В. Селективность ферментативного превращения олигонуклеотидных зондов при анализе нуклеотидных полиморфизмов ДНК. *Acta Naturae*. 2010;2(1):40-58 [Vinogradova O.A., Pyshnyi D.V. Selectivity of enzymatic conversion of oligonucleotide probes during nucleotide polymorphism analysis of DNA. *Acta Naturae*. 2010;2(1):40-58. doi 10.32607/20758251-2010-2-1-36-52]
- Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., Ronneberger O., ... Bapst V., Kohli P., Jaderberg M., Hassabis D., Jumper J.M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024;630(8016):493-500. doi 10.1038/s41586-024-07487-w
- Case D.A., Belfon K., Ben-Shalom I.Y., Brozell S.R., Cerutti D.S., Cheatham T.E. III, Cruzeiro V.W.D., ... Wu X., Xiong Y., Xue Y., York D.M., Kollman P.A. Amber 20. San Francisco, Univ. of California, 2020. Available at: <https://ambermd.org/doc12/Amber20.pdf>
- Chubarov A.S., Ooscorbin I.P., Filipenko M.L., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. Allele-specific PCR for *KRAS* mutation detection using phosphoryl guanidine modified primers. *Diagnostics*. 2020;10(11):872. doi 10.3390/diagnostics10110872
- Chubarov A.S., Ooscorbin I.P., Novikova L.M., Filipenko M.L., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. Allele-specific PCR for PIK3CA mutation detection using phosphoryl guanidine modified primers. *Diagnostics*. 2023;13(2):250. doi 10.3390/diagnostics13020250/S1
- Chubarov A.S., Baranovskaya E.E., Ooscorbin I.P., Yushin I.I., Filipenko M.L., Pyshnyi D.V., Vasilyeva S.V., Lomzov A.A. Phosphoramidate azole oligonucleotides for single nucleotide polymorphism detection by PCR. *Int J Mol Sci*. 2024;25(1):617. doi 10.3390/ijms25010617
- Di Giusto D., King G.C. Single base extension (SBE) with proofreading polymerases and phosphorothioate primers: improved fidelity in single-substrate assays. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(3):e7. doi 10.1093/nar/gng007
- Eom S.H., Wang J., Steitz T.A. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature*. 1996;382(6588):278-281. doi 10.1038/382278A0
- Golyshev V.M., Yushin I.I., Gulyaeva O.A., Baranovskaya E.E., Lomzov A.A. Properties of phosphoramidate benzoazole oligonucleotides (PABAOs). I. Structure and hybridization efficiency of *N*-benzimidazole derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;693:149390. doi 10.1016/j.bbrc.2023.149390
- Golyshev V.M., Morozova F.V., Berdugin A.A., Kozyreva E.A., Baranovskaya E.E., Yushin I.I., Lomzov A.A. Structural and thermodynamic insights for enhanced SNP detection using *N*-benzimidazole oligonucleotides. *J Phys Chem B*. 2025;129(44):11409-11420. doi 10.1021/acs.jpcc.5c04047
- Ishige T., Itoga S., Matsushita K. Locked nucleic acid technology for highly sensitive detection of somatic mutations in cancer. *Adv Clin Chem*. 2018;83:53-72. doi 10.1016/bs.acc.2017.10.002
- Izadi S., Anandakrishnan R., Onufriev A.V. Building water models: a different approach. *J Phys Chem Lett*. 2014;5(21):3863-3871. doi 10.1021/jz501780a
- Kalendar R., Baidyussen A., Serikbay D., Zotova L., Khassanova G., Kuzbakova M., Jatayev S., Hu Y.G., Schramm C., Anderson P.A., Jenkins C.L.D., Soole K.L., Shavruk Y. Modified "Allele-specific qPCR" method for SNP genotyping based on FRET. *Front Plant Sci*. 2022;12:747886. doi 10.3389/fpls.2021.747886
- Kutyavin I.V. Use of base modifications in primers and amplicons to improve nucleic acids detection in the real-time snake polymerase chain reaction. *Assay Drug Dev Technol*. 2011;9(1):58-68. doi 10.1089/adt.2010.0303
- Li Y., Korolev S., Waksman G. Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. *EMBO J*. 1998;17(24):7514-7525. doi 10.1093/emboj/17.24.7514
- Li Z., Song L.F., Li P., Merz K.M. Systematic parametrization of divalent metal ions for the OPC3, OPC, TIP3P-FB, and TIP4P-FB water models. *J Chem Theory Comput*. 2020;16(7):4429-4442. doi 10.1021/acs.jctc.0c00194
- Meagher K.L., Redman L.T., Carlson H.A. Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *J Comput Chem*. 2003;24(9):1016-1025. doi 10.1002/jcc.10262
- Nonin S., Leroy J.L., Guéron M. Terminal base pairs of oligodeoxynucleotides: imino proton exchange and fraying. *Biochemistry*. 1995;34(33):10652-10659. doi 10.1021/bi00033a041
- Novgorodtseva A.I., Vorob'ev A.Y., Lomzov A.A., Vasilyeva S.V. Synthesis and physicochemical properties of new phosphoramidate oligodeoxyribonucleotides. I. *N*-caffeine derivatives. *Bioorg Chem*. 2025;157:108313. doi 10.1016/j.bioorg.2025.108313
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605-1612. doi 10.1002/jcc.20084
- Rejali N.A., Moric E., Wittwer C.T. The effect of single mismatches on primer extension. *Clin Chem*. 2018;64(5):801-809. doi 10.1373/clinchem.2017.282285
- Roe D.R., Cheatham T.E. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J Chem Theory Comput*. 2013;9(7):3084-3095. doi 10.1021/ct400341p
- Shapovalov M.V., Dunbrack R.L. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure*. 2011;19(6):844-858. doi 10.1016/j.str.2011.03.019
- Starza I.D., Eckert C., Drandi D., Cazzaniga G.; EuroMRD Consortium. Minimal residual disease analysis by monitoring immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements by quantitative PCR and droplet digital PCR. *Methods Mol Biol*. 2022;2453:79-89. doi 10.1007/978-1-0716-2115-8_5
- Straus D., Schlick T. A-tract bending: insights into experimental structures by computational models. *J Mol Biol*. 2000;301(3):643-663. doi 10.1006/jmbi.2000.3863
- Terpe K. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(24):10243-10254. doi 10.1007/s00253-013-5290-2

- Tian C., Kasavajhala K., Belfon K.A.A., Raguette L., Huang H., Miguels A.N., Bickel J., Wang Y., Pincay J., Wu Q., Simmerling C. ff19SB: amino-acid-specific protein backbone parameters trained against quantum mechanics energy surfaces in solution. *J Chem Theory Comput.* 2020;16(1):528-552. doi 10.1021/acs.jctc.9b00591
- Unni S., Huang Y., Hanson R.M., Tobias M., Krishnan S., Li W.W., Nielsen J.E., Baker N.A. Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR. *J Comput Chem.* 2011; 32(7):1488-1491. doi 10.1002/jcc.21720
- Vasilyeva S.V., Baranovskaya E.E., Dyudeeva E.S., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. Synthesis of oligonucleotides carrying inter-nucleotide *N*-(benzoxazole)-phosphoramidate moieties. *ACS Omega.* 2023; 8(1):1556-1566. doi 10.1021/acsomega.2c07083
- Yushin I.I., Golyshev V.M., Novgorodtseva A.I., Lomzov A.A. Properties of phosphoramidate benzoazole oligonucleotides (PABAOs). II. Structure and hybridization efficiency of *N*-benzoxazole derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 2024;740:150997. doi 10.1016/j.bbrc.2024.150997
- Zgarbová M., Otyepka M., Šponer J., Lankaš F., Jurečka P. Base pair fraying in molecular dynamics simulations of DNA and RNA. *J Chem Theory Comput.* 2014;10(8):3177-3189. doi 10.1021/ct500120v
- Zgarbová M., Šponer J., Jurečka P. Z-DNA as a touchstone for additive empirical force fields and a refinement of the Alpha/Gamma DNA torsions for AMBER. *J Chem Theory Comput.* 2021;17(10):6292-6301. doi 10.1021/acs.jctc.1C00697

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.07.2025. После доработки 09.09.2025. Принята к публикации 09.09.2025.