

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԾԱՏՈՒՐՅԱՆ ՀԱՅՎ ԼԵՎՈՆԻ

ՆՈՒՎԼԵՈՏԻԴԱՅԻՆ ՀԱԶՈՐԴԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ
ՀԵՏԵՐՈԳԵՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ՆՈՒՎԼԵԻՆԱԹՅՈՒՆԵՐԻ
ԿՈՆՖՈՐՄԱՑԻՈՆ ԱՆՑՈՒՄՆԵՐՈՒՄ

Գ.00.02–«Կենսաֆիզիկա և կենսաինֆորմատիկա»
մասնագիտությամբ ֆիզիկամաթեմատիկական
գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2017

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ЦАТУРЯН АЙК ЛЕВОНОВИЧ

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НУКЛЕОТИДНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В КОНФОРМАЦИОННЫХ
ПЕРЕХОДАХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук по специальности
03.00.02–«Биофизика и биоинформатика»

ЕРЕВАН 2017

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, դոցենտ
Ե.Շ. Մամասախլիսով

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Ա.Թ. Կարապետյան
Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Ն. Ս. Անանիկյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Ի. Ջավախիշվիլիի անվան
Թբիլիսիի պետական
համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2017թ. հունիսի 2-ին ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2017թ. ապրիլի 28-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար, կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ

Ս. Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор физ.-мат. наук, доцент
Е.Ш. Мамасахлисов

Официальные оппоненты:

доктор физ.-мат. наук, профессор
А.Т. Карапетян
доктор физ.-мат. наук, профессор
Н.С. Ананикян

Ведущая организация:

Тбилисский государственный
университет им. И. Джавахишвили

Защита диссертации состоится 2-го июня 2017г. В 14⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 28-го апреля 2017г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
кандидат биол. наук, доцент

М.А.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Одной из основных задач молекулярной биофизики является определение физических закономерностей строения и биологической функции одно- и дунитевых нуклеиновых кислот. Общеизвестно, что биологическая функция биополимеров определяется их пространственной структурой. В связи с этим важным является определение основных факторов и закономерностей, влияющих на конформации и конформационные переходы. Одним из таких факторов является влияние нуклеотидной последовательности на образование вторичной структуры нуклеиновых кислот и взаимное влияние вторичной и третичной структур нуклеиновых кислот. Кроме того, остается ряд открытых вопросов, связанных с влиянием различных низкомолекулярных соединений (лигандов) на структуру и конформационные переходы в нуклеиновых кислотах.

Исследование данных вопросов представляет интерес также и с точки зрения биоинформатики. Алгоритмы расчета термодинамических параметров и предсказания оптимальной вторичной структуры одонитевой РНК в настоящее время широко используются в биологических исследованиях. Корректный учет эффекта гетерогенности последовательности существенно улучшит существующие алгоритмы и будет способствовать разработке новых подходов к данной проблеме.

Кроме того, исследование термодинамики и кинетики гибридизации нуклеиновых кислот представляет существенный интерес для создания биологических сенсоров и способствует определению оптимальных условий работы подобного рода устройств.

В свете изложенного, актуальность настоящей работы определяется разработкой новых подходов к исследованию эффектов нуклеотидной последовательности при плавлении и гибридизации нуклеиновых кислот в растворе и на границах раздела раствор – твердое тело.

Целью работы является:

1. Построение теории, описывающей термодинамические свойства одонитевой РНК со случайной последовательностью нуклеотидов.
2. Расчет термодинамических характеристик одонитевой РНК.
3. Построение теории, описывающей взаимное влияние пространственной и вторичной структур одонитевой РНК.
4. Изучение неравновесных эффектов, возникающих при коллапсе и гибридизации одонитевой РНК.
5. Расчет равновесных характеристик гибридизации ДНК-зондов иммобилизованных на границе раздела твердое тело – раствор с ДНК-мишенями в растворе в присутствие лигандов.
6. Изучение эффекта интеркалирующих лигандов на чувствительность и избирательность ДНК-сенсора.

Научная новизна заключается в построении модели, описывающей образование вторичной структуры одонитевой РНК, основанной на методе

отжига с ограничениями для случаев двух- и четырехбуквенного алфавита. Проведено сопоставление и показано количественное согласие с результатами численного моделирования. Получена температурная зависимость таких характеристик денатурации одонитевой РНК, как свободная энергия, степень спиральности, энтропия и теплоемкость. Для случайной последовательности нуклеотидов как двух, так и четырех типов показана возможность наличия двух, или трех структурных переходов. Показана возможная связь низкотемпературного структурного перехода с холодной денатурацией РНК, наблюдаемой на эксперименте. Показано, что данный эффект имеет место как для двух, так и для четырехбуквенного алфавита нуклеотидов при соответствующем выборе параметров взаимодействия.

Также в работе изучено влияние различных характерных времен релаксации пространственной и вторичной структур одонитевой РНК на ее структуру и термодинамические свойства. Предложен общий формализм, позволяющий описывать стационарное неравновесное состояние таких систем. В частности, показано, что при коллапсе одонитевой РНК имеет место неравновесный фазовый переход второго рода. Определены и рассчитаны энтропия и теплоемкость системы в стационарном неравновесном состоянии.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Одонитевая РНК со случайной двухбуквенной последовательностью нуклеотидов при определенном выборе параметров взаимодействия демонстрирует два пика на температурной зависимости удельной теплоемкости системы. Подобное поведение указывает на наличие двух структурных переходов.
2. В узком диапазоне параметров энергии образования пар оснований одонитевая РНК со случайной четырехбуквенной последовательностью демонстрирует три пика на температурной кривой для удельной теплоемкости.
3. Как для двух, так и для четырехбуквенного алфавита детально проанализирована холодная денатурация РНК и показано, что это явление может быть объяснено в терминах конкуренции между энергиями образования Уотсон – Криковских пар и пар одноименных нуклеотидов.
4. При коллапсе одонитевой РНК она претерпевает неравновесный фазовый переход второго рода, обусловленный различными характерными временами релаксации пространственных степеней свободы и элементов вторичной структуры.
5. Интеркалирующие лиганды повышают чувствительность и избирательность ДНК – сенсора за счет связывания с нативными участками гибридных ДНК на поверхности раздела твердое тело – раствор.

Научная и практическая ценность работы обусловлена существенным значением, которое играют термодинамические и кинетические эффекты при функционировании биологических макромолекул и их комплексов. В этой связи, теоретическое исследование эффектов

взаимодействия между нуклеотидами различных типов и других характеристик биологических макромолекул имеет важное значение для интерпретации экспериментальных результатов и их предсказания. При этом, понимание основных принципов, лежащих в основе самоорганизации и коформационных перестроек в биологических макромолекулах имеет большое практическое значение для решения проблем биологии и медицинских приложений. В частности, полученные результаты несомненно будут полезны при оценке оптимальных режимов работы ДНК – сенсоров. Кроме того, рассчитанные в работе термодинамические характеристики оц-РНК, несомненно, позволяют усовершенствовать существующие биоинформационные алгоритмы, используемые при расчете стабильности вторичной структуры РНК.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на научных семинарах кафедры молекулярной физики ЕГУ и на семинарах Учебно-научного центра повышения квалификации ЕГУ по теме «Алгебраические и геометрические исследования по физике конденсированных сред». Материалы диссертации также были представлены и докладывались на научных конференциях: International Young Scientists Conference “Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology-3”, The Institute of Molecular Biology NAS RA, Yerevan, Armenia, September 26-29, 2012; “Disordered and Ordered Materials Analysis and Characterization - DOM2015”, International Symposium and Young Scientist School 24-30 September 2015, Yerevan, Armenia.

Публикации.

По теме диссертации опубликованы 4 научных статьи.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, насчитывающего 148 наименований. Диссертация изложена на 108 страницах, включает 39 рисунка.

Во Введении сформулирована цель работы, показана научная новизна и практическая значимость результатов, перечисляются основные положения представленные к защите. **Первая глава** посвящена обзору структуры, термодинамики и биологических свойств нуклеиновых кислот. Представлены основные свойства ставших классическими моделей ДНК. Также, литературный обзор содержит описание основных моделей вторичной структуры РНК и динамических алгоритмов расчета ее термодинамических параметров. **Вторая глава** посвящена модели однострессовой РНК, учитывающую гетерогенность нуклеотидной последовательности. В рамках этой модели рассчитаны основные термодинамические параметры системы. В основу расчетов термодинамических функций взят метод отжига с ограничением. **Третья глава** диссертационной работы посвящена взаимному влиянию вторичной и пространственной влиянию структур, возникающих в однострессовой РНК. Изучено стационарное неравновесное состояние, возникающее на временах наблюдения, промежуточных для характерных времен релаксации вторичной и третичной структур РНК. **Четвертая глава** посвящена гибридизации мишеней ДНК с ДНК – зондами, иммобилизованными на границе раздела твердое тело – раствор. В

ней представлены результаты, описывающие влияние интеркалирующих лигандов на чувствительность и избирательность ДНК – сенсоров. Работа завершается **Выводами**.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована цель диссертационной работы, приведены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор структуры, термодинамики и биологических свойств нуклеиновых кислот. Представлены основные свойства ставших классическими моделей ДНК. Также, литературный обзор содержит описание основных моделей вторичной структуры РНК и динамических алгоритмов расчета ее термодинамических параметров.

Во второй главе диссертационной работы представлен подход к исследованию однонитевой РНК со случайной гетерогенной последовательностью. Рассмотрены два типа алфавита: 1) состоящий только из А и U нуклеотидов и 2) содержащий все четыре нуклеотида А, U, G, C. Используется стандартное для моделей, основанных на методах динамического программирования ограничение: запрет на образование так называемых псевдоузлов из множества доступных вторичных структур (P. G. Higgs, 2000; R. Bundschuh & T. Hwa, 2002). Таким образом, для любых двух пар оснований (i, j) и (k, l) при $i < j$, $k < l$, и $i < k$ мы имеем либо $i < k < l < j$ или $i < j < k < l$. По определению, вторичная структура есть набор всех пар оснований. При этом, одно основание может быть частью не более одной пары. Статистическая сумма произвольной субцепи однонитевой молекулы РНК без псевдоузлов вычисляется рекурсивно как (S. McCaskill, 1990)

Гамильтониан модели имеет следующий вид:

$$H(m, \epsilon) = \sum_{1 \leq i < j \leq N} m_{ij} \epsilon_{ij}, \quad (1)$$

где сумма берется по всем неповторяющимся парам оснований, $m_{ij} = 1$, если основания i и j составляют пару, и $m_{ij} = 0$ в противном случае.

Константа взаимодействия может быть представлена как $\epsilon_{ij} = \epsilon_0 + \epsilon h_i h_j$ для двухбуквенного алфавита {A,U} и как $\epsilon_{i,j} = \epsilon_0 + \epsilon_1 h_i h_j + \epsilon_2 g_i g_j$ для четырехбуквенного {A,U,G,C}. В первом случае, $\{h_i\}$ описывают тип нуклеотида, где $h_i = +1$ соответствует А, а $h_i = -1$ U нуклеотидам. В втором, каждый нуклеотид может быть описан следующим образом:

	$h_i = +1$	$h_i = -1$
$g_i = +1$	C	G
$g_i = -1$	U	A

и каждая последовательность РНК, может быть обозначена как (h, g) .

Случайная последовательность для алфавита $\{h_i\} \{A, U\}$ генерируется в соответствии с функцией распределения

$$P\{h\} = \prod_{i=1}^N \rho(h_i), \quad (2)$$

где $\rho(h_i) = q\delta(h_i - 1) + (1 - q)\delta(h_i + 1)$ и $0 < q < 1$. В то же время, для алфавита $\{A, U, G, C\}$ используется функция распределения вида

$$P(h) = \prod_{i=1}^N \rho(h_i), P(g) = \prod_{i=1}^N \rho(g_i). \quad (3)$$

где

$$\rho(h_i) = p_h \delta(h_i - 1) + (1 - p_h) \delta(h_i + 1), \quad (4)$$

и аналогично

$$\rho(g_i) = p_g \delta(g_i - 1) + (1 - p_g) \delta(g_i + 1). \quad (5)$$

Статистическая сумма для цепи однонитевой РНК из N нуклеотидов Z_N может быть представлена как

$$Z_N = \sum_m' \exp(-\beta H(m, \epsilon)) \quad (6)$$

где $\beta = \frac{1}{k_B T}$, а сумма берется по всем реализациям матрицы \hat{m} без псевдоузлов.

При этом, матрица \hat{m} содержит не более одной единицы на каждой строке или столбце. Последнее условие описывает насыщенность спаривания оснований.

Благодаря свойству самоусредняемости, приведенная свободная энергия в термодинамическом пределе $N \rightarrow \infty$ становится неслучайной величиной и

$$f = \overline{f(h, g)} = -\frac{1}{N} \ln Z_N(h, g) \quad (7)$$

где f – приведенная закаленная свободная энергия. Свободная энергия однонитевой РНК со случайной фиксированной последовательностью нуклеотидов удовлетворяет следующим условиям:

$$f \geq g(\beta, \mu) \geq f_a, \quad (8)$$

где $f_a = -\frac{1}{N} \ln Z_N(\{h_i\})$ – приведенная отоженная свободная энергия для двухлитерного случая. Для полного алфавита $\{A, U, G, C\}$ определение будет таким же, лишь с той разницей, что последовательность будет генерироваться в соответствии с функцией распределения (3). При этом, для алфавита $\{A, U\}$

$$g(\beta, \mu) = -\frac{1}{N} \ln Z_N = -\frac{1}{N} \ln Z_N(\{h_i\}) e^{-N\mu\alpha(\{h_i\})}. \quad (9)$$

Здесь $\alpha(\{h_i\})$ – это некоторая самоусредняемая величина, зависящая от последовательности. Таким образом, $g(\beta, \mu)$ дает нижнюю границу закаленной свободной энергии f . При расчете вариационного потенциала $g(\beta, \mu)$ накладываются определенные макроскопические ограничения на последовательность нуклеотидов. Согласно неравенству (8), лучшая нижняя граница закаленной свободной энергии дается $\max_{\mu} g(\beta, \mu)$ и мы можем оценить свободную энергию однонитевой молекулы РНК с фиксированной случайной последовательностью как

$$f \approx \max_{\mu} g(\beta, \mu). \quad (10)$$

Простейшее ограничение, накладываемое на описывающие последовательность переменные $\{h_i\}$, задается выражением $\alpha(\{h_i\}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [h_i - (2q - 1)]$, которое не фиксирует типы индивидуальных мономеров h_i , но только среднее значение суммы $\sum_i h_i$. Аналогичное ограничения для случая полного алфавита $\{A, U, G, C\}$ имеет вид $\alpha_{[h,g]} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [h_i g_i - (2p_{[h,g]} - 1)]$. Можно показать, что статистическая сумма Z_N , определенная в (6), для алфавита $\{A, U\}$ после некоторых преобразований записывается как

$$Z_N = e^{N\mu(2q-1)} \Omega^N Z_N^0(\epsilon_0 + \bar{\epsilon}), \quad (11)$$

где $Z_N^0(\epsilon_0 + \bar{\epsilon})$ – статистическая сумма (6) для гомополимерной однопонитевой РНК с эффективной константой взаимодействия $\epsilon_{ij} = \epsilon_0 + \bar{\epsilon}$. Здесь

$$\bar{\epsilon} = -\frac{1}{\beta} \ln \frac{W(\mu, \beta, \epsilon)}{\Omega(\mu)^2}, \quad \Omega(\mu) = qe^{-\mu} + (1-q)e^{\mu},$$

$$W(\mu, \beta, \epsilon) = e^{-\beta\epsilon} [q^2 e^{-2\mu} + (1-q)^2 e^{2\mu}] + 2q(1-q)e^{\beta\epsilon}. \quad (12)$$

Вариационная свободная энергия $g(\beta, \mu)$ для длинных ($N \gg 1$) цепей имеет вид

$$g(\beta, \mu) = -\mu(2q-1) - \ln \Omega(\mu) - \ln \left(1 + 2\sqrt{\bar{Q}}\right), \quad (13)$$

где $\bar{Q} = e^{-\beta(\epsilon_0 + \bar{\epsilon})}$. Максимизация потенциала $g(\beta, \mu)$ по μ дает решение $\mu_0(\beta)$ определяемое уравнением

$$2q-1 = \left[\frac{2\sqrt{\bar{Q}}}{1+2\sqrt{\bar{Q}}} - 1 \right] \frac{d \ln \Omega(\mu)}{d\mu} - \frac{1}{2} \frac{2\sqrt{\bar{Q}}}{1+2\sqrt{\bar{Q}}} \frac{\partial \ln W(\mu, \beta, \epsilon)}{\partial \mu}. \quad (14)$$

В то же время, аналогичные преобразования для полного алфавита $\{A, U, G, C\}$ приводят к следующему выражению для вариационной свободной энергии

$$g(\mu_h, \mu_g) = -\mu_h(2p_h - 1) - \mu_g(2p_g - 1) -$$

$$-\ln \Omega_h(\mu_h) - \ln \Omega_g(\mu_g) - \ln \left(1 + 2\sqrt{\omega^{ca}(\mu_h, \mu_g)}\right) \quad (15)$$

и максимуму вариационной свободной энергии

$$1 - 2p_{[h,g]} = \frac{\partial \ln \Omega_{[h,g]}}{\partial \mu_{[h,g]}} - \frac{2\sqrt{\omega^{ca}}}{1+2\sqrt{\omega^{ca}}} \left(\frac{\partial \ln \Omega_{[h,g]}}{\partial \mu_{[h,g]}} - \frac{1}{2} \frac{\partial \ln \gamma_{[h,g]}}{\partial \mu_{[h,g]}} \right), \quad (16)$$

для h и g соответственно. Полученные решения позволяют вычислить теплоемкость и степень спиральности для описанных выше моделей и дают фазовые диаграммы вида, представленные на Рис.1 и 2.

Для изучения общего поведения четырехлитерной модели мы выбираем энергию ϵ_{GG} и исследуем разные точки на плоскости $\{p_h, p_g\} \in [0, 1]$, показанной на Рис.2. В каждой области, помеченной римскими цифрами каждая точка является зеркально симметричной относительно обеих осей, соединяющих точку $(0.5, 0.5)$ с точками $(0.0, 0.5)$ и $(0.5, 0.0)$ соответственно. Следовательно, для любой точки $(p_h, p_g) \in [0, 1]$, точки

$$(1 - p_h, p_g) \Delta (1 - p_h, 1 - p_g) \Delta (p_h, 1 - p_g) \quad (17)$$

симметричны и внутри этих двух наборов областей $\{I, IV, V, VIII\}$ и $\{II, III, VI, VII\}$ дают одинаковые результаты. Ниже мы представим результаты из областей I и II для каждого набора энергетических степеней свободы помня о лежащей в основе этого симметрии. Для простоты возьмем $\epsilon_0 = -1$, составляя

привлекательный фон взаимодействия, а также рассмотрим возможные значения отношения

$$\Lambda \equiv \left| \frac{\epsilon_1}{\epsilon_0 + \epsilon_2} \right| \quad (18)$$

для разных точек $\{p_h, p_g\}$. При неконкурентного режиме ($\Lambda < 1$) холододвая денатурация не наблюдается и мы имеем только высокотемпературное плавление, что видно на Рис. 3, где мы сравнили удельную теплоемкость и степень спиральности на границе между областями I и II при разных вероятностях (p_h, p_g) . Из Рис. 3 видно, что в этом случае удельная теплоемкость всегда имеет два пика. Критическое значение $\Lambda = 1$ является точкой, при которой низкотемпературный пик становится доминирующим и для которого $\theta_0 \neq 1$. При $\Lambda > 1$ пик растет, а степень спиральности принимает свое минимальное значение $\theta_0 = 0$.

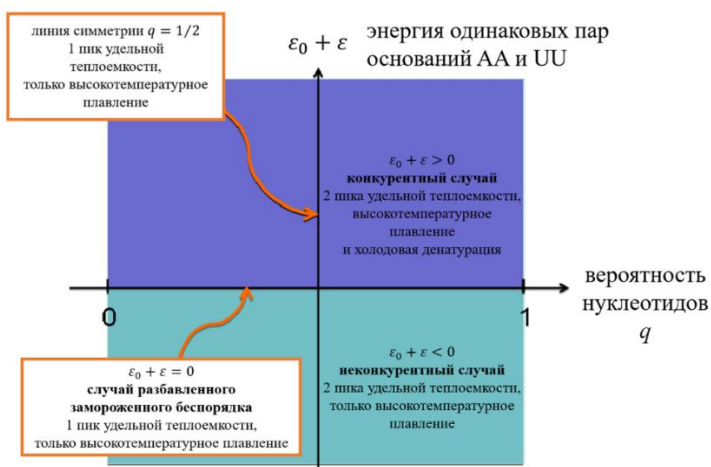


Рис.1. Фазовая диаграмма поведения фолдинга РНК как функции от вероятности нуклеотидов q и энергии одинаковых пар оснований $\epsilon_0 + \epsilon$.

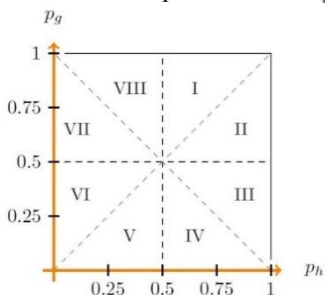


Рис.2. Плоскость сечения $\{p_h, p_g\} \in [0,1]$ для зафиксированной энергии ϵ_{GG} . Результаты для точек на диагональных линиях симметричны относительно осей p_h и p_g и центра симметрии $(0.5,0.5)$.

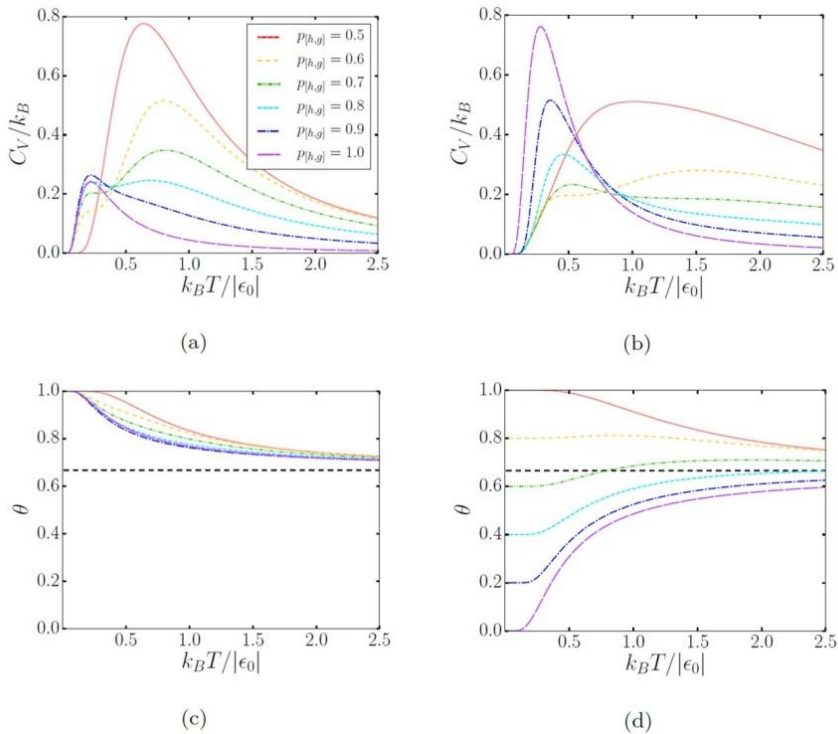


Рис.3. Удельная теплоемкость (а) (б) и степень спиральности (с) (д) для разных вероятностей $0.5 \leq (p_h, p_g) \leq 1.0$ в случае ограниченного отжига. Графики (а) и (с) получены для $\Lambda = 1/2$ и $\epsilon_{GG} = -|\epsilon_0|$, а графики (б) и (д) - для $\Lambda = 2$ и $\epsilon_{GG} = 1.5|\epsilon_0|$. Пунктирная черная линия определяет асимптотическое значение в высокотемпературной расплавленной фазе.

В Третьей главе диссертационной работы исследована кинетика огрубленной модели оц-РНК. Как известно, характерная вторичная структура РНК может быть представлена в виде дерева, ветви которого образуются относительно короткими двухцепочечными спиралями (deGennes, 1963). Рассмотрим следующий мысленный эксперимент. Молекула одноцепочечной РНК сначала растворяется в растворителе при температуре T' , которая удовлетворяет неравенствам $\theta < T' < T_m$, где T_m – является температурой плавления, а θ – температурой Флори. В этих условиях молекула РНК представляет собой статистический клубок с хорошо определенной вторичной структурой. Затем перенесем очень небольшое количество нашего раствора, содержащего РНК, в такой же растворитель, но с температурой T так, чтобы

$T < \theta$. Теперь содержание вторичной и третичной структур не соответствует температуре термостата, и система оказывается в неравновесном состоянии. Вначале вторичная и пространственная структуры в этом состоянии все еще соответствуют температуре T' , но они начинают релаксировать к состоянию соответствующему новой температуры T . В конце процесса оц-РНК придет в компактное глобулярное состояние с некоторой вторичной структуры. В рамках предложенной модели петлевые участки представляются в виде мономеров, соединенных спиральными участками – ветвями дерева, а гамильтониан взаимодействия имеет вид:

$$H = H_{II} + \sum_{i < j} v_{ij} \delta(x_i - x_j) + V_{conf}, \quad (19)$$

где член $H_{II}(\{x_i\}; \hat{B}) = \frac{dT}{2l^2} \sum_{i < j} B_{ij} (x_i - x_j)^2$ описывает упругость спиральной пружины между i -м и j -м эффективными мономерами, а l является равновесным расстоянием между соседними мономерами. v_{ij} – второй вириальный коэффициент взаимодействия между i -м и j -м эффективными мономерами, а $V_{conf}(\{x_i\})$ – сжимающий потенциал, описывающий однородное притяжение между спиральными участками. В терминах случайно разветвленного полимера вторичная структура описывается матрицей $\hat{B} = \parallel B_{ij} \parallel$, где $B_{ij} = 1$, если i -ый и j -ый мономеры связаны спиральными участками и $B_{ij} = 0$, в противном случае.

Взаимодействия между неспаренными областями (петлями) i и j определяются их размером и нуклеотидными последовательностями. Так как многие нуклеотиды вносят вклад во взаимодействие этих эффективных мономеров i и j , разумно рассматривать коэффициенты v_{ij} как статистически независимые гауссовские случайные переменные с распределением

$$p(v_{ij}) \sim \exp(-v_{ij}^2 / (2\Lambda^2)), \quad (20)$$

где Λ является дисперсией распределения. Возможны два типа конформационных перестроек в РНК: перегруппировка вторичной структуры с характерным временным масштабом τ_2 и флуктуации третичной структуры с характерным временным масштабом τ_3 . Разница между масштабами времени τ_2 и τ_3 является существенной. Поэтому в дальнейших расчетах предполагается, что $\tau_3 \ll \tau_2$. Причиной этого является не только более высокая стабильность пар оснований по сравнению с третичными контактами. Важную роль также играют кинетические факторы. Образование пар оснований происходит путем ракручивания одиночных цепей с дальнейшим образованием дуплекса, и процесс ракручивания одиночных цепей кинетически затруднен. Мы можем написать статистическую сумму системы в виде

$$Z = \int D\rho e^{-\beta F(\rho)}, \quad (21)$$

где $\beta = 1/T$, $\rho(X) = \sum_{i=1}^N \prod_{a=1}^n \delta(x_i^a - x^a)$, $X = (x^1, \dots, x^n)$.

$F(\rho) = E\{\rho\} - TS\{\rho\}$

является n -репличной свободной энергией, где

$$E\{\rho\} = \sum_a V_{conf}(c_a) - \frac{\beta\Lambda^2}{4} \sum_{a=b} \int dx dy q_{ab}^2(3, x, y),$$

$$S\{\rho\} \cong -\frac{1}{2} \int dX \frac{(\Delta\rho(X))^2}{\rho(X)}. \quad (22)$$

Здесь величина $c_a(x) = \int dX \rho(3.X) \delta(x^a - x)$ является однопепличная плотность мономеров, $q_{ab}(x, y) = \int dX \rho(3.X) \delta(x^a - x) \delta(x^b - y)$ – двурепличный параметр перекрывания, а Δ – оператор Лапласа в $(n \times d)$ -мерном пространстве. свободная энергия приходящаяся на один мономер имеет две ветви:

$$f = \frac{F(\rho)}{Nn} = T \frac{v_0}{4l^d} + \begin{cases} f_<, & \text{если } n \leq u_0 \\ f_>, & \text{если } n > u_0 \end{cases}. \quad (23)$$

Это указывает на существование фазового перехода при температуре

$$T_c' = \frac{T}{u_0}. \quad (24)$$

Неупорядоченная свободная энергия

$$f_< = f_<^0 - \frac{n^\zeta}{\zeta} (a_1 - Tl^4 dz_0^2), \quad (25)$$

где $n \leq u_0$, $\zeta = \frac{3d+4}{4-d}$, $a_1(d, \beta, \Lambda, l) \propto \beta^{-1}(\beta \Lambda l^{-d})^{1/\gamma(d)}$. В то же время при $n \geq u_0$ неупорядоченная свободная энергия может быть записана в виде

$$f_> = f_>^0 - n \left(a_1 u_0^{\zeta-1} + Tl^4 dz_0^2 u_0^{\zeta+1} \frac{1}{n^2} \right), \quad (26)$$

где $f_>^0 = f_>^0(T, d, \Lambda, l)$. Полная энтропия двухтемпературной системы определяется как (Allahverdyan, Petrosyan, 2006)

$$S_{tot} = S_{II} + S, \quad (27)$$

где $S_{II} = -\frac{\partial}{\partial T'} F \Big|_{T=const}$ и $S = -\frac{\partial}{\partial T} F \Big|_{T=const}$. Суммарная удельная теплоемкость, имеет следующий вид:

$$C_{tot} = C_{II} + C, \quad (28)$$

где величина $C_{II} = T' \frac{\partial S_{II}}{\partial T'}$ является удельной теплоемкостью вторичной структуры и $C = T \frac{\partial S}{\partial T}$.

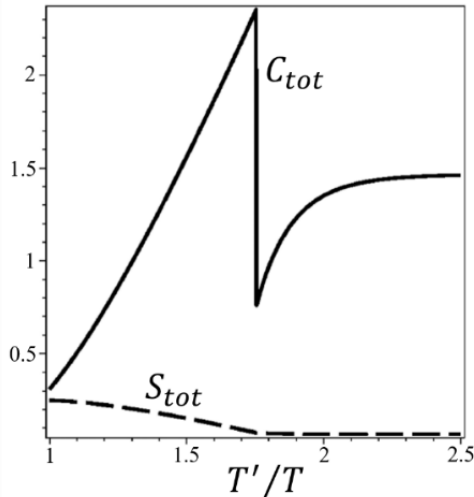


Рис.5. Температурные поведения суммарной удельной теплоемкости (сплошная линия) и суммарной энтропии (пунктирная линия) для $d = 3$ и $\frac{\beta\Delta}{jd} = 140$.

Как показано на Рис.5, график суммарной удельной теплоемкости c_{tot} имеет резкий пик в окрестностях критической точки T'_c , что указывает на наличие фазового перехода. Наблюдаемый разрыв свидетельствует о существовании неравновесного фазового перехода второго порядка.

Понижение температуры T' в сторону температуры T соответствует приближению одноцепочечной РНК к равновесию в процессе термодинамической релаксации и обеспечивает условия для гибридизации РНК и перестройки вторичной структуры. При температурах $T' > T'_c$, соответствующих состоянию, достаточно далекому от равновесия, ландшафт свободной энергии имеет ту же структуру, что и в случае расплавленной структуры ветвлений. Однако для температур $T' < T'_c$ у нас есть реплично симметричная фаза с отличным от нуля спин-стекольным параметром порядка (так называемый репличный «магнит»). Таким образом, в процессе релаксации наблюдаются два режима, характеризующиеся различными ландшафтами свободной энергии, (Рис.6). Если эффективная температура РНК T' удовлетворяет условию $T' > T'_c$, то получается стеклообразное состояние (Рис.6а), где у нас есть несколько трегичных структур, соответствующих минимумам свободной энергии для каждой вторичной структуры. В то же время, если эффективная температура T' становится меньше критической температуры T'_c , для каждой вторичной структуры имеется только одно основное состояние (Рис.6б). Таким образом, усиление гибридизации в процессе термодинамической релаксации сопровождается настройкой трегичной структуры в соответствии с установленной вторичной структурой.

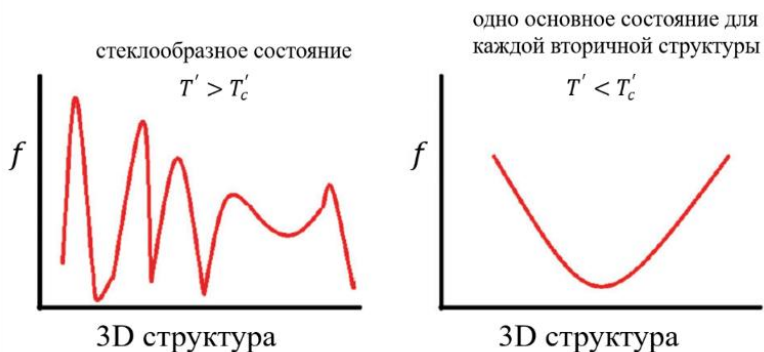


Рис.6. Эскиз ландшафта свободной энергии.

Четвертая глава диссертационной работы посвящена изучению селективности и чувствительности ДНК-чипов за счет усиления электрического

сигнала и стабильности целевого зонда гибридизации в присутствии интеркалирующих лигандов. Требованиями, предъявляемыми к ДНК–сенсорам является высокая чувствительность и селективность, которые, в свою очередь, требуют максимальной эффективности гибридизации и минимальной неспецифической адсорбции на границе раздела твердой и жидкой фаз. Гибридизация нуклеиновых кислот в значительной степени зависит от температуры, концентрации солей, вязкости, GC–состава и других физико-химических характеристик.

В четвертой главе в частности, получена изотерма гибридизации ДНК на поверхности в присутствии лигандов, которые связываются с нативными участками ДНК. Рассмотрены равновесные изотермы гибридизации для двух идеализированных, но экспериментально доступных ситуаций, когда ДНК–чип погружен в раствор, содержащий интеркалированные лиганды. В результате имеется либо только один тип одноцепочечной мишени (рис.7а), либо раствор содержит мишени двух разных типов, которые не гибридизуются в объеме, но оба способны гибридизоваться с тем же зондом на поверхности (рис.7б).

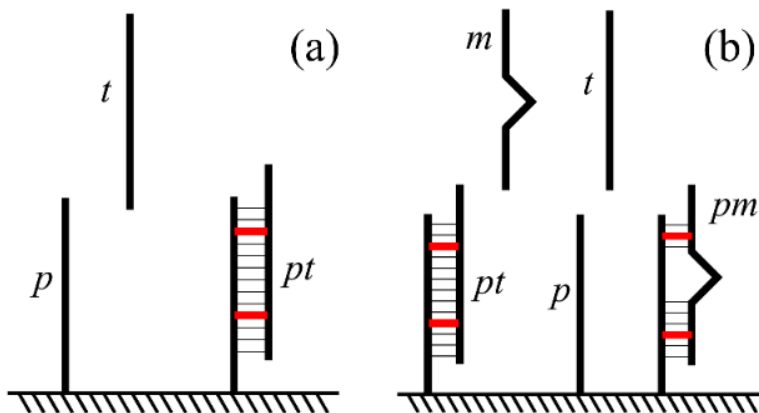


Рис.7. Схемы (а) неконкурентной и (б) конкурентной гибридизации на поверхности в присутствии лигандов.

Рассмотрим совокупность N_0 одонитевых пробных p молекул ДНК, где N_{pt} из них гибридизованы с мишенью t . Гибридизация p и t создает на поверхности двухцепочечный олигонуклеотид pt . В простейшем случае для одного вида мишени, состоящей из одноцепочечной ДНК, поверхность будет покрыта только свободными зондами p и гибридизованными олигонуклеотидами pt . В отсутствие лигандов свободная энергия слоя с зондами будет иметь следующий вид:

$$G = G_0 + N_{pt}\mu_{pt}^0 + (N_0 - N_{pt})\mu_p^0 + N_0 \sum \gamma_{el} + k_B T \left[N_{pt} \ln \left(\frac{N_{pt}}{N_0} \right) + (N_0 - N_{pt}) \ln \left(\frac{N_0 - N_{pt}}{N_0} \right) \right], \quad (29)$$

где Σ – площадь, приходящаяся на один зонд, G_0 – плотность свободной энергии голы поверхности, μ_{pt}^0 и μ_p^0 – химические потенциалы зондов pt и p в исходном состоянии и γ_{el} – электростатическая плотность свободной энергии зондирующего слоя.

Если интеркаляция является единственным механизмом связывания лигандов, то образование комплекса ДНК–лиганд будет ограничено только двцепочечными областями и свободная энергия слоя с зондами составит:

$$G_L = G + N_{pt} \left\{ m\mu_b^0 + k_B T \left[m \ln \left(\frac{m}{N} \right) + (N - m) \ln \left(\frac{N-m}{N} \right) \right] \right\}, \quad (30)$$

где m это число связанных лигандов из расчета на одну гибридизованную пробу pt , а μ_b^0 – химический потенциал связанного лиганда в исходном состоянии. Предполагается, что доступное количество мест связывания на дуплексе pt совпадает с длиной N . Таким образом, свободная энергия слоя с зондами запишется в виде функции от независимых величин: числа гибридизованных зондов N_{pt} и числа связанных лигандов $N_b = mN_{pt}$. Свободная энергия будет

$$G_L(N_{pt}, N_b) = G(N_{pt}) + N_b \mu_b^0 + k_B T \left[N_b \ln \left(\frac{N_b}{NN_{pt}} \right) + (NN_{pt} - N_b) \ln \left(\frac{NN_{pt} - N_b}{NN_{pt}} \right) \right]. \quad (31)$$

Равновесное состояние между лигандами, мишенями, несовместимыми последовательностями в растворе и гибридизованными зондами будет описываться следующими условиями:

$$\begin{aligned} \mu_b^1 &= \mu_i, \\ \mu_b^2 &= \mu_i, \\ \Delta\mu_{pt} &= \mu_t, \\ \Delta\mu_{pm} &= \mu_m, \end{aligned} \quad (32)$$

где μ_m является потенциалом свободных несовместимых последовательностей m . В приближении слабого раствора величину μ_m можно оценить как $\mu_m = \mu_m^0 + k_B T \ln c_m$, где величина c_m является концентрацией последовательностей m .

Изотермы гибридизации, полученные с помощью уравнения (32) показаны на Рис.8

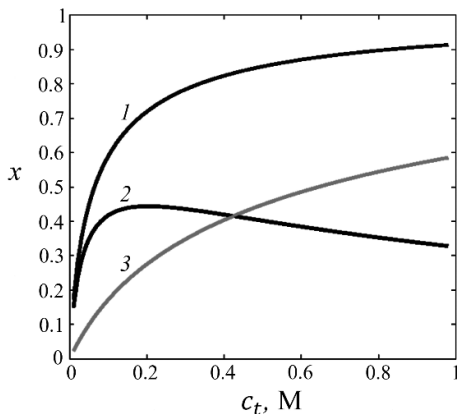


Рис.8. Зависимость степени гибридизации от концентрации мишеней. 1 – в присутствие лигандов, 2 – сдвиг изотермы гибридизации и кривая 3 – без лигандов. Результаты получены для следующих значений параметров: $l_B \approx 7\text{Å}$, $r_D \approx 3\text{Å}$, $K_T = 10^9 M^{-1}$, $\Gamma \approx 2.57$.

Для случая конкурентной гибридизации на поверхности изотермы гибридизации определяются уравнениями:

$$\frac{x}{1-x-y} = c_t \tilde{K}_t \exp\left(-\frac{N}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma}\right), \frac{y}{1-x-y} = c_m \tilde{K}_m \exp\left(-\frac{N}{k_B T} \frac{\partial \gamma_{el}}{\partial \sigma}\right) \quad (33)$$

где $\tilde{K}_t = K_t(1 - r_1^*)^{-N}$ и $\tilde{K}_m = K_m(1 - r_2^*)^{-M}$ являются перенормированными константами связывания. Если химический потенциал связанных лигандов μ_B^0 в исходном состоянии один и тот же для дуплексов pt и pm , то равновесная степень адсорбции будет $r_1^* = r_2^*$ и получим, что

$$r^* = \frac{c_t K_t}{c_t K_t + 1}, \quad (34)$$

где константа связывания лигандов имеет вид:

$$K_l = \exp\left(-\frac{\mu_B^0 - \mu_l^0}{k_B T}\right).$$

Таким образом, в случае конкурентной гибридизации на поверхности интеркаляция лигандов значительно увеличивает константы связывания мишеней и несовместимых последовательностей, вследствие чего повышается чувствительность ДНК-чипа. В то же время, влияние лигандов является более выраженным для целевых последовательностей t из-за экспоненциальной зависимости от количества мест связывания N и M для констант связывания

$$\tilde{K}_t = K_t(1 - r^*)^{-N}, \tilde{K}_m = K_m(1 - r^*)^{-M} \quad (35)$$

Данный эффект особенно важен при высоких значениях параметра $K_l c_l$, что соответствует высокой концентрации лигандов и/или большим значениям константы связывания K_l . Если количество мест связывания M для несовместимых дуплексов pm существенно отличается от количества мест связывания комплементарных дуплексов pt , то можно получить значительное увеличение селективности.

ВЫВОДЫ

1. Однонитевая РНК со случайной последовательностью нуклеотидов демонстрирует два, или три пика на температурной зависимости удельной теплоемкости, что указывает на наличие двух или трех структурных переходов.
2. Низкотемпературный пик теплоемкости соответствует холодной денатурации РНК, когда степень спиральности существенно падает при понижении температуры.
3. Коллапс однонитевой РНК сопровождается существенной перестройкой, как вторичной, так и пространственной структур и является неравновесным фазовым переходом второго рода.
4. Фазовый переход имеет место между стеклообразной фазой, где реализуется несколько вариантов третичной структуры для каждой вторичной и фазой, где одной вторичной структуре соответствует одна третичная.
5. В стеклообразной фазе вторичная структура работает как холодильник и забирает энергию из пространственных степеней свободы.
6. Связывание интеркалирующих лигандов с ДНК в растворе и на поверхности ДНК-сенсора повышает чувствительность и избирательность работы ДНК-сенсора.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Hayrapetyan G.N., Tsaturyan H.L., Tonoyan Sh.A., Mamasakhlisov Y.Sh., “Thermodynamics of Single-Stranded RNA with Random Sequence: Constrained Annealing Approach”, *Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)*, 2013, Vol. 48, No. 2, pp. 98–102.
2. Mamasakhlisov Y.Sh., Bellucci S., Hayryan Sh., Caturyan H., Grigoryan Z., Hu C.-K., “Collapse and hybridization of RNA: view from replica technique approach”, *Europhys. J. E*, 38, 100(1-9) (2015) DOI 10.1140/epje/i2015-15100-x.
3. Tsaturyan H.L., “Quenched disorder effects for the four-letter alphabet RNA”, *Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)*, 2017, Vol. 52, No. 1, pp. 85–93.
4. Tsaturyan H.L., Tonoyan Sh.A., Morozov V.F., Mamasakhlisov Y.Sh., “The effect of ligands binding on the isotherm of hybridization of the DNA-chip”, *Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)*, 2017, Vol. 52, No. 2, pp. 244–255.

ՃԱՏՈՒՐՅԱՆ ՀԱՅԿ ԼԵԿՈՆԻ

ՆՈՒԿԼԵՆՏԻԴԱՅԻՆ ՀԱԶՈՐԴԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ
ՀԵՏԵՐՈԳԵՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ՆՈՒԿԼԵՆՏԱԹԹՈՒՆԵՐԻ
ԿՈՆՖՈՐՄԱՏԻՈՆ ԱՆՑՈՒՄՆԵՐՈՒՄ:

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր. ԴՆԹ, ՌՆԹ, ԴՆԹ-չիպ, ԴՆԹ-թիրախ, փուլային անցում, միաթել ՌՆԹ, սահմանափակ թրծման մեթոդ:

Ատենախոսությունը նվիրված է նույլ երկաթթուներում կառուցվածքային անցումներին: Հետազոտության ընթացքում հաշվի են առնվել հաջորդականության հետերոգենությունը, էլեկտրոստատիկ էֆֆեկտները, երկրորդային և երրորդային կառուցվածքների ռելաքսացիաների բնութագրիչ ժամանակները: Գիտական նորամուծությունը կայանում է նոր մեթոդի մշակման մեջ, որն անալիտիկորեն վերլուծում է հաջորդականության հետերոգենության ազդեցությունը միաթել ՌՆԹ-ի թերմոդինամիկական ամանձնահատկությունների վրա: Ուսումնասիրվել են նույլ եռոտիդների երկտառ և քառատառ այբուբենները: Սղմված միաթել ՌՆԹ-ի անհավասարակշիռ հատկությունները ուսումնասիրվել են առաջին անգամ: Ատենախոսության մեջ նույնպես ուսումնասիրվել է ինտերկալացիոն և իգանդների ազդեցությունը ԴՆԹ-զոնդերի և ԴՆԹ-թիրախների մակերևութային հիբրիդիզացիայի վրա:

Մշակվել է անալիտիկ տեսություն և, որը նկարագրում է նույլ եռոտիդների պատահական հաջորդականության միաթել ՌՆԹ-ի թերմոդինամիկական հատկությունները: Ուսումնասիրվել են երկտառ և քառատառ այբուբենները: Սահմանափակ թրծման մոտեցման հիման վրա մշակված է եղել տեսություն և, որը թույլ է տալիս ստանալ համակարգի ազատ էներգիայի և ավագույն ստորին գնահատականը: Առաջարկվող մոտեցումը վարիացիոն է: Ստացվել են միաթել ՌՆԹ-ի բնութագրիչների (պարուրության աստիճան, էներոպիա, ջերմունակություն) ջերմաստիճանային կախվածությունները: Ստացված անալիտիկ արդյունքները և ավ համընկնում են տալիս թվային արդյունքների հետ, որոնք ստացվել են ՄաքԿասկիլի ավգորիթի միջոցով:

Մի աթել ՌՆԹ-ի ջերմային հալուվը նկարագրվել է պարունություն աստիճանի, տեսակարար ջերմունակություն ունեցող և ոչ ձեռնտու կապերի ֆրակցիաների միջոցով: Պատահական երկտառ նուկլեոտիդային հաջորդականությամբ մի աթել ՌՆԹ-ի տեսակարար ջերմունակություն ջերմաստիճանային կախվածությունը դրսևորում է երկու պիկ, ինչպես միևնույն տեսակի նուկլեոտիդների միջև ձգողության և վանողության, այնպես էլ երկու տեսակների տարբեր տոկոսային չափաբաժինների համար:

Միևնույն ժամանակ պատահականորեն գետերացված հաջորդականությամբ մի աթել ՌՆԹ-ի տեսակարար ջերմունակություն ջերմաստիճանային կախվածությունը դրսևորում է երկու կամ երեք պիկ, կախված փոխազդեցության պարամետրերից և նուկլեոտիդների կազմից: Ցածր ջերմաստիճանային հալման սցենարը նույնպես հնարավոր է ստանալ փոխազդեցության պարամետրերի որոշակի տիրույթի համար: Տույց է տրվել հնարավոր կապը մի աթել ՌՆԹ-ի ցածր ջերմաստիճանային կառուցվածքային անցման և ցածր ջերմաստիճանային հալման միջև, որը դիտվում է փորձերի ընթացքում:

Մի աթել ՌՆԹ-ի տարածական և երկրորդային կառուցվածքների միջև կապը հետազոտվել է խիտ փաթեթավորված մի աթել ՌՆԹ-ի համար: Ռեպլիկաների մեթոդը օգտագործվել է ՌՆԹ-ի մոլեկուլի մոդելի կինետիկան ուսումնասիրելու համար: Դիտվել է երկրորդ կարգի անհավասարակշիռ փուլային անցում ապակենման կառուցվածքի և ազատ ֆլուկտուացիա կատարող կառուցվածքների խմբի միջև: Նույնպես ուսումնասիրվել է անհավասարակշիռ ստացիոնար վիճակը և գնահատվել են համակարգի թերմոդինամիկական բնութագրիչները: Քննարկվել է ջերմունակության անհավասարակշիռ վարքը: Հիմնվելով մեր վերլուծության վրա, ցույց է տրվել կինետիկական ուղու վրա այն վիճակը, որում գտնվելիս ՌՆԹ-ի մոլեկուլը ամենաշատն է ենթարկվում հիբրիդիզացիայի:

Ուսումնասիրվել է ԴՆԹ-չիպի մակերևույթի վրա ամրացված մի աթել ԴՆԹ-գոնդերի և լուծույթում ցածրամոլեկուլային միացությունների (լիզանդների) և անհամապատասխան հաջորդականությունների հետ լուծված թիրախային ԴՆԹ-ների միջև հիբրիդիզացիան: Գնահատվել է ԴՆԹ-սեսուորի ազատ էներգիան և հաշվարկվել են համապատասխան քիմիական պրոտեսցիալները գոնդերի, թիրախների, հիբրիդիզացված

կոմպլեքսների և լիգանդների համար: Օգտագործելով այս թերմոդինամիկական բնութագրիչները, ստացվել է հիբրիդիզացիայի իզոթերմը: Վերլուծվել է ինտերկալյացիոն լիգանդների դրական ազդեցությունը ԴՆԹ-չիպերի զգայունության և սելեկտիվության վրա: Այդ վերլուծության ընթացքում հաշվի են առնվել հիբրիդիզացիայի ոչ մրցակցային և մակերևույթին մրցակցային սցենարները:

TSATURYAN HAYK LEVON

NUCLEOTIDE SEQUENCE HETEROGENEITY AT THE
CONFORMATIONAL TRANSITIONS IN NUCLEIC ACIDS

SUMMARY

Key words: DNA, RNA, DNA chip, DNA target, phase transition, ssRNA, constrained annealing approach.

The dissertation is devoted to investigation of structural transitions in nucleic acids. The scientific novelty consists in development of the method, addressing analytically the effect of sequence heterogeneity on the thermodynamic features of the single – stranded RNA. The two – and four – letter nucleotides alphabet is considered. The non – equilibrium features of the collapsed single – stranded RNA are also considered for the first time. The thesis is also addressed the effect of intercalating ligands on the surface hybridization of the DNA probes and targets.

The analytical theory describing the thermodynamic properties of single-stranded RNA with a random sequence of nucleotides was developed. The two – and four – letter alphabets were considered. The developed theory is based on the constrained annealing variational approach. The temperature dependence of the such a characteristics of the single-stranded RNA as the helicity degree, entropy and heat capacity was obtained using the calculated free energy. The obtained analytical results are in a good agreement with the numerical ones, which were obtained using McCaskill algorithm.

The temperature - induced melting of single-stranded RNA was described in terms of temperature dependence of helicity degree, specific heat and fractions of favorable and unfavorable contacts. Single-stranded RNA with random two - letter nucleotide sequence shows two peaks in the temperature dependence of the specific heat of the system both for the attraction and repulsion between the same type of nucleotides and also for various percentages of the two types of nucleotides.

At the same time, the single – stranded RNA with randomly generated four - letter nucleotide sequence shows two or three peaks in the temperature dependence of the specific heat in dependence on the interaction parameters and nucleotide composition. The cold denaturation scenario is also available for the definite range of the interaction parameters. Possible connection between the low-temperature structural transition and cold denaturation of single-stranded RNA, which is observed experimentally, was demonstrated.

The interplay between the spatial and secondary structure of the single – stranded RNA is analyzed for the compactly packed single – stranded RNA. The replica technique method is applied to investigate the kinetic behavior of the coarse-grained model for the RNA molecule. A non-equilibrium phase transition of second order between the glassy phase and the ensemble of freely fluctuating structures has

been observed. The non-equilibrium steady state is investigated as well and the thermodynamic characteristics of the system have been evaluated. The non – equilibrium behavior of the specific heat is discussed. Based on our analysis, we point out the state in the kinetic pathway in which the RNA molecule is most prone to hybridization.

The hybridization of the single – stranded probe DNAs, immobilized on the surface of DNA – chip with the target DNAs dissolved in the solution, containing low – molecular compounds (ligands) and mismatched sequences is addressed. The free energy of the DNA – sensor is estimated and the appropriate chemical potentials for the probes, targets, hybrid complexes and ligands are calculated. The isotherm of hybridization is obtained using these thermodynamic characteristics. The positive effect of the intercalating ligands on the DNA – chip sensitivity and selectivity is analyzed, considering non – competing and surface – competing hybridization scenarios.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, located in the lower right quadrant of the page.