

На правах рукописи

Рахметова Светлана Юрьевна

СОЗДАНИЕ ВЫСОКОАФФИННЫХ ГЕТЕРОДИМЕРНЫХ
ФОТОАПТАМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ К ТРОМБИНУ

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Радько Сергей Павлович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Ипатова Ольга Михайловна

доктор биологических наук, профессор
Карпухин Александр Васильевич

Ведущая организация: Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН

Защита состоится «21» октября 2010 года в 11.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.010.01 при Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН по адресу: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН.

Автореферат разослан «___» сентября 2010 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Е.А.Карпова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Широкомасштабный экспериментальный и биоинформационный анализ, выполненный в прошедшее десятилетие, создал огромный массив протеомных данных, позволивших идентифицировать тысячи потенциальных белковых маркёров различных онкологических заболеваний (Polanski M. et al., 2006). Как ожидается, подавляющее большинство потенциальных белковых маркёров онкопатологии может присутствовать в крови в концентрациях ниже 10^{-15} М (Archakov A.I. et al., 2007). Однако чувствительность существующих сегодня методов иммунохимического анализа за редким исключением не выходит за пикомолярные концентрации, что во многом определяется ограниченной аффинностью моноклональных антител (Jackson T.M. et al., 1986; Foote J. et al., 1995; Houk K.N. et al., 2003; Ling M.M. et al., 2007). Таким образом, задача исследования клинической значимости белковых маркёров и последующее создание тест-систем делает актуальным разработку новых подходов к детекции белка, присутствующего в сложной биологической жидкости (плазма или сыворотка крови) в ультранизких концентрациях.

Один из возможных подходов к решению проблемы измерения ультранизких концентраций белка (менее 10^{-15} М) состоит в повышении аффинности и селективности аффинных реагентов. Особый интерес представляют аффинные реагенты, позволяющие получать необратимые комплексы, «фиксируя» их путём образования ковалентной связи (Chmura A.J. et al., 2001; Gander T.R. et al., 2005; Holm L. et al., 2009). Прямой подсчёт числа таких комплексов с помощью так называемых «молекулярных счётчиков», работающих на принципах сканирующей атомно-силовой и ближнепольной оптической микроскопии, делает возможным детекцию белка, присутствующего в концентрациях ниже 10^{-15} М (Archakov A.I. et al., 2007; Ivanov Y.D. et al., 2006). При этом переход от обратимого к необратимому (ковалентному) специфическому связыванию приводит к понижению концентрационного предела детекции на несколько порядков (Archakov A.I. et al., 2009).

Среди аффинных реагентов, способных формировать ковалентные комплексы с мишенью, наиболее перспективными с точки зрения практического применения являются «фотоаптамеры», представляющие особый класс аптамеров (Gander T.R., 2005; Petach H., 2004). Аптамеры представляют олигонуклеотиды с высоким сродством к заданной мишени, отбираемые методом селекции *in vitro* в комбинаторных библиотеках нуклеотидных последовательностей (Jayasena S.D., 1999). Использование библиотек, состоящих из олигонуклеотидов с галогенсодержащими основаниями, позволяет получать «фотоаптамеры» с помощью отбора одновременно по аффинности и по способности образовывать фотоиндуцированные ковалентные связи (фотосшивки) селективно с белком-мишенью (Golden M.C. et al., 2000; Smith D. et al., 2003). В отличие от таких аффинных реагентов, как Fab и аффитела, где придание способности к образованию ковалентных

комплексов с молекулярной мишенью не всегда возможно и требует знания структуры комплекса с мишенью (Chmura A.J. et al., 2001; Holm L. et al., 2009), фотоаптамеры могут быть получены практически к любому белку без знания о структуре комплекса (Gander T.R. et al., 2005).

Опубликованные экспериментальные данные указывают на существование корреляции между аффинностью фотоаптамера к белку-мишени и выходом ковалентных комплексов (Bock C. et al., 2004; Smith D. et al., 2003). Однако селекция одновременно по двум параметрам (аффинности и способности формировать фотосшивки) ведёт в общем случае к отбору олигонуклеотидов с более низким сродством, чем при селекции только по аффинности. Это требует разработки подходов к повышению аффинности фотоаптамеров с целью создания высокоэффективных аффинных реагентов для измерения ультранизких концентраций белка.

Аффинность аптамеров может быть значительно усилена, используя молекулярное конструирование. В процессе химического синтеза аптамерные последовательности могут быть легко объединены в единую полинуклеотидную цепь. Это позволяет создавать «линейные» аптамерные конструкции, где аптамерные последовательности соединены либо нуклеотидными линкерами, либо линкерами ненуклеотидной природы (Davis K.A. et al., 1996; Lin Y. et al., 1997; Ringquist S. et al., 1998; Umehara T. et al., 2005; Müller J. et al., 2007; Hasegawa H. et al., 2008; Kim Y. et al., 2008; Tian L. et al., 2009). Особый интерес представляют гетеродимерные конструкции, содержащие два аптамера, узнающих разные участки поверхности одного белка. Такие конструкции показали в целом усиление аффинности и/или функциональной активности по отношению к белку-мишени по сравнению с исходными аптамерами (Umehara T. et al., 2005; Müller J. et al., 2007; Hasegawa H. et al., 2008; Kim Y. et al., 2008; Tian L. et al., 2009).

Можно предположить, что объединение фотоаптамера и аптамера, узнающих разные участки поверхности белка-мишени, в гетеродимерную фотоаптамерную конструкцию также приведёт к созданию аффинного реагента с улучшенными характеристиками. В настоящее время известны аптамер и фотоаптамер к тромбину, взаимодействующие с разными поверхностными сайтами белка. Их использование в качестве модельной системы даёт возможность экспериментально проверить, приведёт ли объединение аптамера и фотоаптамера в фотоаптамерную гетеродимерную конструкцию к значимому с практической точки зрения понижению концентрационного предела детекции ковалентных комплексов.

Цель и задачи исследования

Целью работы является экспериментальное обоснование возможности понизить концентрационный порог формирования ковалентных комплексов фотоаптамера с белком-мишенью путём включения фотоаптамера в гетеродимерную аптамерную конструкцию, используя аптамеры и фотоаптамеры к тромбину как модельную систему.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Синтезировать гетеро- и гомодимерные конструкции анти-тромбиновых аптамеров с длиной политимидинового линкера, варьирующей в широком диапазоне. Исследовать их взаимодействие с тромбином на оптическом биосенсоре Biacore-3000 для нахождения длины линкера, обеспечивающей максимальную аффинность.
2. Синтезировать 5-йод-урацил- и 5-бром-урацил-содержащие антитромбиновые фотоаптамеры и провести сравнительный анализ их способности формировать фотоиндуцированные ковалентные комплексы с тромбином.
3. Синтезировать антитромбиновые гетеродимерные фотоаптамерные конструкции с длиной политимидинового линкера, оптимизированной по аффинности. Оценить выход ковалентных комплексов с тромбином в зависимости от дозы облучения ультрафиолетовым излучением и концентрации лиганд/мишень в растворе.
4. Провести анализ процесса фотоинактивации фотоаптамеров и фотоаптамерных гетеродимерных конструкций.

Научная новизна работы

Впервые проведён сравнительный анализ аффинности гетеро- и гомодимерных аптамерных конструкций, образованных с помощью полинуклеотидного линкера, в широком диапазоне длин линкера. Впервые получены оценки термодинамических параметров взаимодействия тромбина с антитромбиновыми аптамерами и гетеродимерной аптамерной конструкцией. Впервые получен бром-урацил-содержащий фотоаптамер к тромбину. Впервые показано, что объединение фотоаптамера и аптамера в гетеродимерную конструкцию приводит к понижению концентрационного порога детекции ковалентных комплексов фотоаптамер/тромбин более чем в сто раз.

Практическая значимость исследований

Результаты, полученные в работе, могут служить отправной точкой для развития «инженерного» подхода к созданию высокоэффективных аффинных реагентов, способных формировать фотосшивки селективно с белком-мишенью. Высокоаффинные антитромбиновые аптамерные гетеродимерные конструкции представляют интерес как исходный материал для создания антикоагулянтов нового поколения. Полученные линейные гетеродимерные фотоаптамерные конструкции будут использованы при разработке подхода к количественному определению белка с помощью «молекулярных счётчиков».

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были доложены на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), на IV Международной конференции «Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine» (Москва, 2008), на VI Международной конференции «Bioinformatics of genome regulation and structure» (Новосибирск, 2008), на научной конференции, посвященной 25-летию ИХБФМ СО РАН «Химическая биология. Фундаментальные проблемы

бионанотехнологии» (Новосибирск, 2009), на V Международной конференции «Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine» (Москва, 2010). Материалы диссертации представлены в 3 статьях и в 5 публикациях в материалах сборников научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3 глав раздела «Результаты и обсуждение», заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 257 источников. Работа изложена на 132 страницах текста, содержит 38 рисунков и 3 таблицы.

Исследование выполнено на базе ИБМХ РАМН в рамках научной программы РАМН «Протеомика для медицины и биотехнологии».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты и растворы

В работе использовались реактивы производства Acros Organics (Бельгия), Glen Research (США) и Sigma-Aldrich (США), качества ACS или выше. Белки были приобретены в Sigma-Aldrich, за исключением L-аспарагиназы, которая была любезно предоставлена лабораторией медицинской биотехнологии ИБМХ РАМН. Концентрацию раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) определяли спектрофотометрически, исходя из известного коэффициента экстинкции: $E_{1\%}^{1\text{см}} = 6,67$ на 280 нм (Simonian M.H. et al., 2006). Концентрации растворов других белков определяли методом Брэдфорд, используя растворы БСА как стандарт. Концентрацию растворов олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически (1 О.Е. при 260 нм и оптическом пути 1 см соответствует 33 мкг/мл). Перед использованием растворы олигонуклеотидов инкубировали в течение 5 мин при 95°C и быстро охлаждали во льду.

Синтез и очистка олигонуклеотидов

Олигонуклеотиды синтезировали на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, г. Новосибирск, Россия) в направлении от 3'- к 5'-концу методом твёрдофазного синтеза в соответствии со стандартными протоколами фирмы-производителя. При синтезе биотинилированных и галоген-содержащих олигонуклеотидов в протоколы синтеза были внесены изменения в соответствии с рекомендациями фирмы-поставщика фосфоамидитов (www.glenresearch.com). Олигонуклеотиды длиной до 50 нт деблокировали (удаление 5'-концевой диметокситритильной группы) и очищали на установке OPS-201 (Биоссет, Новосибирск) с использованием хроматографии на обращенной фазе в соответствии со стандартными протоколами фирмы-производителя. Олигонуклеотиды длиной более 50 нт деблокировали на синтезаторе и очищали с помощью электрофореза в 12% геле в денатурирующих условиях (7 М мочевины). Хранились олигонуклеотиды в виде водного раствора при -20°C до использования. Обозначения и последовательности использованных в

работе олигонуклеотидов приведены в таблице 1. В приведённых последовательностях «В» указывает биотин, NH₂ – аминогруппа, dN – случайный нуклеотид.

Таблица 1. Обозначения и последовательности олигонуклеотидов.

A1	B-5'-TCAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'
A2	B-5'-ATGTCTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG-3'
A1(35)	B-5'-TCAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-poly(dT) ₃₅ -3'
(35)A2	B-5'-poly(dT) ₃₅ -CTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG-3'
N30	5'-poly(dN) ₃₀
N74	5'-poly(dN) ₇₄
A1(n)A2	B-5'-TCAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-poly(dT) _n -CTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG-3'
A2(n)A1	B-5'-ATGTCTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG- poly(dT) _n -AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'
A1(n)A1	B-5'-TCAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT- poly(dT) _n -AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT -3'
A2(n)A2	B-5'-ATGTCTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG- poly(dT) _n -CTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG-3'
G15(Br)	5'-GGTTGGTGTGG(5-BrdU)TGG-3'
pG(Br)	5'-GG-(5-BrdU)GG-3'
pT(Br)	5'-TT(5-BrdU)TT-3'
A1Ph(I)	5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-IdU)TGGGGTGACT-3'
A1Ph(Br)	5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-BrdU)TGGGGTGACT-3'
A1Ph(I)L1	5'-AACAGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-IdU)TGGGGTGACT-3'
A1Ph(I)L1-B	B-5'-AACAGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-IdU)TGGGGTGACT-3'
A1Ph(I)L2	5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-IdU)TGGGGTGACTTCGTGGA-3'
A1Ph(I)L2-NH ₃	5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-IdU)TGGGGTGACTTCGTGGA-3'-NH ₃
A1Ph(I)L1/L2	B-5'-AACAGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-IdU)TGGGGTGACTTCGTGGA-3'-NH ₃
A1Ph(I)-G15	5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-IdU)TGGGGTGACT- poly(dT) ₃₅ -GGTTGGTGTGGTTGG-3'
A1Ph(Br)-A2	5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-BrdU)TGGGGTGACT- poly(dT) ₃₅ -CTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG-3'
A1Ph(I)L1/L2-A2	B-5'-AACAGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-IdU)TGGGGTGACTTCGTGGA-poly(dT) ₃₅ -CTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG-3'-NH ₃

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ олигонуклеотидов и пептидов проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker, Германия). При анализе олигонуклеотидов в качестве матрицы использовали водный раствор 3-гидроксипиколиновой кислоты (10 мг/мл) и

диаммониумгидрогенцитрата (1 мг/мл). Масс-спектрометрический анализ пептидов проводили, используя в качестве матрицы α -циано-4-гидрокси-В-фенилакриловую кислоту (10 мг/мл), растворённую в водном растворе этанола и ацетонитрила (50% и 30%, соответственно). Полученные масс-спектры обрабатывали с помощью программы FlexAnalysis (Bruker, Германия). Набор масс пептидов анализировали с помощью поисковой программы MASCOT Peptide Mass Fingerprint (www.matrixscience.com).

Измерение аффинности антитромбиновых аптамеров и их димерных конструкций на оптическом биосенсоре Biacore 3000

Эксперименты по исследованию взаимодействия аптамеров с белками выполняли на 4-х канальном оптическом биосенсоре Biacore 3000 (GE, США), принцип детекции которого основан на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (Rich R.L. *et al.*, 2000; Majka J. *et al.*, 2007). Измерения проводили при 37°C с использованием стандартных протоколов фирмы-производителя. При проведении термодинамического анализа температуру варьировали в интервале от 10°C до 40°C. Сигнал биосенсора (в резонансных единицах, RU) регистрировался в каждом канале независимо и представлялся в виде сенсограммы, показывающей изменение во времени разницы сигналов в выбранном и референсном каналах. В качестве референсного канала служил канал, в котором не были иммобилизованы олигонуклеотиды. Обработка сенсограмм проводилась с помощью программного пакета BIAevaluation v.4.1 (GE, США). В работе использовались оптические чипы типа SA (GE, США), несущие на рабочих поверхностях иммобилизованный стрептавидин. Иммобилизация 5'-биотинилированных олигонуклеотидов на рабочей поверхности канала оптического чипа SA осуществлялась путём инъекции в выбранный канал биосенсора 1 мкМ раствора олигонуклеотида в буфере HBS-P, содержащем 150 мМ NaCl, 0,005% P20, 10 мМ HEPES (pH 7,4), при скорости потока 5 мкл/мин. На каждом чипе иммобилизовали три аптамерных или две аптамерных и одну контрольную олигонуклеотидные последовательности в случайных комбинациях. Для учёта возможной гетерогенности чипов, измерения для каждой аптамерной последовательности и контрольных олигонуклеотидов выполняли по крайней мере на трёх чипах.

Взаимодействие аптамер-тромбин исследовали, инжেকтируя раствор белка в различных концентрациях в буфере RA (20 мкМ БСА, 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5) при скорости потока 5 мкл/мин. Некоторые дополнительные измерения были выполнены при скорости потока 20 мкл/мин. Связывание БСА с аптамерами и аптамерными конструкциями исследовали в буфере R (100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5). Регенерацию поверхности оптического чипа проводили, пропуская 0,05% раствор SDS в течение 0,5 мин при скорости потока 50 мкл/мин. Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов тромбина с аптамерами и

димерными конструкциями вычисляли методом нелинейной регрессии, используя программный пакет VIAevaluation v.4.1, из уравнения (Majka J. et al., 2007):

$$R_{eq}/R_{max} = C / (K_D + C),$$

где R_{eq} – равновесный сигнал биосенсора при данной концентрации тромбина, R_{max} – максимальный сигнал биосенсора при данном количестве иммобилизованных олигонуклеотидов; C – концентрация тромбина в растворе; K_D – кажущаяся равновесная константа диссоциации. Для вычислений K_D использовали значения R_{eq} , полученные из сенсограмм для 7 и более концентраций тромбина.

Облучение комплексов фотоаптамер/тромбин

Комплексы фотоаптамер/тромбин формировали, смешивая растворы фотоаптамера или фотоаптамерных конструкций с раствором тромбином в эквимольных концентрациях в буфере R. Смеси инкубировали при 37°C в течение 30 мин, после чего помещали в кварцевую кювету и подвергали воздействию УФ-излучения с длиной волны 308 нм, используя эксимерный лазер CL-5000 (Оптосистемы, г. Троицк, Россия). Облучение проводили на воздухе при комнатной температуре в 0,5 мл кювете с оптическим путём 1 см. Мощность излучения составляла 10 мДж/импульс, частота – 10 Гц. Облучённые пробы при необходимости концентрировали ультрафильтрацией, используя микроконцентраторы Microcon YM-3.

Электрофоретический анализ облучённых комплексов фотоаптамер/тромбин

Облучённые и необлучённые пробы анализировали с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза в TBE-буфере в присутствии 7 М мочевины, используя 8% и 12% гели (Рис. 1А). Полосы, соответствующие олигонуклеотидам, визуализировали сканированием гелей на флуоресцентном сканере Typhoon 9400 (Amersham Biosciences, США) на длинах волн 488 нм (возбуждение) и 526 нм (эмиссия) после окраски флуоресцентным красителем SYBR Green I (Invitrogen, США). Суммарное количество олигонуклеотидов, наносимое на дорожку геля, составляло 300, 60 или 30 нг. Электрофореграммы анализировали с помощью программы ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences), позволяющей представлять полосы в виде пиков и вычислять в условных единицах флуоресценции их площади (Рис. 1Б). Поскольку флуоресцентный сигнал для свободных фотоаптамеров (пик 1) при нанесении 300 нг на дорожку лежал в нелинейной области, то оценку относительного количества фотоаптамеров, необратимо связанных с белком, F (%), проводили с использованием площади пика 1 при нанесении 30 или 60 нг ($S1^*$), по формуле: $F = [S2/(S2+n \cdot S1^*)] \cdot 100\%$, где $S2$ - площадь пика при нанесении 300 нг, n равно 10 или 5.

Трипсинолиз белка в ковалентном комплексе с фотоаптамером

Анализ белка, находящегося в полосе, отнесённой к ковалентным комплексам олигонуклеотид/тромбин, проводили, используя метод трипсинолиза белка в геле, предложенный Shevchenko A. et al. (Shevchenko A. et al., 1996).

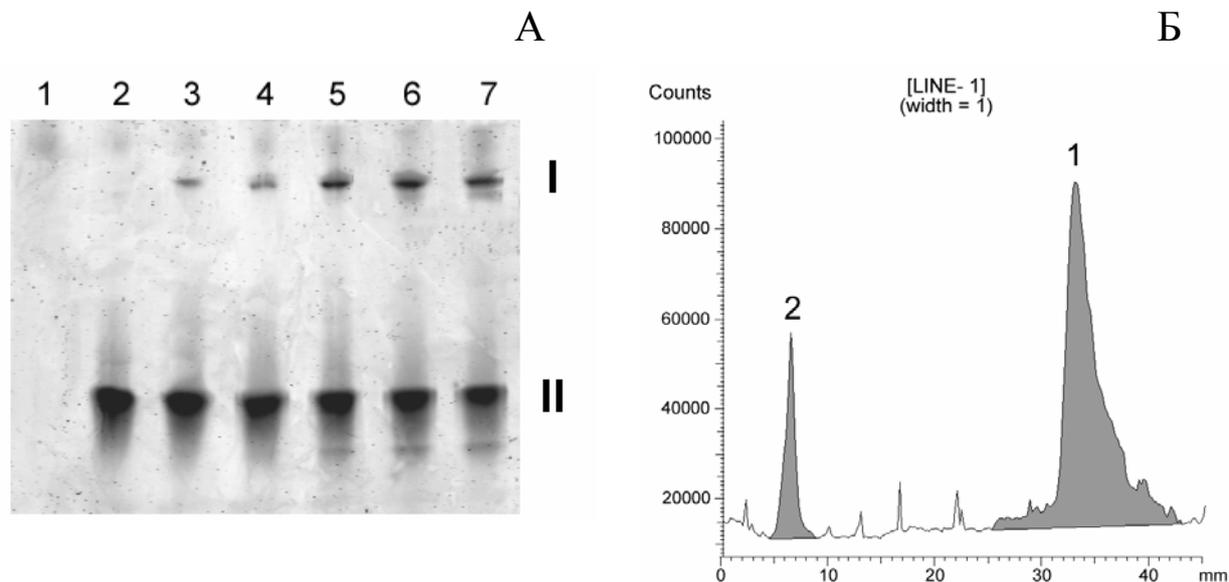


Рис. 1. Типичный результат электрофоретического анализа УФ-облучённых и необлучённых смесей тромбина с фотоаптамерами и фотоаптамерными конструкциями. Панель А: Гетеродимерная конструкция A1Ph(I)L1/L2-A2. 1 – тромбин; 2 – необлучённый комплекс; 3, 4, 5, 6 и 7 – облучение 100, 200, 400, 800 и 1200 импульсами, соответственно. Эквимольная смесь, концентрация тромбина 0,75 мкМ. Область 1 – полоса, появляющаяся после облучения комплексов; область 2 – полоса, соответствующая аптамерам. Панель Б: Типичный результат сканирования дорожки геля на флуоресцентном сканере. Пик 1 соответствует полосе области 2, пик 2 – полосе области 1, появившейся после облучения комплексов аптамер/тромбин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор пары аптамеров и создание димерных конструкций антитромбиновых аптамеров

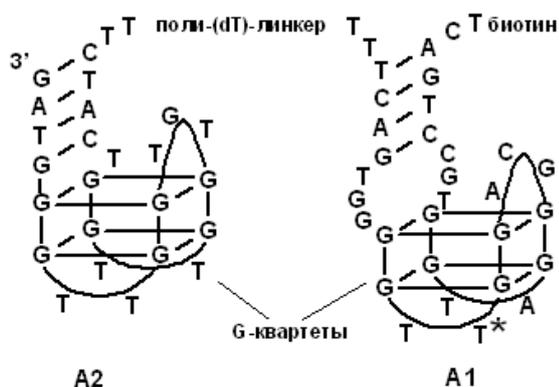
Антитромбиновые аптамеры представляют удобную модель для изучения свойств гетеро- и гомодимерных аптамерных конструкций, так как они взаимодействуют с двумя анион-связывающими участками поверхности тромбина, расположенными приблизительно на противоположных сторонах белковой молекулы и известными как экзосайты 1 («фибриноген-узнающий сайт») и 2 («гепарин-связывающий сайт») (Macaya R.F. et al., 1995; Raborsky L.R. et al., 1993; Tasset D.M. et al., 1997; Tsiang M. et al., 1995; Wu Q. et al., 1992). Дополнительно, один из анти-тромбиновых аптамеров был конвертирован в фотоаптамер, способный формировать фотоиндуцированную ковалентную связь с фенилаланиновым остатком, принадлежащим экзосайту 2 тромбина (Tasset D.M. et al., 1997). Используя анти-тромбиновый фотоаптамер, можно создать фотоаптамерные гетеродимерные конструкции и изучить их свойства.

В качестве одного из аптамеров для создания димерных аптамерных и фотоаптамерных конструкций был выбран аптамер A1 и его фотоактивный аналог A1Ph(I). Последовательность аптамера A1, выделенная жирным шрифтом (Табл. 1), идентична последовательности аптамера 60-18, взаимодействующего с экзосайтом 2 тромбина (Tasset

D.M. et al., 1997). Два нуклеотида на 5'-конце (выделены курсивом) были добавлены как дополнительный гибкий линкер между биотином и аптамерной последовательностью 60-18. Наличие подобных дополнительных линкеров, как правило, улучшает связывание тромбина с иммобилизованными аптамерами (Ostatna V. et al., 2008). Последовательность фотоаптамера A1Ph(I) (Табл. 1) идентична последовательности фотоаптамера, полученного Tasset et al. из аптамера 60-18 (Tasset D.M. et al., 1997), и отличается от последовательности аптамера A1 отсутствием нуклеотидов «линкера» и заменой одного из тимидинов на 5-IdU.

В качестве второго аптамера был выбран аптамер A2 (Табл. 1). Последовательность A2 состоит из последовательности, идентичной последовательности аптамера G15, узнающего экзосайт 1 тромбина (Paborsky L.R. et al., 1993; Tsiang M. et al., 1995; Wu Q. et al., 1992), двух фланкирующих последовательностей, способных формировать дуплекс (выделены подчеркиванием) и 4-х нуклеотидов, добавленных с 5'-конца как дополнительный гибкий линкер (выделены курсивом). Модификация G15 путём добавления дуплексной части была сделана по аналогии с антитромбиновыми аптамерами, полученными Mасауа et al. (Mасауа R.F. et al., 1995). Наличие дуплексной части у аптамеров, полученных Mасауа et al., существенно понижало (в 4-10 раз) K_D комплексов аптамер/тромбин.

Димерные конструкции антитромбиновых аптамеров были получены путем объединения двух аптамерных последовательностей в единую полинуклеотидную цепь в процессе химического синтеза с помощью политимидинового линкера различной протяжённости, от 5 до 65 нт. Предполагаемая структура гетеродимерной конструкции



представлена на Рис. 2. Гетеродимерные аптамерные конструкции обозначаются как A1(n)A2 или A2(n)A1 в зависимости от порядка аптамеров в цепи в направлении от 5'-к 3'-концу, гомодимерные – как A1(n)A1 и A2(n)A2. Число в скобках, n, означает длину политимидинового линкера в нт (Табл. 1).

Рис. 2. Схематическое изображение гетеродимерной аптамерной конструкции

Аффинность гомо- и гетеродимерных конструкций анти-тромбиновых аптамеров

На Рис. 3 представлены типичные сенсограммы, отражающие взаимодействие тромбина с иммобилизованными аптамерами, их димерной конструкцией и контрольными олигонуклеотидами. Наблюдается быстрый рост сигнала, отражающий связывание тромбина с аптамерами или аптамерными конструкциями, с последующим выходом на плато, что соответствует значению равновесного сигнала биосенсора при данной концентрации

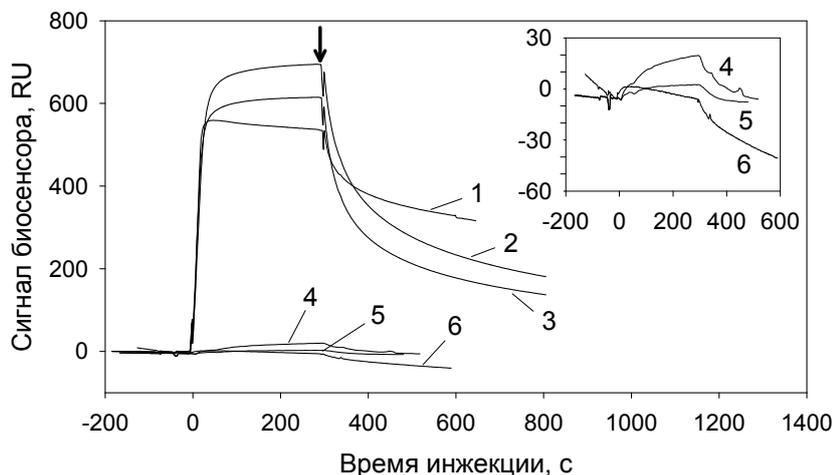


Рис. 3. Типичные сенсограммы. Взаимодействие тромбина и БСА с иммобилизованными олигонуклеотидами. Скорость потока – 5 мкл/мин. Кривые 1, 2, 3, 4 и 5: взаимодействие тромбина с A1(25)A2, A1, A2, 74N и 30N, соответственно. Тромбин в буфере RA. Концентрация тромбина – 100 нМ. Кривая 6: взаимодействие БСА с аптамером A2. БСА в буфере R. Концентрация БСА – 20 мкМ.

Нулевое время – начало инъекции раствора белка после уравнивания оптического чипа биосенсора буфером. Стрелкой показано окончание инъекции раствора белка и начало инъекции буфера. На вставке представлены кривые 4, 5 и 6 в увеличенном масштабе.

тромбина, R_{eq} . Уменьшение сигнала биосенсора при последующей инъекции буфера RA отражает диссоциацию сформированных комплексов. Присутствие в буфере БСА улучшало характеристики связывания тромбина (предположительно благодаря уменьшению неспецифического связывания тромбина с поверхностью чипа), что проявлялось в улучшении воспроизводимости сенсограмм. При этом БСА в концентрации 20 мкМ практически не взаимодействовал с иммобилизованными аптамерами и их конструкциями как видно на примере A2 (Рис. 3, кривая 6). Не наблюдалось существенного взаимодействия тромбина с контрольными олигонуклеотидами 74N и 30N (Рис. 3, кривые 4 и 5). Аффинность гетеродимерных аптамерных конструкций A1(n)A2 увеличивалась при возрастании длины poly(dT)-линкера до 35 нт и начинала уменьшаться после 55 нт (Рис. 4). Средние значения K_D для аптамерных конструкций с оптимальной длиной poly(dT)-линкера 35-55 нт лежали в

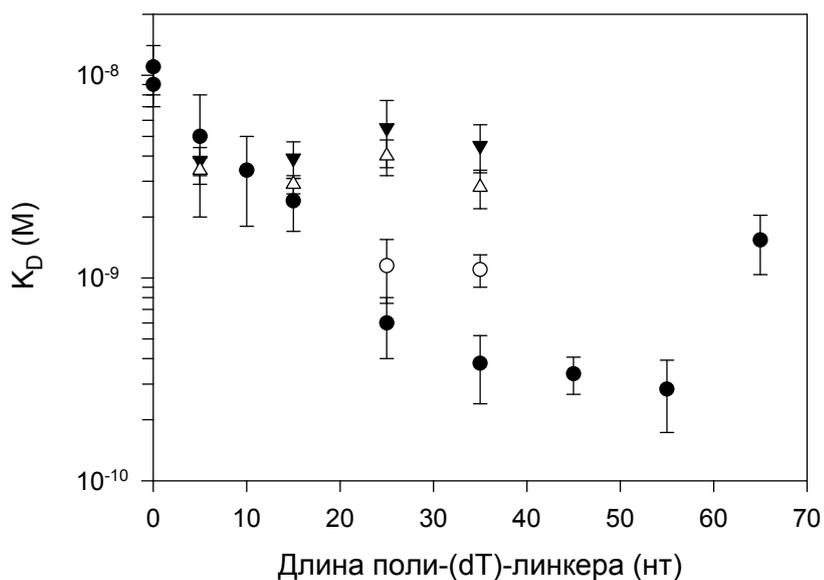
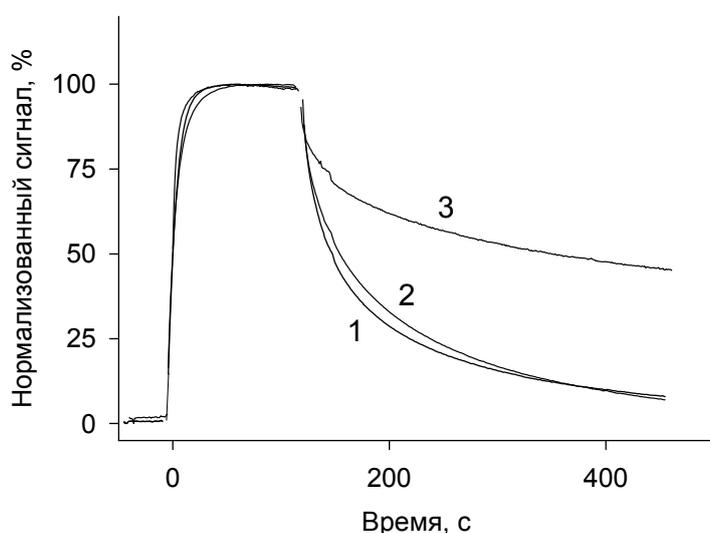


Рис. 4. Зависимость константы диссоциации, K_D , комплексов тромбина с аптамерами и аптамерными гетеродимерными конструкциями от длины poly(dT)-линкера. Темные круги соответствуют исходным аптамерам (n=0) и гетеродимерным конструкциям A1(n)A2, светлые круги – A2(n)A1. Темные треугольники – гомодимерным конструкциям A1(n)A1, светлые треугольники – A2(n)A2. Приведены среднееарифметические значения \pm среднеквадратичные отклонения, полученные из трёх и более независимых экспериментов.

интервале 0,3-0,4 нМ, что приблизительно в 30 раз меньше значений K_D для аптамеров А1 и А2 (11 и 9 нМ, соответственно). Увеличение аффинности зависело от последовательности аптамеров в конструкции по отношению к иммобилизованному концу цепи: значения K_D гетеродимерных конструкций А2(25)А1 и А2(35)А1 лежали заметно выше, чем у А1(25)А2 и А1(35)А2. Аффинность гомодимерных конструкций увеличивалась при возрастании длины poly(dT)-линкера до 35 нт всего в 2-3 раза: $K_D=(4,5\pm 1,2)$ нМ и $(2,8\pm 0,6)$ нМ для А1(35)А1 и А2(35)А2 против $(0,38\pm 0,14)$ нМ для А1(35)А2, соответственно. Политимидиновый линкер либо не влиял на взаимодействие с тромбином, либо приводил к некоторому уменьшению аффинности: $K_D=(21\pm 5)$ нМ и (7 ± 2) нМ для А1(35) и (35)А2, соответственно. Как видно из Рис. 5, скорость диссоциации комплекса тромбина с А1(35)А2 была ниже, чем скорости



диссоциации комплексов тромбина с исходными аптамерами. Это указывает на то, что комплексы тромбина с гетеродимерной конструкцией более стабильны, чем с аптамерами А1 и А2.

Рис. 5. Нормализованные сенсограммы. Значения сигнала биосенсора в момент остановки инъекции раствора тромбина приняты за 100%. Иммобилизованные олигонуклеотиды: 1 – А2, 2 – А1, 3 – А1(35)А2. Концентрация тромбина – 50 нМ. Скорость потока – 20 мкл/мин.

Данные, полученные на модели анти-тромбиновых аптамеров, показывают, что объединение аптамеров в гетеродимерные конструкции позволяет значительно увеличить аффинность при правильном подборе длины линкера. Это открывает возможность конструирования аффинных реагентов с существенно улучшенным сродством к белковой мишени, используя аптамеры как модульные блоки.

Оценка термодинамических параметров взаимодействия тромбина с анти-тромбиновыми аптамерами и их гетеродимерной конструкцией

На Рис. 6 приведены температурные зависимости равновесных констант диссоциации для аптамеров А1 и А2 и конструкции А1(35)А2. Для проведения измерений аптамеры и конструкция были иммобилизованы в разных каналах одного чипа. Температуру варьировали в интервале от 10°C до 40°C. Для каждой температуры измерения были выполнены на трёх чипах. Полученные зависимости константы диссоциации от обратной температуры, $1/T$, в полулогарифмическом масштабе имели близкий наклон как для аптамеров А1 и А2, так и конструкции А1(35)А2. При этом значения K_D для конструкции

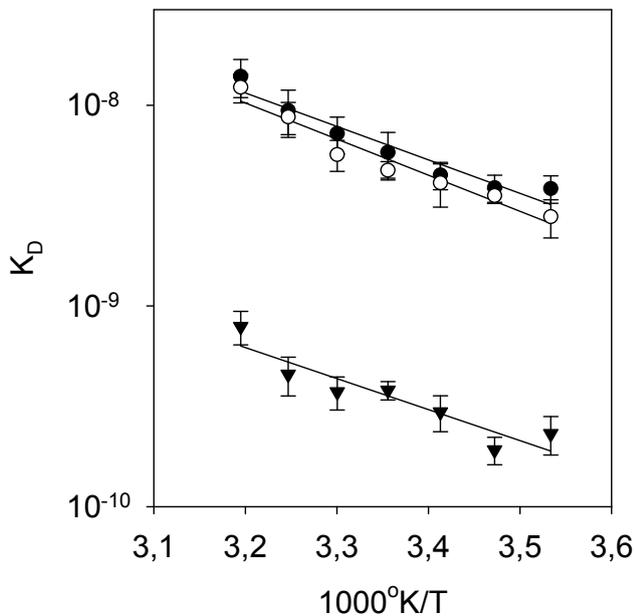


Рис. 6. Зависимость равновесной константы диссоциации от величины, обратной абсолютной температуре измерения, для комплексов тромбина с иммобилизованными аптамерами и аптамерной конструкцией. Темные круги – A1; светлые круги – A2; треугольники – A1(35)A2. Приведены среднеарифметические значения \pm среднеквадратичные отклонения, полученные из трёх независимых экспериментов.

лежат на графике существенно ниже. Величины изменений энтальпии и энтропии связывания тромбина с аптамерами A1, A2 и аптамерной конструкцией A1(35)A2 вычисляли методом линейной регрессии из

зависимостей на Рис. 21 в соответствии с уравнением изобары Вант-Гоффа:

$$\ln(K_D) = (\Delta H/R) \cdot (1/T) - (\Delta S/R),$$

где ΔH и ΔS – соответственно изменения энтальпии и энтропии реакции комплексообразования, R ($8,31 \text{ Дж} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$) – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура. Полученные оценки изменений энтальпии и энтропии формирования комплексов приведены в Табл. 2.

Таблица 2. Изменения энтальпия и энтропия реакции комплексообразования тромбина с иммобилизованными аптамерами A1 и A2 и гетеродимерной конструкцией A1(35)A2.

Лиганд	$\Delta H,$ кДж·моль ⁻¹	$\Delta S,$ Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹	t=25°C	
			-TΔS, кДж·моль ⁻¹	ΔG, кДж·моль ⁻¹
A1	-(31,6±3,3)	(49,9±12,4)	-14,9	-46,5
A2	-(34,2±2,4)	(42,5±8,3)	-12,7	-46,7
A1(35)A2	-(29,9±3,3)	(81,5±10,0)	-24,3	-54,2

Полученные оценки термодинамических параметров процесса образования комплексов тромбина с антитромбиновыми аптамерами и с их гетеродимерной конструкцией показывают, что усиление аффинности гетеродимерных конструкций полностью определяется увеличением абсолютного значения энтропийной составляющей изменения свободной энергии реакции комплексообразования.

Анти-тромбиновые фотоаптамеры и фотоаптамерные гетеродимерные конструкции.

С целью выяснить, приведёт ли замена 5-IdU в антитромбиновом фотоаптамере на его фотоактивный аналог, 5-BrdU, к сохранению способности к формированию

фотоиндуцированных ковалентных комплексов с тромбином, в данной работе были синтезированы два галоген-содержащих олигонуклеотида, A1Ph(I) и A1Ph(Br) (Табл. 1). Последовательность первого идентична последовательности анти-тромбинового фотоаптамера, полученного Tasset et al. (Tasset D.M. et al., 1997), второго – отличается от него заменой 5-IdU на 5-BrdU (Табл. 1).

Облучение смесей как A1Ph(I), так и A1Ph(Br) с тромбином приводило к появлению на геле при последующем электрофоретическом анализе медленно мигрирующей полосы, аналогичной показанной на Рис. 1А. Облучение аптамера A1 в сходных условиях не приводило к появлению дополнительных полос на геле. Относительное количество олигонуклеотидов в этой полосе нарастало с дозой, выходя на насыщение при дозе облучения около 500 импульсов (Рис. 7), что было интерпретировано как формирование фотоиндуцированных ковалентных комплексов аптамеров с тромбином. Максимальный выход фотосшивок при облучении смесей тромбина с фотоаптамерами составлял 10-12%.

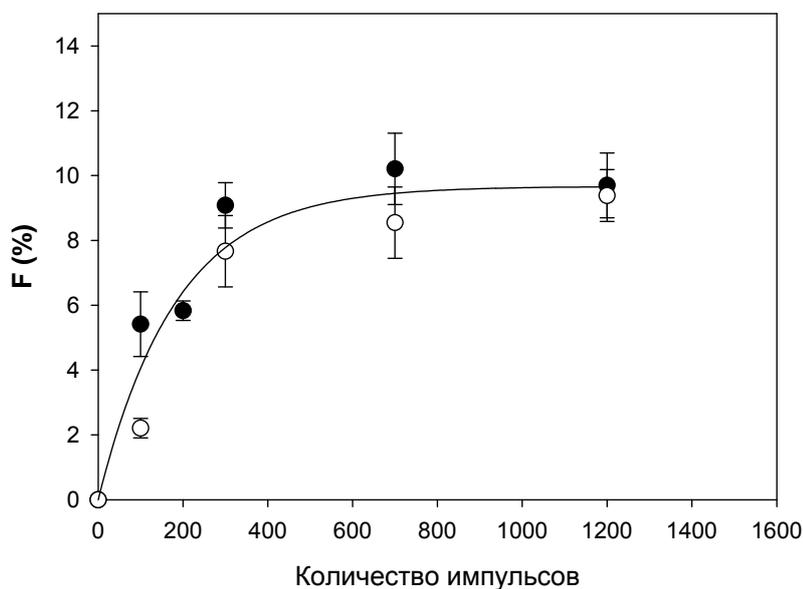
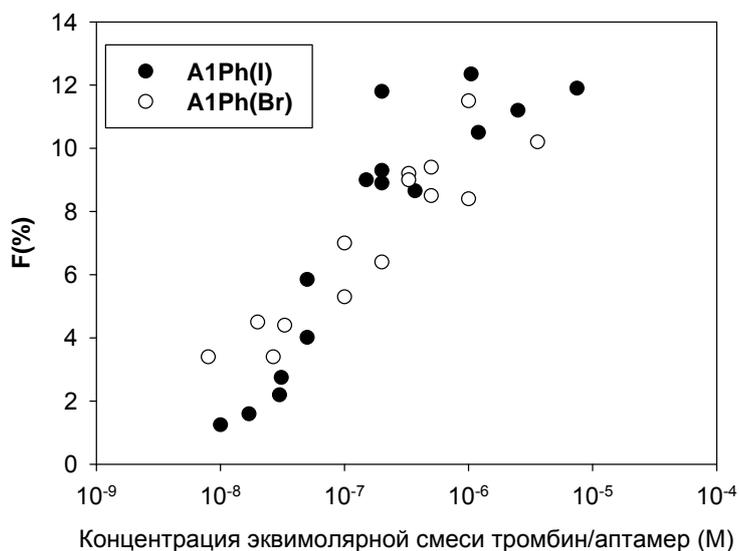


Рис. 7. Зависимость доли олигонуклеотидов, ковалентно связанных с тромбином (F), от дозы УФ-облучения. Антитромбиновые фотоаптамеры A1Ph(I) (темные круги) и A1Ph(Br) (светлые круги). Эквимолярные смеси фотоаптамер/тромбин. Концентрации тромбина 0,2 мкМ. Приведены среднеарифметические значения \pm среднеквадратичное отклонение, полученные из трёх независимых экспериментов.

На Рис. 8 представлены результаты облучения эквимолярных смесей тромбина с фотоаптамерами A1Ph(I) и A1Ph(Br) в дозе 1000 импульсов при разных концентрациях. Видно, что относительный выход ковалентных комплексов снижается по мере уменьшения концентрации компонентов смеси. Как дозовые, так и концентрационные зависимости выхода комплексов для обоих фотоаптамеров практически не отличаются. Таким образом, замена тимидина в позиции 12 антитромбинового аптамера 60-18 на 5-BrdU приводит к появлению фотоаптамера с такими же характеристиками, как и его замена на 5-IdU.

Гетеродимерные фотоаптамерные конструкции были созданы путём объединения фотоаптамерных последовательностей A1Ph(I) или A1Ph(Br) с аптамерной последовательностью A2 с помощью poly(dT)-линкера длиной 35 нт (Табл. 1). Такая длина

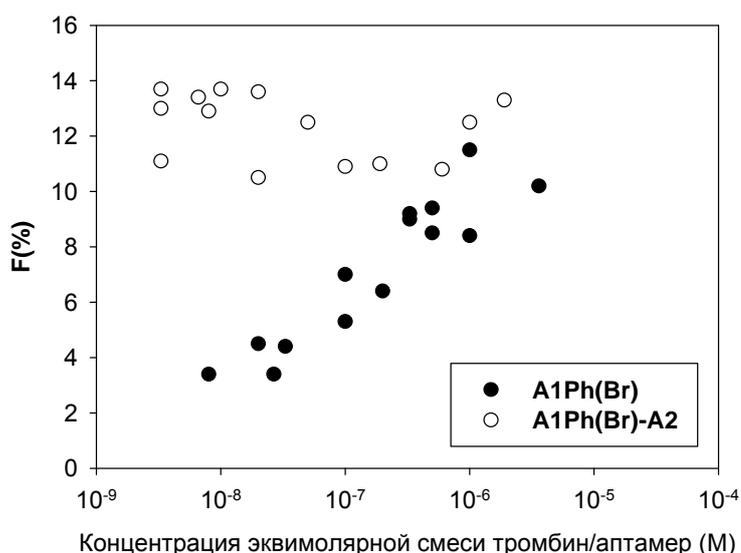


линкера была выбрана как наименьшая длина, обеспечивающая достижение нижних значений константы диссоциации комплексов тромбин/гетеродимерная конструкция (Рис. 4).

Рис. 8. Доля олигонуклеотидов в ковалентном комплексе с тромбином как функция концентрации. Фотоаптамеры A1Ph(I) и A1Ph(Br). Эквимоллярные смеси аптамер/тромбин, доза облучения – 1000 импульсов.

Как и в случае исходных фотоаптамеров, облучение эквимоллярных смесей тромбина с фотоаптамерными конструкциями приводило к появлению дополнительной медленно мигрирующей полосы на геле (полоса I, Рис. 1А), интенсивность которой нарастала с дозой облучения и выходила на плато в области 500 импульсов. На Рис. 9 представлен относительный выход фотосшивок F, для гетеродимерной фотоаптамерной конструкции A1Ph(Br)-A2 и фотоаптамера A1Ph(Br). Как можно видеть, в том диапазоне концентраций, где наблюдается падение выхода ковалентных комплексов для фотоаптамера, выход остаётся приблизительно постоянным в случае конструкции. Нижний предел исследованной концентрационной области определялся чувствительностью метода детекции олигонуклеотидов в геле с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green.

Рис. 9. Доля олигонуклеотидов в ковалентном комплексе с тромбином как функция концентрации. Фотоаптамер A1Ph(Br) и гетеродимерная фотоаптамерная конструкция A1Ph(Br)-A2. Эквимоллярные смеси аптамер/тромбин, доза облучения – 1000 импульсов.



Для того чтобы убедиться, что медленно мигрирующая полоса при электрофоретическом анализе облучённых смесей тромбина с A1Ph(Br)-A2 представлена ковалентными

комплексами белок/фотоаптамер, был проведён трипсинолиз материала, находящегося в данной полосе. Результаты масс-спектрометрического анализа продуктов трипсинолиза представлена в Табл. 3. На основе данного набора масс пептидов белок был идентифицирован как протромбин с индексом достоверности идентификации 77 (уровень статистически значимого скоринга составлял 64), используя поисковую программу Mascot.

Таблица 3. Массы пептидов и отношение сигнал/шум.

m/z	SN	m/z	SN	m/z	SN	m/z	SN
434,109	10,0	645,603	7,7	660,061	25,5	836,158	73,5
463,677	6,4	555,596	10,0	690,119	8,3	842,247	28,0
490,977	7,1	567,909	13,2	712,137	8,5	858,141	14,8
491,863	8,7	574,093	18,3	720,161	9,4	874,208	18,0
493,685	8,2	589,072	12,0	724,140	24,6	896,210	40,7
499,912	7,8	591,099	11,8	734,125	174,3	1027,204	25,4
501,027	7,8	596,089	26,2	735,101	24,1	1189,246	14,2
502,980	9,9	620,755	7,3	742,143	12,5	1194,261	70,8
504,785	14,0	638,070	151,8	756,105	36,0	1216,241	9,1
515,084	55,8	646,090	65,2	798,225	96,0	1273,291	22,2
545,062	41,7	655,820	40,7	820,202	24,1		

Сравнительный анализ выхода фотоиндуцированных ковалентных комплексов был проведён также для фотоаптамера A1Ph(I)L1/L2 и гетеродимерной конструкции A1Ph(I)L1/L2-A2. Фотоаптамер A1Ph(I)L1/L2 представляет аптамер A1Ph(I), модифицированный путём добавления к фотоаптамерной последовательности концевых нуклеотидных последовательностей (гибких линкеров), к которым присоединён биотин (с 5'-конца) и аминокислота (с 3'-конца) (Табл. 1). Такая модификация позволяет потенциально иммобилизовать фотоаптамер на поверхностях с карбоксильными группами или с ковалентно присоединённым стрептавидином. Как можно видеть на Рис. 10А, выход сшивок как для фотоаптамера, так и для конструкции также достигает насыщения при дозе облучения около 500 импульсов. Для конструкции сравнимый выход фотоиндуцированных ковалентных комплексов достигается при концентрациях эквимольной смеси на два порядка ниже, чем в случае фотоаптамера (Рис. 10Б). Таким образом, включение фотоаптамера в состав гетеродимерной конструкции существенно понижает концентрацию эквимольной смеси олигонуклеотидов с тромбином, необходимую для эффективного образования фотоиндуцированных ковалентных комплексов при заданной дозе.

Вероятно, более высокая эффективность фотоаптамерных гетеродимерных конструкций в отношении формирования фотосшивок определяется их более высокой аффинностью к белку-мишени по сравнению с исходными фотоаптамерами. Действительно, значения K_D для комплексов тромбина с иммобилизованными фотоаптамером A1Ph(I)L1/L2 и фотоаптамерной конструкцией A1Ph(I)L1/L2-A2, определённые на оптическом биосенсоре

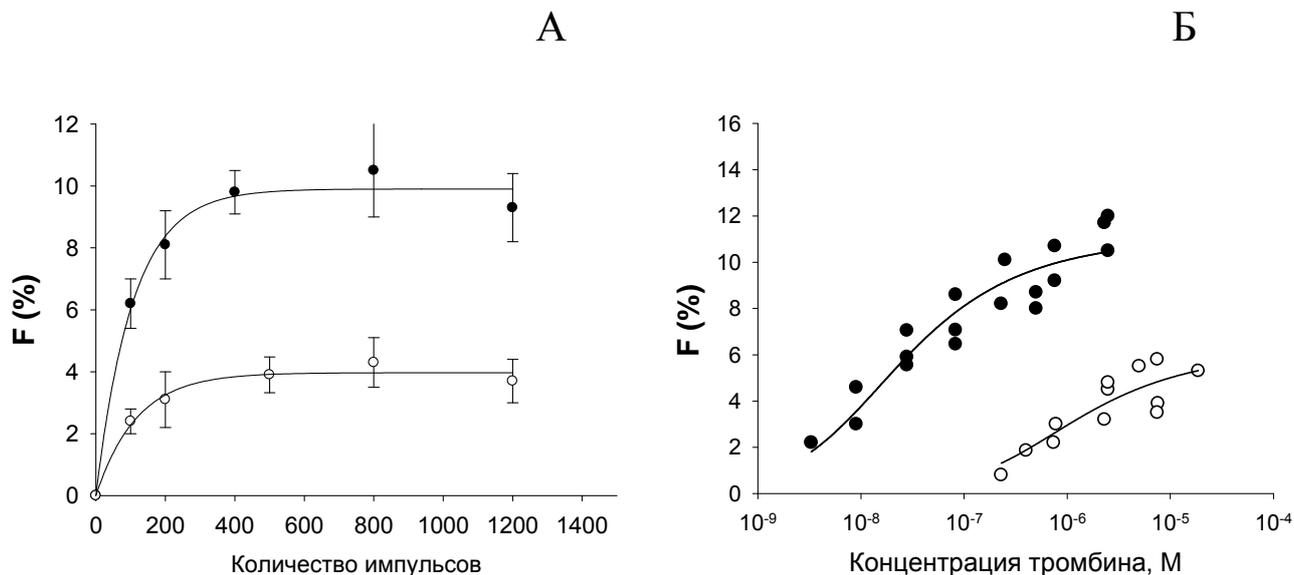


Рис. 10. Панель А: Зависимость доли олигонуклеотидов, ковалентно связанных с тромбином, F, от дозы УФ-облучения. Эквимолярные смеси фотоаптамер/тромбин. Темные символы – A1P(I)L1/L2-A2, 0,75 мкМ; светлые символы – A1Ph(I)L1/L2, 2,5 мкМ. Приведены среднееарифметические значения \pm среднеквадратичное отклонение, полученные из трёх независимых экспериментов. Панель Б: Доля олигонуклеотидов в ковалентном комплексе с тромбином как функция концентрации. Эквимолярные смеси фотоаптамер/тромбин Тёмные символы – A1P(I)L1/L2-A2, светлые символы – A1Ph(I)L1/L2. Облучение – 750 импульсов.

Viacore-3000, равнялись (190 ± 35) нМ и $(5,3 \pm 0,6)$ нМ. То, что выход фотосшивок может зависеть от аффинности фотолиганда к мишени, следует из математической модели, описывающей формирование фотосшивок между фотоаптамером и белком с учётом возможной фотоинактивации лиганда (Smith D. et al., 2003; Koch T.H. et al., 2004). Предполагается (Koch T.H. et al., 2004), что при УФ-облучении смеси аптамер/белок идут два конкурирующих процесса – образование фотосшивок и инактивация фотоаптамеров, как свободных, так и находящихся в комплексе с белком. Образующийся при облучении в результате разрыва связи между атомами брома и углерода урацил-радикал с определёнными вероятностями может атаковать дезоксирибозу или основание прилегающего нуклеотида, либо прореагировать с соответствующим аминокислотным остатком белка-мишени. Относительный выход ковалентных комплексов будет с очевидностью определяться тем, какая доля фотоаптамеров находится в комплексе с белком-мишенью при данной концентрации.

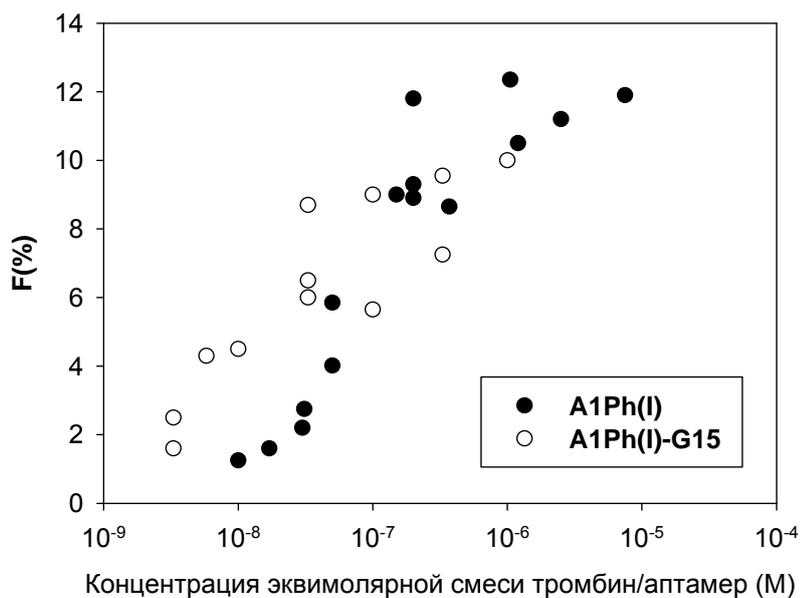
Аффинность иммобилизованного фотоаптамера A1Ph(I)L1/L2 значительно отличается от аффинности аптамера A1: средние значения K_D равны соответственно 190 и 11 нМ. При этом аптамер A1(35), имеющий дополнительный 5'-концевой политимидиновый участок длиной 35 нт (Табл. 1), характеризовался средним значением K_D , равным 21 нМ. Таким образом, наблюдаемое значительное различие в аффинности иммобилизованных аптамеров A1 и A1Ph(I)L1/L2 связано либо с наличием 5'-концевого полинуклеотидного линкера

определённой последовательности, либо с заменой тимидина на 5-IdU. Следует отметить, что ухудшение аффинности аптамеров при их конвертации в фотоаптамеры методом «перебора» вариантов замены тимидина на его фотоактивный аналог наблюдалось ранее. Так, замена одного из тимидинов на 5-йод-урацил в РНК-аптамерах к VEGF хотя и приводила к появлению фотоиндуцированных сшивок с белком-мишенью, но сопровождалась значительным понижением сродства (Ruckman J. et al., 1998).

Концентрационная зависимость выхода сшивок в случае фотоаптамера A1Ph(I)L1/L2 лежит в области концентраций, по меньшей мере на порядок превышающих концентрации, при которых наблюдается сравнимый выход фотосшивок в случае фотоаптамера A1Ph(I) (Рис. 7 и 9). Фотоаптамер A1Ph(I)L1/L2 отличается от A1Ph(I) наличием концевых полинуклеотидных линкеров с биотином и аминогруппой (Табл. 1). Для того, что бы проверить, не являются ли линкеры или концевые функциональные группы причиной наблюдаемого ухудшения эффективности формирования фотоиндуцированных комплексов, были синтезированы четыре варианта фотоаптамера A1Ph(I), различающиеся добавлением одного из линкеров с концевой группой или без неё (Табл. 1, фотоаптамеры A1Ph(I)L1, A1Ph(I)L1-B, A1Ph(I)L2, A1Ph(I)L2-NH₃). Облучение их эквимольных смесей с тромбином при заданной концентрации (0,2 мкМ) привело к приблизительно 2-кратному уменьшению выхода фотосшивок. При этом наличие биотина или аминогруппы практически не влияло на образование ковалентных комплексов. Представляется наиболее вероятным, что присутствие двух концевых линкеров является причиной понижения выхода фотосшивок. Это указывает на то, что образование фотосшивки очень чувствительно к изменениям во взаиморасположении фотоактивного основания и соответствующего аминокислотного остатка – даже возможное незначительное нарушение структуры комплекса фотоаптамер/мишень из-за появления концевых линкеров может привести к существенному понижению эффективности фотосшивания.

Поскольку объединение фотоаптамера с аптамером A2 в гетеродимерную конструкцию приводило к значительному понижению концентрационного порога детекции ковалентных комплексов с тромбином, было интересно проверить, не будет ли его объединение с аптамером G15 также приводит к понижению концентрационного порога детекции. На Рис. 11 представлены зависимости относительного выхода ковалентных комплексов от концентрации тромбина в эквимольных смесях с фотоаптамером A1Ph(I) и фотоаптамерной конструкцией A1Ph(I)-G15. Конструкция представляет полинуклеотид, где последовательности фотоаптамера A1Ph(I) и аптамера G15 соединены poly(dT)-линкером длиной 35 нт (Табл. 1). Как можно видеть, концентрационная зависимость для фотоаптамерной конструкции несколько сдвинута в область более низких концентраций по сравнению с зависимостью для фотоаптамера A1Ph(I). Однако понижение

концентрационного порога детекции ковалентных комплексов значительно меньше, чем в



случае конструкций с аптамером A2. Это может указывать на то, что аптамер A2

Рис. 11. Доля олигонуклеотидов в ковалентном комплексе с тромбином как функция концентрации. Фотоаптамер A1Ph(I) и гетеродимерная фотоаптамерная конструкция A1Ph(I) –G15. Эквимольные смеси аптамер/тромбин, доза облучения – 1000 импульсов.

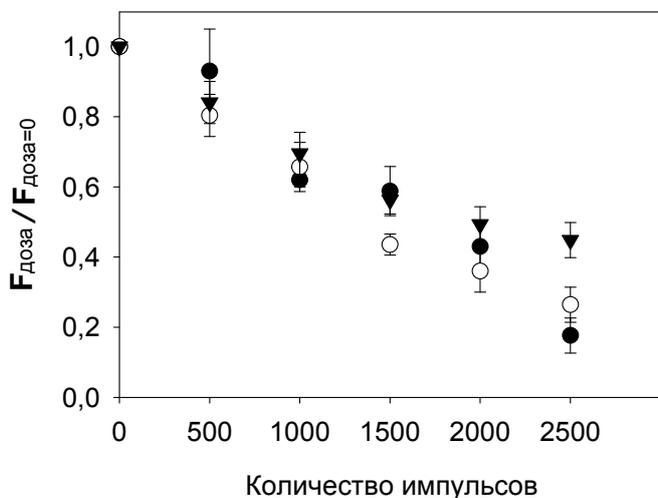
имеет большее сродство к тромбину в растворе, чем G15, или что длина политимидинового линкера 35 нт не является оптимальной для пары A1Ph(I) и G15.

Фотоинактивация анти-тромбиновых фотоаптамеров и фотоаптамерных конструкций под воздействием ультрафиолетового излучения

Выход ковалентных комплексов фотоаптамеров с белками-мишенями никогда не достигал 100% (Tasset D.M. et al., 1997; Jensen K.B. et al, 1995; Ruckman J. et al, 1998; Golden M.C. et al, 2000; Smith D. et al, 2003; Koch T.H. et al, 2004). Основываясь на этом, было предположено, что эффективность образования фотосшивок ограничена идущим параллельно процессом инактивации фотоаптамеров, связанным с возникающими при УФ-облучении повреждениями галоген-содержащих олигонуклеотидов (Smith D., et al 2003; Koch T.H. et al, 2004). Другая возможная причина – повреждение белка-мишени. Хотя УФ-излучение с длиной волны выше 300 нм как правило не вызывает существенной фотодеградациии белка (Meisenheimer K.M. et al, 1997), известны случаи, когда оно приводило к значительным фотоиндуцированным повреждениям белковой компоненты при исследовании специфических белковых комплексов с нуклеиновыми кислотами (Gott J.M. et al, 1991).

Для того, что бы определить причину, ограничивающую выход ковалентных комплексов в случае антитромбиновых фотоаптамеров и фотоаптамерных конструкций, растворы тромбина или олигонуклеотидов были подвергнуты воздействию УФ-излучения до их смешивания в эквимольном соотношении («предоблучение»). После инкубации смесей 30 мин при 37°C, их облучали и определяли относительный выход ковалентных комплексов, F, с помощью электрофоретического анализа. УФ-облучение тромбина в буфере R в дозе, соответствующей 2000 импульсам, не привело к сколь либо заметному изменению выхода

фотосшивок. В отличие от тромбина, предоблучение фотоаптамера A1Ph(Br) в такой же дозе уменьшало выход фотосшивок более чем в два раза. Исследование воздействия «предоблучения» в диапазоне от 0 до 2500 импульсов показало (Рис. 12), что выход



ковалентных комплексов падает с дозой предоблучения как в случае фотоаптамера A1Ph(Br), так и фотоаптамерных конструкций A1Ph(I)L1/L2-A2 и A1Ph(Br)-A2.

Рис. 12. Зависимость выхода ковалентных комплексов тромбина с фотоаптамером A1Ph(Br) и фотоаптамерными конструкциями от дозы «предоблучения». A1Ph(Br), A1Ph(Br)-A2 и A1Ph(I)L1/L2-A2 в концентрации 1 мкМ были облучены в буфере R. Предоблучённые растворы использовали для приготовления

эквимольных смесей с тромбином (0,5 мкМ). Доза облучения – 1000 импульсов. Светлые круги – A1Ph(Br); темные круги – A1Ph(I)L1/L2-A2; треугольники – A1Ph(Br)-A2. Приведены среднеарифметические значения \pm среднеквадратичное отклонение, полученные из трёх экспериментов.

Инактивация фотоаптамеров не сопровождалась фрагментацией олигонуклеотидов. Как видно на Рис. 13, облучение A1Ph(I)L1/L2-A2 дозами до 2000 импульсов не приводило к появлению дополнительных полос. Не было также обнаружено продуктов фрагментации при масс-спектрометрическом анализе фотоаптамера A1Ph(I)L1/L2, облучённого в воде (Рис. 14): спектр был представлен различными зарядными состояниями молекулярного иона с массой 12911Да (ожидаемая молекулярная масса – 12920Да). Таким образом, можно заключить, что при облучении анти-тромбиновых фотоаптамеров и фотоаптамерных конструкций не происходит образования однонитевых разрывов и их инактивация определяется другими видами фотоиндуцированных молекулярных повреждений.

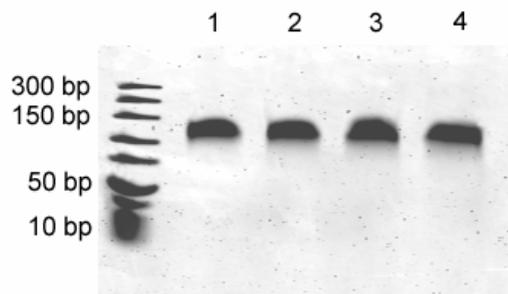
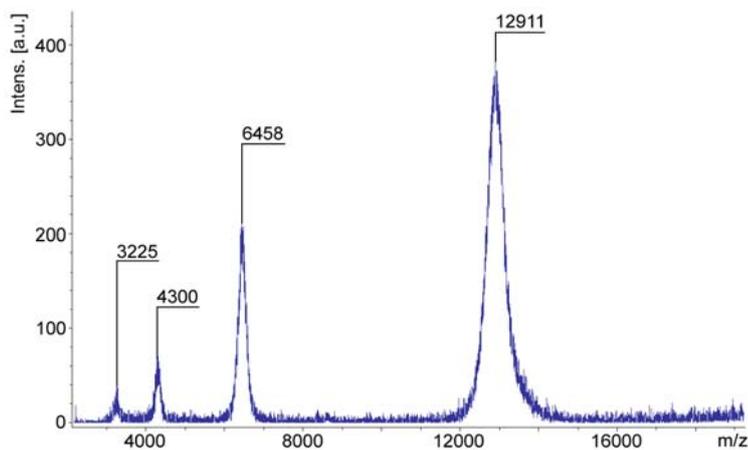


Рис. 13. Электрофоретический анализ влияния УФ-облучения на фотоаптамерную конструкцию A1Ph(I)L1/L2-A2. Необлучённые (дорожка 1) и облучённые 500, 1000 и 2000 импульсами (дорожки 2, 3 и 4, соответственно) образцы. Концентрация облучаемых растворов A1Ph(I)L1/L2-A2 – 0,5 мкМ. Облучение в буфере R. Денатурирующий ПААГ-электрофорез в присутствии 20 М формамида.

Масс-спектрометрический анализ модельного олигонуклеотида G15(Br), чья последовательность была идентична последовательности аптамера G15 с заменой тимидина в позиции 12 на 5-BrdU (Табл. 1), показал, что УФ-облучение приводит к появлению



дополнительных пиков в масс-спектре (Рис. 15). Они представляли молекулярные ионы, чьи массы отличались от массы G15(Br) на 63 и 133 Да (Рис. 15А). Бром-содержащий нуклеотид

Рис. 14. Масс-спектр фотоаптамера A1Ph(I)L1/L2. Облучение: 5000 импульсов, в деионизованной воде, концентрация – 10 мкМ.

находится в G15(Br) в окружении тимидина и гуанизина. Изменения молекулярной массы, которые можно было бы ожидать, исходя из известных молекулярных повреждений, возникающих в бром-урацил-содержащей ДНК при облучении ультрафиолетом (Hutchinson F.Q., 1973; Sugiyama H. et al., 1993; Sugiyama H. et al., 1996; Zeng Y. et al., 2006), должны были бы составить 81 Да (фотосшивка между основаниями), 214 или 174 Да (потеря брома и отщепление гуанинового или тиминового оснований с образованием дезоксирибонолактона) и 226 или 192 Да (потеря брома и отщепление гуанинового или тиминового оснований с формированием щёлочеллабильного сайта). Однако наблюдаемые изменения молекулярной массы в случае G15(Br) не совместимы ни с одним из этих повреждений. В случае облучения модельного олигонуклеотида pG(Br), где наряду с бром-уридином присутствуют только гуанизины (Табл. 1), наблюдалось появление молекулярных ионов, которые отличались по массе на 63 и 81 Да (Рис. 15В). В случае другого модельного олигонуклеотида, pT(Br), где бром-уридин окружён только тимидинами, при тех же условиях облучения не наблюдалось появления

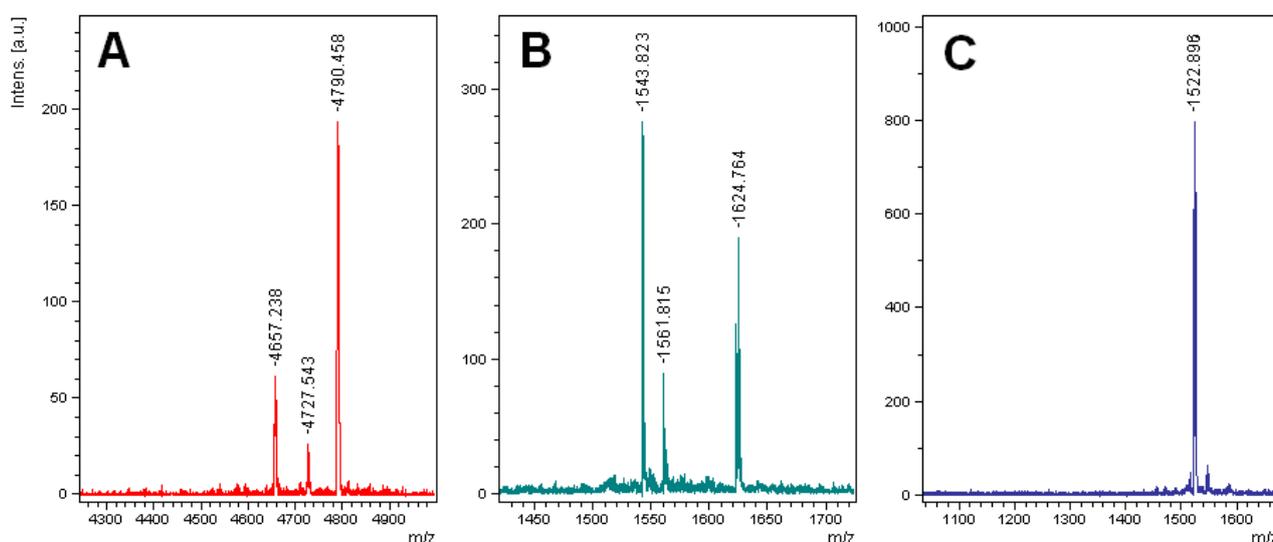


Рис. 15. Масс-спектр модельных олигонуклеотидов. Панель А: G15(Br), облучение – 4000

импульсов. Панель В: pG(Br), облучение – 6000 импульсов. Панель С: pT(Br), облучение – 6000 импульсов. Облучение проводили в деионизованной воде, концентрация олигонуклеотидов – 300 мкМ.

каких-либо дополнительных молекулярных ионов (Рис. 15С). В то время как появление молекулярного иона с молекулярной массой, изменённой на 81Да (Рис. 15В) указывает на формирование фотосшивки, появление молекулярного иона с массой, уменьшенной на 63Да может указывать на потерю брома с замещением его на водород и присоединением гидроксила в позиции С-2 дезоксирибозы. Возможность фотохимической реакции с образованием таких продуктов была показана в работе Oyoshi et al. (Oyoshi T. et al., 1999). Появление молекулярного иона с массой, изменённой на 133Да, в случае облучения олигонуклеотида G15(Br) не удалось связать ни с одним из известных в литературе повреждений бром-уридин-содержащей ДНК при облучении длинноволновым ультрафиолетом.

Таким образом, фотоиндуцированные молекулярные повреждения возникают в бром-уридин-содержащих олигонуклеотидах, где 5-BrdU находится в окружении таких же нуклеотидов, как в случае бром-содержащего анти-тромбинового аптамера, и могут быть ответственны за инактивацию антитромбиновых фотоаптамеров и фотоаптамерных конструкций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования взаимодействия гетеродимерных фотоаптамерных конструкций с белком-мишенью, выполненные на модели антитромбиновых аптамеров, показали, что включение фотоаптамера в гетеродимерную конструкцию позволяет значительно понизить величину концентрационного порога формирования ковалентных комплексов фотоаптамер/мишень. Это указывает на принципиальную возможность конструирования фотоактивных аффинных реагентов с существенно улучшенной эффективностью формирования фотосшивок с белковой мишенью, используя аптамеры и фотоаптамеры, узнающие разные поверхностные участки мишени, как модульные блоки.

Понижение величины концентрационного порога формирования ковалентных комплексов в случае гетеродимерных конструкций достигается повышением аффинности по сравнению с аффинностью исходных аптамеров. Объединение аптамеров в гетеродимерные конструкции позволяет значительно увеличить аффинность при правильном подборе длины линкера. Зависимость величины концентрационного порога формирования фотосшивок от аффинности определяется конкуренцией между процессом формирования ковалентных комплексов и процессом фотоинактивации фотоаптамеров в результате химических изменений, возникающих в олигонуклеотидах при поглощении фотона галоген-содержащими основаниями.

Предварительные результаты исследования селективности фотоаптамерной конструкции, выполненные на модели антитромбиновых аптамеров, показали, что формирование ковалентных комплексов между конструкцией и белком-мишенью происходит специфично. Однако результаты исследования взаимодействия тромбина с антитромбиновыми аптамерными гетеродимерными конструкциями указывают на то, что в общем случае селективность взаимодействия с молекулярной мишенью может ухудшиться. Таким образом, наряду с аффинностью, требуется скрининг гетеродимерных конструкций в отношении их селективности.

Данные, полученные в результате сравнительного термодинамического анализа процесса образования комплексов тромбина с антитромбиновыми аптамерами и их гетеродимерной конструкцией показывают, что усиление аффинности гетеродимерных конструкций полностью определяется увеличением абсолютного значения энтропийной составляющей изменения свободной энергии реакции комплексообразования.

ВЫВОДЫ

1. Объединение анти-тромбиновых аптамеров в гетеродимерные конструкции с помощью политимидинового линкера приводит к усилению сродства к тромбину. При длинах линкера от 35 до 55 нуклеотидов, равновесные константы диссоциации комплексов тромбина с иммобилизованными гетеродимерными конструкциями антитромбиновых аптамеров достигали минимума и были в среднем в 30 раз меньше, чем для составляющих их аптамеров.

2. Заменой 5-IdU на 5-BrdU получен новый фотоаптамер к тромбину. Установлено, что эффективности формирования фотоиндуцированных ковалентных комплексов тромбина с бром-урацил-содержащим фотоаптамером и йод-урацил-содержащим фотоаптамером практически не отличаются.

3. Объединение анти-тромбиновых аптамера и фотоаптамера в гетеродимерную конструкцию позволяет понизить концентрационный порог формирования фотоиндуцированных ковалентных комплексов на два порядка. Понижение концентрационного порога определяется более высокой аффинностью гетеродимерных фотоаптамерных конструкций.

4. Предоблучение длинноволновым ультрафиолетом фотоаптамеров и фотоаптамерных конструкций приводит к уменьшению количества фотоактивных олигонуклеотидов, способных формировать ковалентные комплексы с тромбином.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

HEPES – N-(2-гидроксиэтил)пиперан-N'-этан сульфоновая кислота

БСА – бычий сывороточный альбумин

ППР – поверхностный плазмонный резонанс

mAb – моноклональные антитела

Fab – антиген-связывающий фрагмент антитела

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Радько С.П., Рахметова С.Ю., Бодоев Н.В., Арчаков А.И. Аптамеры как перспективные аффинные реагенты для клинической протеомики // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53, № 1. - С. 5-24.
- 1a. Radko S.P., Rakhmetova S.Yu., Bodoev N.V., Archakov A.I. Aptamers as perspective affine reagents for clinical proteomics // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2007. - Vol. 1, № 3. - P. 198-209.
2. Рахметова С.Ю., Радько С.П., Гнеденко О.В., Бодоев Н.В., Иванов А.С., Арчаков А.И. Гетеродимерные фотоаптамерные конструкции как новый подход к повышению эффективности формирования фотосшивок с белком-мишенью // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, № 1. - С. 72-81.
- 2a. Rakhmetova S.Yu., Radko S.P., Gnedenko O.V., Bodoev N.V., Ivanov A.S., Archakov A.I. Photoaptameric heterodimeric constructs as a new approach to enhance the efficiency of formation of photocrosslinks with a target protein // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2010. - Vol. 4, № 1. - P. 68–74.
3. Рахметова С.Ю., Радько С.П., Гнеденко О.В., Бодоев Н.В., Иванов А.С., Арчаков А.И. Сравнительный термодинамический анализ взаимодействия тромбина с антитромбиновыми аптамерами и их гетеродимерной конструкцией // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, № 3. - С. 404-411.
4. Rakhmetova S.Yu., Ivanov A.S., Radko S.P., Gnedenko O.V., Bodoev N.V., Veselovsky A.V., Shcherbinin D.S., Archakov A.I. Heterodimeric constructs of anti-thrombin aptamers as model biorecognizing elements with enhanced affinity for biosensing // The sixth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure. – Novosibirsk, 2008. - P. 203.
5. Рахметова С.Ю., Радько С.П., Гнеденко О.В., Бодоев Н.В., Иванов А.С., Арчаков А.И. Взаимодействие димерных конструкций аптамеров с тромбином // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск, 2008. – С. 173.
6. Radko S.P., Bodoev N.V., Rakhmetova S.Yu., Gnedenko O.V., Ivanov A.S., Archakov A.I. Aptamers multimeric constructs – a new road in developing synthetic affinity reagents for chip-based proteomics? // 4th international conference «Genomics, proteomics, bioinformatics and nanobiotechnologies for medicine». - Moscow, 2008. – P. 21.
7. Радько С.П., Рахметова С.Ю., Гнеденко О.В., Бодоев Н.В., Иванов А.С., Арчаков А.И. Молекулярные фотоаптамерные конструкции как подход к созданию новых аффинных реагентов // Сборник трудов научной конференции «Химическая биология – Фундаментальные проблемы бионанотехнологии». – Новосибирск, 2009. – С. 120
8. Rakhmetova S.Yu., Radko S.P., Gnedenko O.V., Bodoev N.V., Ivanov A.S., Archakov A.I. Photoaptameric heterodimeric constructs as a new approach to enhance the efficiency of formation of photocrosslinks with a target protein // 5th international conference «Genomics, proteomics, bioinformatics and nanobiotechnologies for medicine». - Moscow, 2010. – P. 64.