

ЩЕРБИНИН

Дмитрий Сергеевич

**КОНСТРУИРОВАНИЕ АПТАМЕРОВ БЕЛКОВ МЕТОДАМИ
КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» Российской академии медицинских наук

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Веселовский Александр Владимирович

Официальные оппоненты **Туманян Владимир Гаевич**
доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий лабораторией
ФГБУН Институт молекулярной биологии имени
В. А. Энгельгардта РАН

Каменская Марина Александровна
доктор биологических наук, профессор,
заведующий отделом
ФГБУН Всероссийский институт научной и
технической информации РАН

Ведущее учреждение: Институт цитологии и генетики СО РАН

Защита состоится «12» декабря 2013 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «ИБМХ» РАМН) по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ИБМХ» РАМН.

Автореферат разослан «11» ноября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

Кандидат химических наук

Е. А. Карпова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Аптамеры представляют собой небольшие одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, способные связываться с белками с высокой аффинностью и специфичностью [Mayer G., 2009]. В большинстве случаев они состоят из 15-30 нуклеотидов и имеют стабильную пространственную структуру [Baldrich E., 2010], обеспечивающую селективность связывания с конкретными белками.

В настоящее время исследованию и поиску аптамеров уделяется большое внимание. Они рассматриваются в качестве перспективной замены антител в лекарственной терапии и в качестве высокоаффинных реагентов в биотехнологии [Tombelli S. et al., 2005; Pendergrast P.S. et al., 2005; Mosing R.K. et al., Bowser M.T. et al., 2007]. В отличие от антител, синтез аптамеров намного проще, в них легче вносить изменения для повышения аффинности и селективности, они обладают дополнительными технологическими преимуществами, такими как высокая стабильность при их хранении [Cox J.C. et al., 1998; Ferreira, C.S. et al., 2007].

Для поиска и синтеза аптамеров в настоящее время применяются экспериментальные методы. Основным из них является метод SELEX [Syed, M.A., 2010], который основан на повторяющейся десятки раз процедуре удлинения, полимеризации и отбора олигонуклеотидов из начальной библиотеки нуклеотидов со случайной последовательностью. В результате, создание нового аптамера является трудно предсказуемой задачей с высоким уровнем случайности.

Одним из возможных подходов для ускорения поиска и создания аптамеров является применение методов компьютерного моделирования. Предварительные исследования *in silico* позволили бы задать начальную библиотеку аффинных олигонуклеотидов для дальнейшего поиска, тем самым минимизировав неопределенность и случайность экспериментального поиска, или проведение полного цикла конструирования аптамеров. Компьютерные подходы успешно применяются на разных этапах поиска и оптимизации структур биологически активных низкомолекулярных соединений [Fukunshini Y. et al., 2009, Veselovsky A.V., Ivanov A.S., 2003].

Несмотря на эффективность применения компьютерных методов для поиска и оптимизации низкомолекулярных лигандов, для более сложных по структуре молекул аптамеров они практически не использовались. Применение компьютерных методов молекулярного моделирования в основном ограничивалось исследованиями взаимодействия между уже известными парами белок-аптамер [Lin P.-H., 2012]. Примером является

исследование изменения взаимодействий между тромбином и его известным 15-членным аптамером (ТВА, thrombin-binding aptamer) при внесении изменений в структуру олигонуклеотида [Pagano B. et al, 2007].

Для поиска РНК аптамеров к низкомолекулярным соединениям был разработан подход, имитирующий метод SELEX *in silico*. Было показано, что он позволяет получать правдоподобные результаты, но требует значительных временных затрат и больших вычислительных мощностей [Chushak Y., Stone M.O., 2009]. Подобные работы доказывают перспективность применения компьютерных методов для исследования взаимодействия и поведения белков в комплексе с аптамерами.

Цель работы: разработать подход рационального компьютерного конструирования аптамеров к белкам-мишеням и апробировать его на примере цитохрома P450 51A1.

Задачи:

1. Оработать методику исследования белок-аптамерных комплексов с использованием компьютерных подходов на примере тромбина и его 15-членного аптамера.
2. Разработать подход по рациональному направленному конструированию аптамеров *in silico*.
3. Применить предложенный подход для конструирования аптамеров к цитохрому P450 51A1 и провести их экспериментальную проверку.

Научная новизна

Предложен метод рационального компьютерного конструирования аптамеров к белкам-мишеням. Он включает поиск потенциального места связывания аптамера на поверхности белка методом молекулярного докинга, отбор коротких олигонуклеотидов, определяющих узнавание и связывание аптамера с белком и конструирование дополнительного участка аптамера, ответственного за поддержание его пространственной структуры. Применимость метода подтверждена на примере цитохрома P450 51A1.

На основе предложенного метода впервые были найдены аптамеры к белку из семейства цитохромов P450. Константы диссоциации сконструированных аптамеров для цитохрома P450 51A1 были в диапазоне $10^{-6} - 10^{-7}$ М.

Показано, что различная аффинность антитромбинового аптамера ТВА с тромбином и претромбином-2 обусловлена изменением подвижности петли экзосайта-1 при превращении претромбина-2 в тромбин.

Личный вклад

Автором проведены все компьютерные исследования и расчеты, включая исследование применимость современных компьютерных методов молекулярного докинга, молекулярной динамики и методов оценки энергии взаимодействия для описания и изучения комплексов белков с аптамерами. Было исследовано взаимодействие тромбина и претромбина-2 с 15-членным аптамером ТВА. Автором был предложен подход двухэтапного рационального конструирования аптамеров к белкам-мишеням. Предложенным методом были разработаны аптамеры к цитохрому P450 51A1.

Практическая значимость

Разработан подход по направленному компьютерному конструированию аптамеров для целевого белка *de novo*. На основе предложенного подхода созданы аптамеры к цитохрому P450 51A1, которые могут быть использованы в качестве аффинных реагентов для цитохромов P450. Этот подход может применяться на предварительном этапе для создания начальной библиотеки нуклеотидов для метода SELEX для повышения эффективности направленного поиска аптамеров или для проведения полного цикла конструирования аптамеров.

Положения, выносимые на защиту:

1. Предложен двухстадийный подход по рациональному конструированию аптамеров *in silico*.
2. Компьютерными методами разработаны аптамеры к цитохрому P450 51A1, и была экспериментально показана их аффинность и селективность к цитохромам P450.
3. Отличие в связывании ТВА с претромбином-2 и тромбином обусловлено изменением подвижности аминокислотных остатков, контактирующих с аптамером.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены в виде тезисов и докладов на российских и международных конференциях: “The Sixth international conference of bioinformatics of genome regulation and structure (BGRS’2008)”, Новосибирск, 2008; Национальной конференции “Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных научных проблем и прикладных задач, ИВТН-2010”; XIX Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство", Москва, 2011; международной научно-практической конференции “Фармацевтические и медицинские биотехнологии”, Москва,

2012; международной интернет-конференции “Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии”, Казань, 2012.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 7 научных работ, из них 2 в рецензируемых журналах из списка ВАК, и пять работ в материалах российских и международных научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 93 страницах машинописного текста, содержит 37 рисунков и 7 таблиц, состоит из введения, четырех глав и списка литературы, содержащего 83 ссылки.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Приводятся общие сведения об аптамерах и их применении. Анализируются используемые методы и их недостатки для экспериментального поиска и модификации аптамеров.

Далее приводится описание первого объекта исследования - тромбина. Рассматриваются варианты путей его превращения из неактивного протромбина в функционально активный фермент. Описаны аптамеры, связывающие тромбин, их взаимодействие с предшественниками тромбина, и известные модификации этих аптамеров.

В следующей части обзора литературы рассматривается семейство цитохромов P450 и более подробно цитохром P450 51A1.

В заключительной части обзора литературы приводится описание современных методов компьютерного моделирования и обсуждается их применение. Рассматриваются методы молекулярной динамики и виртуального скрининга.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структуры белков, аптамеров и их комплексов

Для исследования взаимодействия тромбина и протромбина-2 с аптамерами из банка данных трехмерных структур PDB были использованы структуры альфа-тромбина (2UUJ), протромбина-2 (1HAG) и комплексов тромбина с аптамерами в двух конформациях (1HUT и

1HAO) (в скобках указаны коды из банка PDB). Структуры комплексов претромбина-2 с аптамерами были построены путем пространственного совмещения известных структур комплексов тромбина с аптамерами и структуры претромбина-2 при помощи программы Sybyl8.1, с последующей оптимизацией структур методом минимизации энергии, и расчет частичных зарядов атомов методом Gasteiger-Huckel.

Для поиска аптамеров к цитохрому P450 51A1 использовали структуру 3JUV.

Молекулярный докинг

Библиотеки всех возможных тринуклеотидов ДНК были построены при помощи программы Sybyl8.1.

Автоматический докинг проводился в программе Dock6.5. Предварительно для структур белков были рассчитаны поверхности методом Connolly с использованием пробного атома радиусом 1,4 Å. Для расчета электростатических взаимодействий были использованы “решетки” с размером ячейки 0,3 Å. Нековалентные взаимодействия учитывались на расстояниях до 12 Å. Параметры Ван-дер Ваальсовых взаимодействий брались из силового поля Amber (w_AMBER_parm99.defn).

Первичный отбор найденных конформаций комплексов проводился по предсказанной энергии взаимодействия с помощью оценочной функции программы Dock6.5. Дальнейший анализ полученных результатов проводился в программе Sybyl8.1.

Молекулярная динамика

Молекулярная динамика (MD) проводилась с использованием пакета программ Amber9. Все симуляции проводились с применением “явно заданной” модели воды TIP3P, контр-ионов для нейтрализации систем, силового поля amber99SB для описания параметров аминокислотных остатков и Parmbsc0 для нуклеотидов.

Первым этапом была процедура минимизации (5000 шагов), с последующим нагревом системы до 300 К. Для поддержания температуры был выбран термостат Ланджевена. После этого в моделируемой системе выравнивалось давление до 1 атм с применением баростата Берендсона. Расчеты молекулярной динамики проводились на траекториях в 10 нс с шагом 2 фс. Для расчета электростатических взаимодействий использовался алгоритм PME. Расчет взаимодействий нековалентно связанных атомов проводился на расстояниях до 8 Å. Расчеты выполняли при постоянной температуре и давлении.

Анализ полученных траекторий симуляций MD проводился при помощи программы ptraj пакета Amber9, VMD и Qtiplo.

Оценка подвижности аминокислотных остатков, образующих место связывания аптамеров, проводилась методом главных компонент в программном пакете PCAsuite. Для анализа использовали участок траекторий длиной 2,5 нс. В работе исследовали первый собственный вектор, покрывающий наибольшее пространство всех движений атомов. При помощи программы rocsurine был создан скрипт, позволяющий визуализировать коллективные движения в программе VMD.

Вычисление свободной энергии связывания

Для оценки энергии связывания комплексов белок-аптамер использовали метод ММ-PBSA. Расчет проводили на временном отрезке 5-7 нс на основе 10 мгновенных состояний системы с шагом в 200 пс. Сольватационный эффект рассчитывался с использованием метода Poisson-Boltzman. Энтропийный вклад был определен методом нормальных мод при помощи программы Nmode пакета Amber9.

Экспериментальное тестирование связывания аптамеров с белками

Синтез олигонуклеотидов был выполнен в лаборатории медицинской геномики (к.х.н. Радько С.П.) и экспериментальная проверка аффинности и селективности синтезированных аптамеров была проведена в лаборатории межмолекулярных взаимодействий (зав. лаб., проф., д.б.н. Иванов А.С.) ФГБУ «ИБМХ» РАН.

Эксперименты по исследованию взаимодействия ДНК-олигонуклеотидов с белками выполняли на оптическом биосенсоре Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences, США). В работе использовали оптические чипы SA с иммобилизованным на карбоксиметилированном декстране стрептавидином, на который иммобилизовали биотинилированные олигонуклеотиды. Взаимодействие ДНК-белок исследовали, инжектируя растворы белков в диапазоне концентраций 10 нМ – 1 мкМ. Равновесные константы диссоциации комплексов белков с иммобилизованными олигонуклеотидами вычисляли с помощью программы BIAevaluation Version 4.1 (GE Healthcare Life Sciences, США), из зависимости равновесного сигнала биосенсора от концентрации белка в соответствии с уравнением:

$Req/Rmax = C / (KD + C)$, где Req – равновесный сигнал биосенсора при данной концентрации белка, Rmax – максимальный сигнал биосенсора при данном количестве иммобилизованных олигонуклеотидов, C – концентрация белка в растворе, KD - равновесная константа диссоциации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Анализ структур комплексов белок-аптамер и разработка стратегии компьютерного конструирования аптамеров

Для разработки рационального подхода для конструирования аптамеров на первом этапе был проведен анализ известных пространственных структур комплексов белок-аптамер. Несмотря на большое количество найденных аптамеров к различным белкам, пространственные структуры их комплексов определены для очень небольшого их числа. Для дальнейшего анализа были выбраны комплексы аптамеров с целыми белками или их доменами.

Анализ близких контактов (расстояние между белком и аптамером $\leq 3 \text{ \AA}$) показал, что непосредственно с белком взаимодействует менее половины нуклеотидов аптамеров (Рис. 1), которые формируют узнающую часть аптамера. Эта часть может представлять собой как единую последовательность (1OOA, 3UZS), так и принадлежать разным участкам аптамера (3NHX, 1HUT, 1HAO, 3AGV). Остальные нуклеотиды формируют стабильные элементы пространственной структуры РНК и ДНК и, вероятнее всего, выполняют функцию поддержания жесткой конформации аптамера (структурная часть). Структурные части аптамеров могут принимать форму шпилек, имитировать двойную спираль, образовывать структуры типа псевдоузлов, G-квадроплексы.

Таким образом, в структуре аптамеров можно выделить две части. Одна часть отвечает за аффинность и селективность связывания, а вторая обеспечивает стабильность структуры аптамера и отвечает за фиксацию конформации контактирующих нуклеотидов. Это позволило заключить, что конструирование аптамера *in silico* можно проводить по частям, в несколько этапов.

На первом этапе необходимо подобрать олигонуклеотидные последовательности и определить их пространственное положение в месте связывания, которые будут формировать узнающую часть аптамера. Следующий этап заключается в выборе структурной части аптамера из числа жестких элементов олиго- и полинуклеотидов, необходимой для фиксации правильной конформации узнающей части.

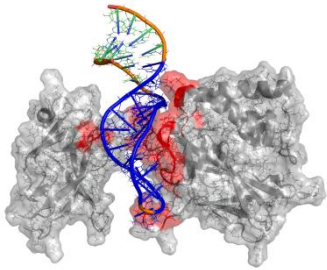
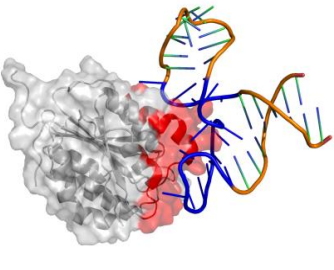
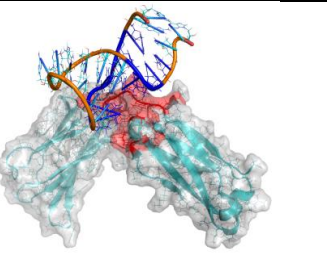
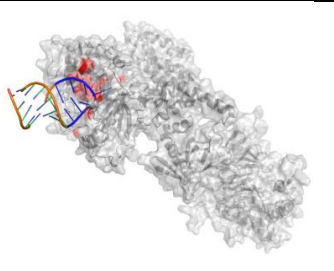
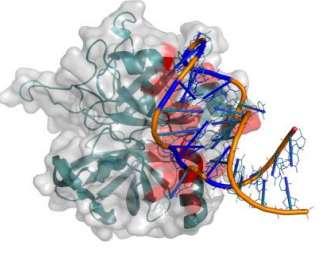
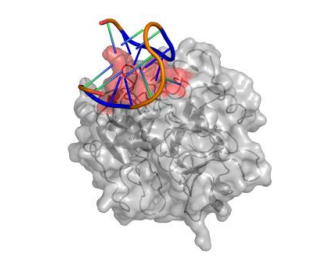
100A (29/18)		3HXO (40/17)	
3AGV (24/10)		3UZS (20/7)	
3DD2 (26/7)		1HAO (15/7)	

Рис. 1. Пространственные структуры комплексов белок-аптамер. 100A - Транскрипционный фактор NF-карраВ р50; 3AGV - FC-фрагмент иммуноглобулина G-1; 3DD2 - тромбин с РНК-аптамером; 3HXO - Фактор фон Виллебранда; 3UZS - GRK-киназа-2; 1HAO – тромбин с ДНК-аптамером. Синим цветом обозначены контактирующие с белком нуклеотиды, красным - аминокислотные остатки белков, участвующие во взаимодействии с аптамерами. В скобках приведены общая длина аптамера/количество контактирующих с белком нуклеотидов.

Таким образом, была предложена следующая **схема** двухстадийного рационального поиска и конструирования аптамеров *in silico*:

I. Поиск места связывания и конструирование узнающей части аптамера

1. Поиск возможного сайта связывания аптамеров на поверхности мишени методом молекулярного докинга или визуальным анализом поверхности белка;
2. Виртуальный скрининг с использованием направленного молекулярного докинга для выбора наиболее аффинных олигонуклеотидов и построения модели узнающего участка аптамера;
3. Оценка стабильности найденных комплексов и вычисление значений энергии их взаимодействия методами молекулярной динамики и MM-PBSA.

II. Построение структурной части аптамера

1. Анализ окружения сайта связывания, оценка перспективности удлинения аптамера;
2. Моделирование структурной части аптамера с учетом конформации узнающей части;
3. Создание полной структуры аптамера и ее валидация.

Исследование аптамеров к тромбину методами компьютерного моделирования

Для выбора параметров молекулярного докинга и молекулярной динамики для оценки взаимодействия белка с аптамером были исследованы взаимодействие тромбина и претромбина-2 с хорошо изученным 15-членным аптамером для тромбина (ТВА). Этот аптамер, с последовательностью: 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' [Padmanabhan K. et al. **1996**], ингибирует активность тромбина, в несколько раз увеличивая время образования фибринового сгустка [Hayward S., de Groot B., **2008**].

В одном из возможных путей превращения протромбина в зрелый тромбин образуется претромбин-2, представляющий собой единый полипептид. Дальнейший разрыв связи между легкой и тяжелой цепью (Arg363-Ile364) приводит к образованию тромбина. Кроме активного центра в структуре тромбина выделяют два экзосайта (анион-связывающие сайты) [Muller et al., **2007**]. ТВА взаимодействует с аминокислотными остатками первого экзосайта тромбина. Также этот аптамер способен связываться и с экзосайтом-1 претромбина-2, но с меньшей эффективностью (K_d 34 и 66,1 нМ для тромбина и претромбина-2, соответственно) [Berezovski M., et al., **2003**].

В работы были использованы две известные конформации ТВА, имеющие в своей структуре G-квадроплекс, две ТТ-петли и одну TGT-петлю (Рис. 2) Аптамеры в этих структурах являются зеркальными конформерами и отличаются нуклеотидами, контактирующими с белком. В первой структуре (1НУТ) аптамер связывается при помощи TGT-петли, во втором (1НАО) — двумя ТТ-петлями.

Симуляции молекулярной динамики были проведены для четырех комплексов: двух комплексов аптамера с пространственной конформацией, взятой из структуры 1НУТ, и взаимодействующего с первыми экзосайтами тромбина и претромбина-2. Вторая пара комплексов состояла из тех же белков, но аптамер был в конформации из структуры 1НАО.

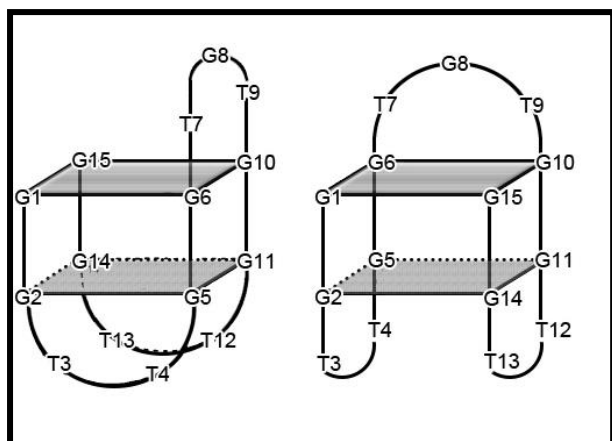


Рис. 2. Две возможные конформации тромбинового аптамера. Слева – структура из 1HAO, справа – 1HUT.

Симуляции молекулярной динамики показали стабильность исследуемых белков (Рис. 3А). Только для белка из комплекса претромбин-2/1HUT наблюдалось увеличение RMSD после трех наносекунд симуляции.

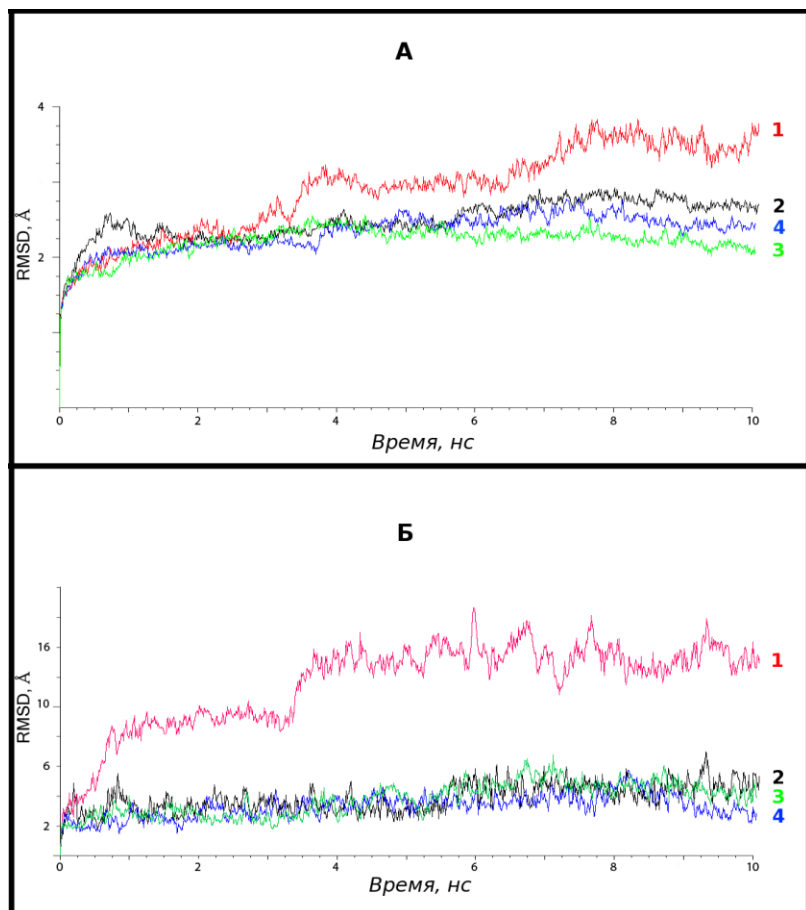


Рис.3. Среднеквадратичное отклонение аминокислотных остатков полипептидных цепей тромбина и претромбина-2 (А) и нуклеотидов аптамеров (Б) в различных комплексах на траектории симуляций молекулярной динамики.

1 - претромбин-2/1HUT;

2 - претромбин-2/1HAO;

3 - тромбин/1HUT;

4 - тромбин/1HAO

Названия комплексов указывают на белок и использованную пространственную структуру олигонуклеотида

Значение RMSD для аптамеров были также стабильны, за исключением комплекса претромбин-2/1HUT (Рис. 3Б). Это отклонение остатков олигонуклеотида связано с изменением положения аптамера относительно экзосайта претромбина-2, тогда как пространственная структура всего аптамера и его G-квадроплекса оставалась стабильной.

Анализ близких контактов показал, что исходно стабильность комплекса претромбин-2/1HUT обеспечивали гидрофобные взаимодействия и два “солевых мостика”, образованные остатками Arg433 и Arg436. В процессе динамики уже на первой наносекунде были потеряны контакты аптамера с петлей претромбина-2, образованной остатками 370-378 и нуклеотиды G1, G10 (образующие квадруплекс) и T9 (из TGT-петли) отошли от экзосайта претромбина-2.

После третьей наносекунды симуляции произошло изменение положения аптамера относительно экзосайта, наблюдался поворот и смещение аптамера относительно экзосайта-1 (Рис. 4). Видно, что аптамер “перескакивает” через петлю. Этот переход сопровождается потерей контакта белка со вторым тимином TGT-петли, и появлением взаимодействия между нуклеотидом G1 и остатками экзосайта-1 претромбина-2. Эта реорганизация соответствует резкому росту значений RMSD нуклеотидов аптамера (Рис. 3А). В результате, в конце симуляции только три нуклеотида аптамера из структуры 1HUT продолжали контактировать с белком. В то же время комплекс тромбина с этим конформером аптамера, а так же комплексы с аптамером из 1НАО оставались стабильным на всем протяжении динамики.

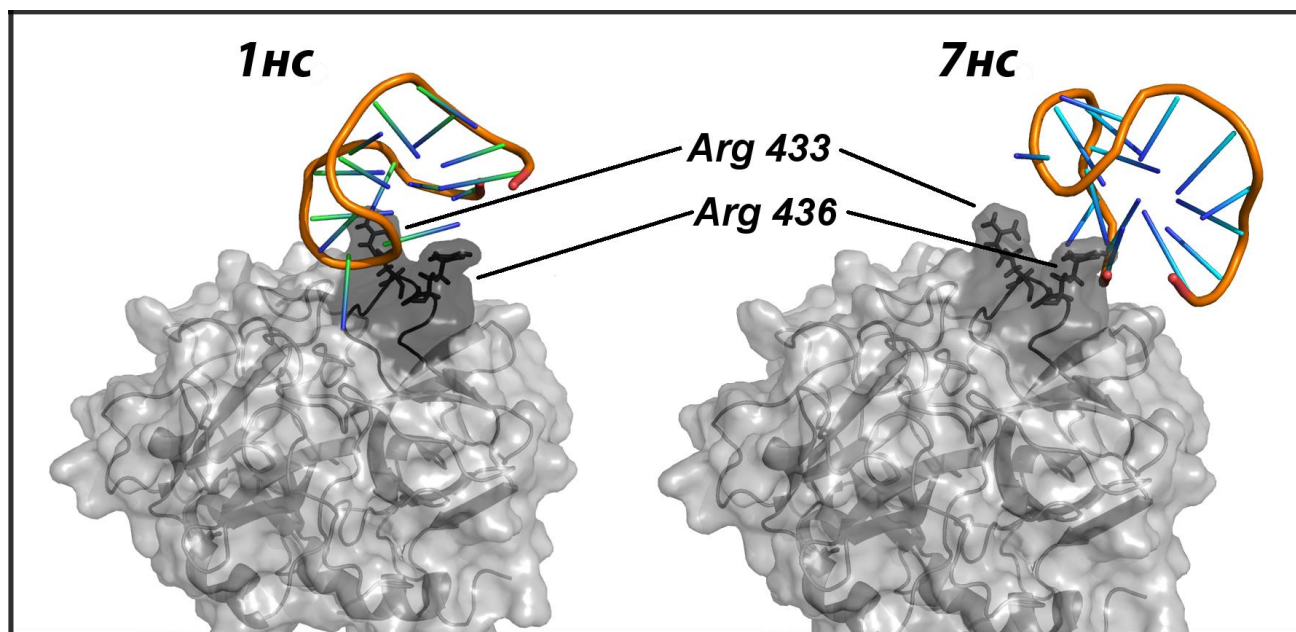


Рис. 4. Изменение положения аптамера в ходе молекулярной динамики комплекса претромбин-2/1HUT. Слева - комплекс после 1 нс, справа – после 7 нс.

Таким образом, проведенный анализ поведения комплексов тромбина и претромбина-2 с аптамером в разных конформациях показал, что с тромбином аптамер хорошо связывается в обеих конформациях, тогда как с претромбином-2 комплекс с одной из них оказался неустойчивым. На это же указывают и величины энергии связывания аптамеров в обоих

конформациях с тромбином и претромбином-2 (Табл. 1). Видно, что связывание аптамера в конформации 1HUT претромбином-2 значительно хуже, чем в остальных комплексах.

Таблица 1. Величины энергий взаимодействия в комплексах тромбина и претромбин-2 с конформерами аптамера, рассчитанные методом ММ-PBSA, и среднее количество водородных связей

Комплекс	ΔH	ΔS	ΔG , ккал/моль	Количество водородных связей
Тромбин				
1HAO	-52,30	-42,89	-9,41	3
1HUT	-53,13	-35,12	-18,01	2-3
Претромбин-2				
1HAO	-59,43	-32,48	-26,95	2-3
1HUT	-22,82	-24,76	1,94	1-2

Анализ RMSF (root mean standard fluctuation) показал, что большинство остатков претромбина-2, в том числе контактирующие с ТВА, обладают большей подвижностью по сравнению с тромбином (Рис. 5), несмотря на то, что претромбин-2 представляет собой единую полипептидную цепь. Сходные значения подвижности аминокислотных остатков наблюдались и в препротмбине-2, в структуре которого была искусственно разорвана связь Arg363-Ile364. Это свидетельствует о том, что изменения в подвижности аминокислотных остатков вызваны именно разрывом пептидной связи.

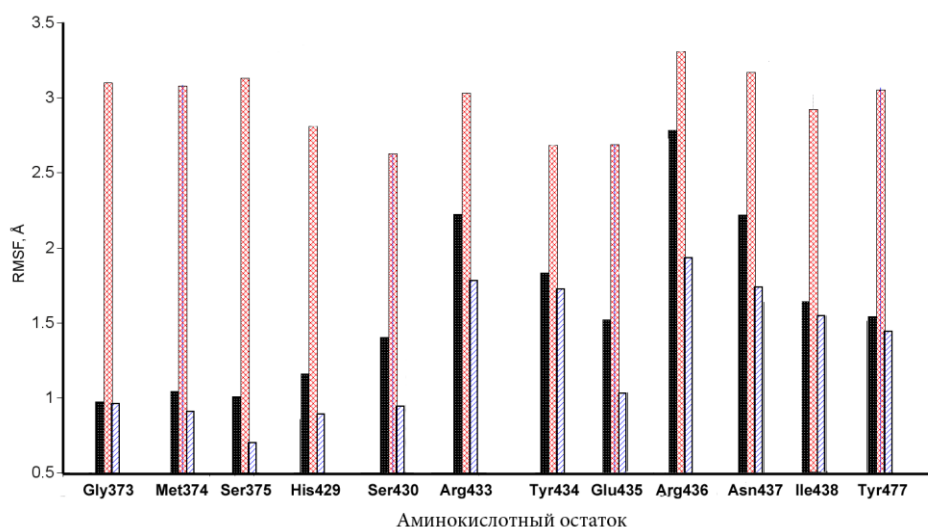


Рис. 5. RMSF остатков тромбина, претромбина-2 и претромбина-2 с разорванной связью Arg363-Ile364, контактирующие с ТВА. Красные столбцы - значения флуктуаций остатков претромбина-2, черные - претромбина-2 с искусственным разрывом связи, синие - тромбина

Детальный анализ движения аминокислотных остатков формирующих место связывания аптамера в тромбине и претромбине-2 был проведен методом главных компонент и показал, что в обоих белках наблюдается кооперативное движение петли Lys428-Phe438 с наибольшей амплитудой для остатков Arg433 и Arg436 (основные остатки, участвующие в связывании аптамера) (Рис. 6). Но амплитуда этого движения у претромбина-2 была значительно больше. Сопоставление направления колебаний петли с положением аптамеров из разных структур показало, что эти движения должны более серьезно влиять на связывание аптамера в конформации 1HUT, чем в 1HAO, поскольку в структуре 1HAO данная петля зажата между двумя ТТ-петлями аптамера, которые фиксируют ее между собой. Тогда как аптамер в конформации 1HUT взаимодействует с ней одной TGT петлей. В результате, в случае с тромбином, в котором движение петли слабое, оба конформера способны связаться с белком. Тогда как большая амплитуда движения петли в претромбине-2 затрудняет взаимодействие белка с аптамером.

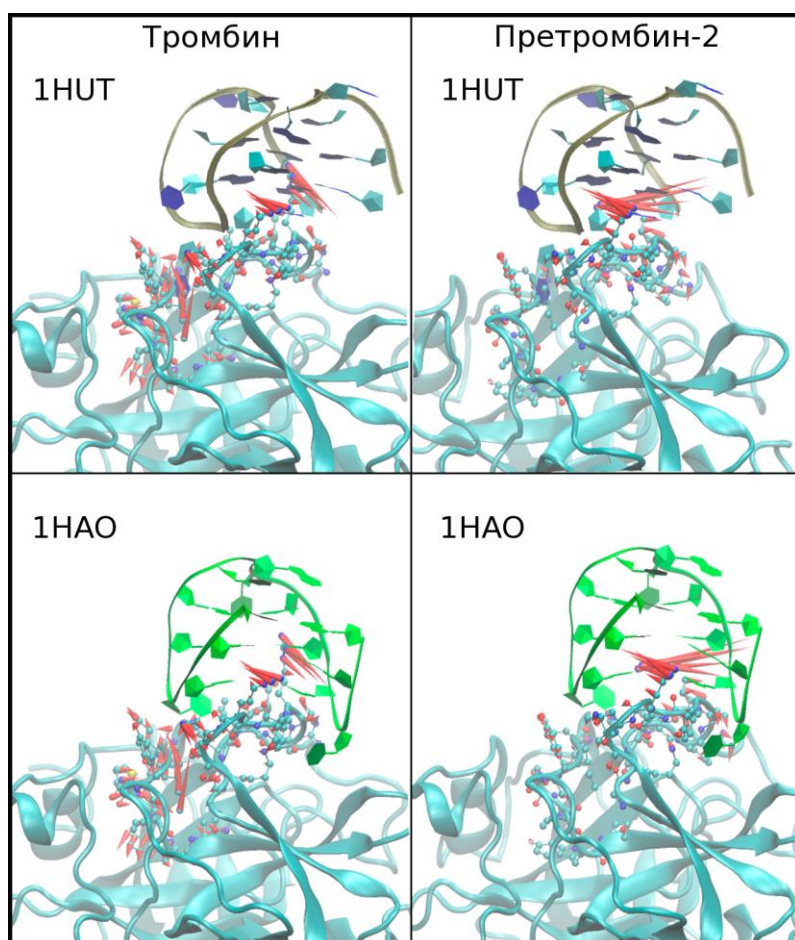


Рис. 6. Результаты анализа методом главных компонент траекторий молекулярной динамики претромбина-2 и тромбина. Структуры аптамеров добавлены для наглядного представления движений в местах контактов.

Таким образом, при равновероятностном образовании в процессе синтеза обоих конформеров аптамера, связывание с белком только одной конформации эквивалентно снижению концентрации лиганда в растворе в два раза. Этим может быть обусловлено наблюдаемое ухудшение аффинности примерно в два раза для аптамера к претромбину-2, по сравнению с тромбином [Zhou G. et al., 2010].

Проведенные исследования показали, что использование методов молекулярного моделирования позволяют адекватно описывать комплексы белков с аптамерами, выявлять тонкие детали их взаимодействия и оценивать эффективность связывания олигонуклеотидов с белками.

Компьютерное конструирование аптамеров к цитохрому P450 51A1

Для апробации предложенной схемы рационального конструирования аптамеров *in silico* в качестве белка-мишени был выбран цитохром P450 51A1 человека. Этот цитохром участвует в каскаде синтеза холестерина и рассматривается в качестве перспективной мишени для профилактики гиперхолестеринемии. Аптамеры для белков этого суперсемейства ранее не были известны.

Для поиска потенциального места связывания аптамеров на белке был проведен молекулярный докинг по всей поверхности белка библиотеки, содержащей 64 тринуклеотида. Было найдено три потенциальных аптамер-связывающих сайта на поверхности цитохрома. Наиболее перспективный из них располагался на проксимальной стороне цитохрома P450 51A1, образованный аминокислотными остатками вокруг ARG448. На этом сайте располагалось более 80% от всех найденных положений тринуклеотидов.

В результате направленного докинга этой библиотеки в выбранный аптамер-связывающий сайт было получено 570 различных положений тринуклеотидов. Анализ распределения нуклеотидов на поверхности выбранного сайта показал, что он может быть разделен на 3 основные зоны (Рис. 7). Причем это распределение не было случайным, в каждой зоне преимущественно располагался определенный тип нуклеотидов. В первую зону попало больше всего цитозинов, вторая зона оказалась наиболее селективна к гуанинам, а тимины чаще попадали в третью зону. Тем не менее, положений тринуклеотида CGT в результате молекулярного докинга найдено не было.

Для дальнейших исследований было выбрано 4 тринуклеотида с лучшими значениями оценочной функции докинга GGG, TGC, AGG и GGT (-113,6, -109,9, -106,6, -105,5 ккал/моль, соответственно). Для контроля было выбрано еще два олигонуклеотида с плохими значениями оценочной функции: CAT (-100,0 ккал/моль) и ACA (-94,8 ккал/моль).

Дополнительно был смоделирован тринуклеотид с последовательностью CGT, соответствующий наиболее часто встречаемым нуклеотидам в трех зонах аптамер-связывающего сайта. Таким образом, дальнейшее исследование взаимодействий цитохрома P450 51A1 с олигонуклеотидами проводили с использованием 7 тринуклеотидов.

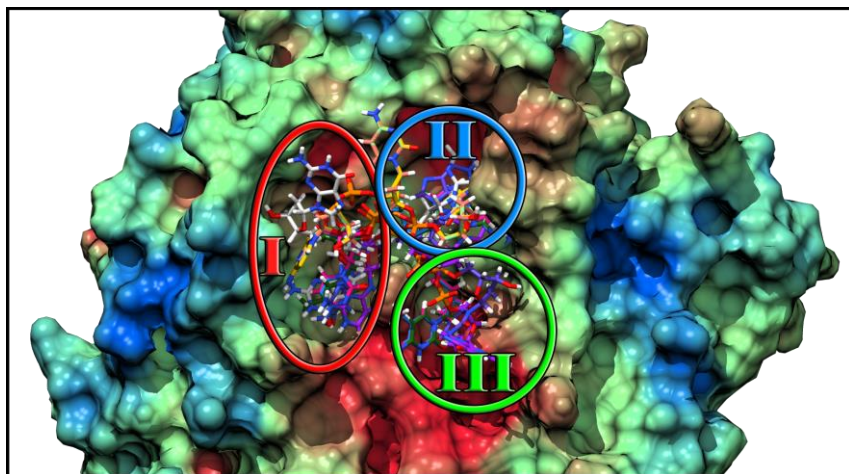


Рис. 7. Распределение нуклеотидов по зонам выбранного сайта связывания.

Для комплексов цитохрома P450 51A1 с выбранными олигонуклеотидами были проведены симуляции молекулярной динамики. В ходе симуляций всех комплексов белок оставался стабильным. Значения RMSD аминокислотных остатков цитохрома P450 51A1 держались в районе 1,5-2,5 Å. Для большинства олигонуклеотидов значения RMSD составляли около 4 Å. Только комплекс с олигонуклеотидом ACA не был стабильным. Для него наблюдался резкий скачок значений RMSD нуклеотидов до 8 Å в первые три наносекунды. Визуальный анализ показал значительное смещение тринуклеотида ACA от его первоначального положения.

На основе траекторий молекулярной динамики были рассчитаны значения энергии связывания олигонуклеотидов с цитохромом P450 51A1 (Табл. 2). Лучшие значения энергии связывания были получены для комплексов цитохрома P450 с олигонуклеотидами CGT и GGG (-19,88 и -18,13 ккал/моль, соответственно). Хуже всего связывание происходило между белком и тринуклеотидом ACA (17,6 ккал/моль).

Из проведенных расчетов видно, что замена одного нуклеотида может приводить к значительному изменению эффективности связывания. Так, замена центрального гуанина в CGT на аденин приводило к резкому ухудшению взаимодействия (-19,88 и -5,18 ккал/моль, соответственно).

Таблица 2. Оценка энергии связывания тринуклеотидов с цитохромом P450 51A1.

Три- нуклеотид	VDW	ELE	PBSOL	PBTOT	TSTOT (NMA)	Свободная энергия, ккал/моль	K _d , мкМ	Dock, ккал/моль
CAT	-75,55	-228,80	268,09	-36,26	-31,08	-5,18	0,6 ± 0,3	-100,00
ACA	-40,71	-234,32	260,31	-14,72	-32,32	17,60	1,3 ± 0,3	-94,80
TGC	-58,01	-325,98	345,13	-38,86	-27,22	-11,64	0,5 ± 0,2	-109,90
GGT	-61,25	-306,83	330,33	-37,76	-32,84	-4,92	0,4 ± 0,1	-105,46
CGT	-70,02	-408,82	427,96	-50,88	-31,00	-19,88	0,28 ± 0,08	--
AGG	-67,67	-274,80	296,94	-45,53	-27,41	-18,12	0,15 ± 0,03	-106,60
GGG	-77,64	-374,00	396,83	-54,80	-36,67	-18,13	0,14 ± 0,04	-113,60

**В первых пяти столбцах представлены вклады взаимодействий, учитываемых при расчете свободной энергии: VDW Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, ELE- электростатические, PBSOL- вклад сольватации, PBTOT- общий энтальпийная часть энергии, TSTOT- энтропийная составляющая.*

Следующим этапом в конструировании аптамера являлось создание его структурной части, которая должна поддерживать выбранную конформацию узнающей части. Выбранные тринуклеотиды в месте связывания имели U-образную форму, концы которых располагались на расстоянии около 15-15,5 Å. Это соответствует расстоянию между концами олигонуклеотидов, формирующих поворот в пространственной структуре ДНК “шпильке”, распространенного элемента аптамеров. Поэтому, было предложено использовать двойную спираль в качестве структурной части аптамера для цитохрома P450 51A1. Анализ места связывания показал, что присоединение такой спирали к узнающей части аптамера (и, соответственно, формирование пространственной структуры - шпильки) не должно вызвать существенных стерических конфликтов при взаимодействии полного аптамера с белком.

В качестве модели шпильки был выбран 15-членный олигонуклеотид с последовательностью ttaattXXXaattaa. Основание предложенной шпильки состоит из комплементарно связанных нуклеотидов ttaatt и aattaa. Поворот состоит из выбранных на предыдущем этапе тринуклеотидов. Для двух лучших тринуклеотидов были сконструированы модели шпилек: ttaattGGGaattaa и ttaattCGTaattaa и их комплексов с цитохромом P450 51A1. На рисунке 8 представлено пространственное расположение полного 15-нуклеотидного аптамера на поверхности аптамер-связывающего сайта. Молекулярная динамика этих комплексов показала их стабильность.

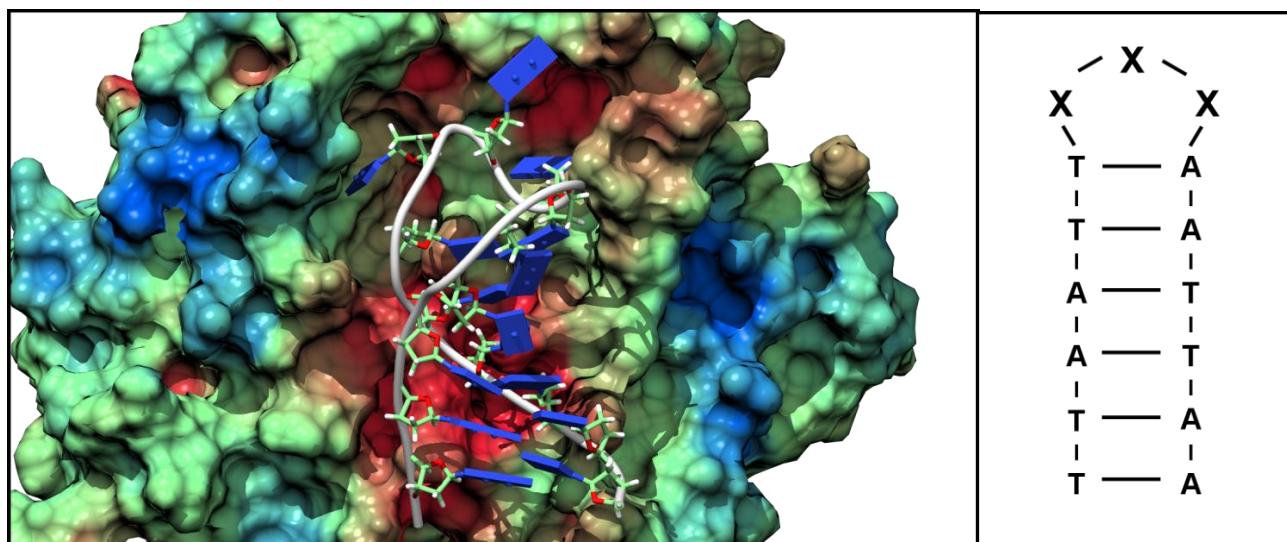


Рис. 8. Комплекс цитохрома P450 51A1 с 15-членным аптамером. Справа представлено схематичное изображение аптамера.

Таким образом, в результате моделирования были предложен набор 15-членных аптамеров цитохрома P450 51A1.

Экспериментальная валидация сконструированных аптамеров

Предложенные семь аптамеров были синтезированы, и их способность связывания с цитохромом P450 51A1 была проверена на оптическом биосенсоре. Результаты этой проверки представлены в таблице 2.

Было показано, что лучше всего связывались аптамеры, в повороте которых находились тринуклеотиды AGG и GGG (K_d 0,15 и 0,14 мкМ, соответственно), хуже всего - аптамер с ACA (K_d 1,3 мкМ). Сохранилась закономерность, что замена центрального гуанина в аптамере вызывает ослабление связывания олигонуклеотида с цитохромом (значения K_d для CAT и CGT составляют 0,6 и 0,28 мкМ, соответственно).

На рисунке 9 представлены зависимости рассчитанных величин ΔG из экспериментально полученных констант диссоциации со значениями оценочной функции Dock Score (Рис. 9А) и энергии связывания, рассчитанных методом ММ-РBSА (Рис. 9Б). Коэффициенты корреляции (R^2) составляли 0,66 и 0,78 для оценочной функции Dock Score и метода ММ-РBSА, соответственно.

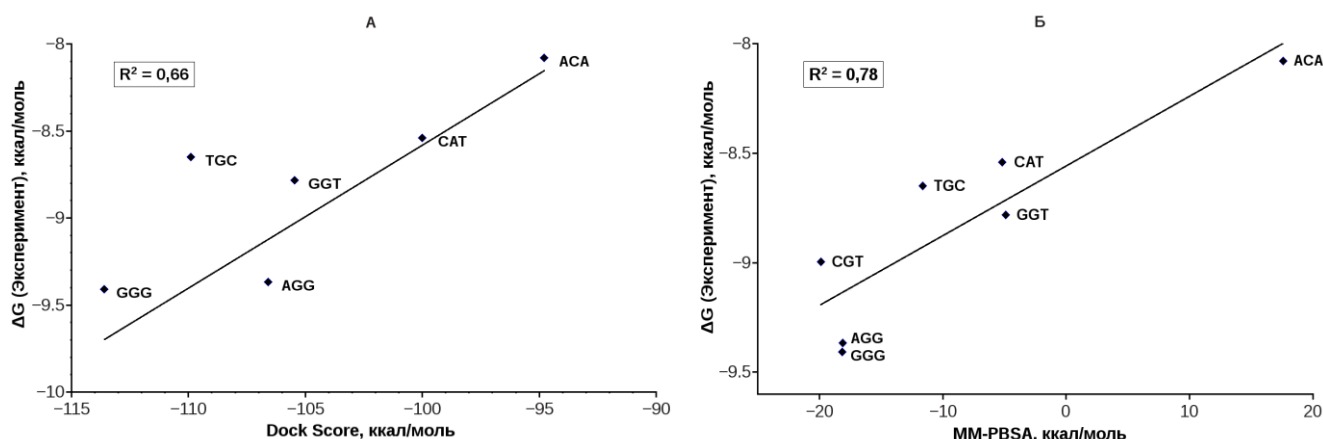


Рис. 9. Корреляция рассчитанных величин ΔG из экспериментальных констант диссоциации* комплексов цитохрома P450 51A1 с аптамерами и значений оценочной функции (Dock Score) (А) и значений свободной энергии взаимодействия ММ-PBSA (Б). (*Экспериментальные погрешности при пересчете в ΔG не превышали 0,09 ккал/моль, поэтому на графиках не показаны.)

Селективность предложенных аптамеров была оценена с использованием других белков микросомальной монооксигеназной системы (цитохром P450 3A4, цитохром P450-редуктаза и цитохром b5) и белков плазмы крови (альбумин и тромбин). Было обнаружено, что только цитохром P450 3A4 (представитель того же суперсемейства белков) был способен связываться с разработанными аптамерами для цитохрома P450 51A1. Анализ предполагаемых мест связывания аптамеров показал, что, несмотря на низкую гомологию, они обогащены положительно заряженными и ароматическими аминокислотными остатками. Ранее для цитохрома 2B4 было показано, что этот участок белка ответствен за взаимодействие с цитохромом b5 - общим партнером микросомальных цитохромов P450 [Ahuja et al., 2013]. По-видимому, несмотря на то, что цитохромы P450 51A1, 3A4 и 2B4 относятся к сильно дивергированному суперсемейству, они сохранили схожие физико-химические свойства и пространственную структуру для взаимодействия с общим партнером. Вероятнее всего, это и является причиной способности аптамеров, разработанных для цитохрома P450 51A1, взаимодействовать и с цитохромом P450 3A4. Но, поскольку структуры этих белков отличаются, можно ожидать, что дальнейшая оптимизация структур предложенных аптамеров приведет к повышению их селективности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе был предложен подход рационального конструирования аптамеров *in silico*. Он состоит из двух стадий. На первом этапе проводится поиск коротких олигонуклеотидов, которые в аптамере будут выполнять распознающую и связывающую функцию. Вторая

стадия заключается в подборе оптимальной структурной части, обеспечивающей стабильность пространственной конформации узнающей части.

Экспериментальная проверка предложенного подхода на примере цитохрома P450 51A1 показала его эффективность. В результате работы были впервые созданы аптамеры для белка из суперсемейства цитохромов P450.

ВЫВОДЫ

1. Разработан подход по рациональному компьютерному конструированию аптамеров *in silico*. Он заключается в последовательном конструировании узнающей части аптамера, ответственного за узнавание и связывания его с белком, и структурной части, поддерживающей пространственную укладку аптамера.
2. С применением разработанного подхода были *de novo* сконструированы аптамеры для цитохрома P450 51A1. Они представляют собой 15-членные олигонуклеотиды, имеющую пространственную структуру - “шпилька”. Экспериментальные значения K_d для этих аптамеров лежат в пределах $\sim 10^{-7} - 10^{-6}$ М. Показано, что данные аптамеры не взаимодействуют с рядом белков плазмы крови (альбумин и тромбин) и митохондриальной монооксигеназной системы (цитохром b_5 и цитохром P450-редуктаза), но были способны связываться с цитохромом P450 3A4.
3. Методами компьютерного моделирования было показано, что, в отличие от тромбина, претромбин-2 способен связываться только с одним из двух конформеров ТВА. Это обусловлено повышенной подвижностью контактирующих с аптамером аминокислотных остатков претромбина-2.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Щербинин Д.С., Веселовский А.В. Исследование механизма взаимодействия тромбин-связывающего аптамера с тромбином и претромбином-2 методом молекулярной динамики. // БИОФИЗИКА, 2013, Т. 58, № 3, С. 415–424.
- 1.A D. S. Shcherbinin and A. V. Veselovsky. Investigation of Interaction of Thrombin-Binding Aptamer with Thrombin and Prethrombin-2 by Simulation of Molecular Dynamics. // Biophysics, 2013, Vol. 58, No. 3, pp. 315–323.
2. Sergey V. Stulov, Olga V. Mankevich, Roman A. Novikov [b](#), Yaroslav V. Tkachev, Vladimir P. Timofeev, Nikita O. Dugin, Vladimir F. Pozdnev, Irina V. Fedushkina, Dmitri S. Scherbinin, Alexander V. Veselovsky, Alexander Yu. Misharin. Synthesis and molecular modeling

of (40R)- and (40S)- 40-substituted 20-{[(E)-andro-5-en-17-ylidene]-methyl}oxazolines // Steroids, 2013, Vol. 78, No 5, pp. 521–527.

3. 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 constructions of anti-thrombin aptamers as model biorecognizing elements with enhanced affinity for biosensing. // Материалы The Sixth international conference of bioinformatics of genome regulation and structure (BGRS'2008). Novosibirsk, Russia, June 22-28, 2008. p. 203.
4. Щербинин Д.С. Исследование взаимодействия аптамера с экзосайтами тромбина. // Материалы Национальной конференции «Информационно-вычислительные технологии в решении фундаментальных научных проблем и прикладных задач, Сессия ИВТН-2010». М., 2010, 9.
5. Щербинин Д.С., Веселовский А.В. Изучение взаимодействий аптамера с экзосайтами тромбина методами молекулярной динамики. // Материалы XIX Российского национального конгресса "Человек и лекарство", 11-15 апреля 2011 г., Москва, стр. 564-565.
6. Щербинин Д.С. Гнеденко О.В., Воронина С.А., Радько С.П., Иванов А.С., Веселовский А.В "Метод предсказания de novo структуры аптамеров, связывающихся с белками", // Материалы Международной научно-практической конференции "Фармацевтические и медицинские биотехнологии", 20-22 марта 2012, Москва, стр. 58-59.
7. Щербинин Д.С., Веселовский А.В. Моделирование комплексов тромбин-связывающего аптамера с тромбином и претромбином-2 методом молекулярной динамики. // Сб. трудов III междунар. Интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии», 19-22 ноября 2012, Казань, Казанский университет, 2013, Т. 2, С. 327-331.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки (соглашение №8274)