

УДК 577.112; 577.18

СТРУКТУРА G-КВАДРУПЛЕКСНОГО ДНК-АПТАМЕРА К ТРОМБИНУ RA36

А.В. Юминова, И.Г. Смирнова, А.М. Арутюнян, А.М. Копылов, А.В. Головин,
Г.В. Павлова

(кафедра химии природных соединений; sig@genebee.msu.ru)

Изучена структура 31-звенного аптамерного олигонуклеотида (RA36), более эффективно ингибирующего коагулянтную активность тромбина по сравнению с широкоизвестным аптамером 15TGT (Thrombin binding aptamer). Аптамер RA36 имеет двухмодульную структуру, в состав которой входят две G-богатых области, способные формировать квадруплекс. Методом кругового дихроизма показано, что аптамер RA36 формирует G-квадруплекс, аналогичный G-квадруплексу 15TGT. Изучена термическая стабильность G-квадруплекса RA36. При физиологических условиях (концентрация стабилизирующего катиона 5 мМ) температура плавления G-квадруплексов RA36 значительно ниже, чем 15TGT. Спектры КД делеционных мутантов этого олигонуклеотида подтверждают двухмодульное строение RA36, т.е. образование G-квадруплекса в структуре аптамера RA36 как первым, так и вторым G-богатым участком.

Ключевые слова: G-квадруплекс, ДНК, аптамеры, круговой дихроизм, термостабильность.

Список сокращений: КД – круговой дихроизм, ПААГ – полиакриламидный гель, 15TGT – 15-звенный олигонуклеотид, связывающий тромбин; RA36 – 31-звенный олигонуклеотид, связывающий тромбин; РСА – рентгеноструктурный анализ, НК – нуклеиновая кислота.

Способность однотяжевых НК копироваться, а также формировать сложные третичные структуры определила возникновение новой технологии SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) [1–5]. С помощью метода SELEX отбирают небольшие молекулы НК – аптамеры, которые по специфичности и аффинности являются функциональными аналогами антител. Аптамеры способны образовывать стабильные комплексы с разными мишенями: клетками, белками, низкомолекулярными веществами. В случае ферментов, в частности протеиназ, аптамеры используют в качестве ингибиторов.

Тромбин – многофункциональная сериновая протеиназа, участвующая в коагулянтном каскаде крови, первая протеиназа, для которой были получены аптамерные ингибиторы [6–8].

С помощью ЯМР-спектроскопии и РСА было показано, что связывающий тромбин 15-звенный аптамер dGGTTGGTGTGGTTGG (15TVA) образует G-квадруплекс [7–10]. Восемь гуанинов образуют два плоских G-квартета с тремя петлями: петля TGT и две симметричные петли TT.

Спектры КД антипараллельных G-квадруплексов имеют характерные положительные максимумы при 294 и 248 нм и отрицательный экстремум при 265 нм [11–15].

G-квадруплексы стабилизируются посредством тесного взаимодействия катионов с остатками гуанина [16–17]. Катионы координируются атомами кислорода (O_6) карбонильных групп гуанинов между плоскостями соседних G-квартетов, причем ион калия представляется наиболее подходящим для стабилизации подобных структур среди одновалентных ионов [13].

Проведено систематическое исследование 15TVA и его производных, у которых варьировали длину петель [14]. Показано, что при длине петель менее 5 нуклеотидов образуется параллельный G-квадруплекс, в остальных случаях – квадруплексы антипараллельного и смешанного типов. Введение в структуру 15TVA химических модификаций по определенным положениям также может приводить к формированию параллельного G-квадруплекса [18].

В спектре КД 15TVA, полученном в присутствии его комплементарной цепи ДНК, положения максимума (294 нм) и минимума (267 нм) смещаются в коротковолновую область (до 280 и 252 нм соответственно), что отвечает спектрам КД двутяжевой ДНК [11].

Для работы мы выбрали 15- и 31-звенный аптамеры. Ранее ингибирующее действие RA36 было охарактеризовано по его влиянию на продолжительность тромбинового времени, которое используется в клиниках для контроля терапии ингибиторами тромбина [19, 20]. RA36 можно

рассматривать как двухмодульную молекулу, в которой оба G-богатых участка могут формировать G-квадруплекс. Однако в настоящее время данные о структуре аптамера RA36 отсутствуют, поэтому цель настоящей работы состояла в изучении конформационной стабильности RA36 методом кругового дихроизма.

Экспериментальная часть

Материалы и методы. Для работы использовали олигодезоксирибонуклеотиды, синтезированные и очищенные в ПААГ («Синтол», Россия), структуры приведены в таблице.

Спектры КД измеряли на CD-спектрометре «CHIRASCAN» («Applied Photophysics Ltd.», Великобритания) и модифицированном дихрографе «MARK-5» («Jobin-Yvon», Франция). Регистрацию проводили в интервале длин волн от 220 до 350 нм (в кювете с длиной оптического пути 1 см) и в интервале температур от 4 до 80°C. Обработку изображений и математических данных проводили с помощью программ «JImage», «Gimp», «GraphWork» и «Origin 8.0».

Результаты и обсуждение

Спектр КД 15TGT показан на рис. 1, Б, который совпадает с типичным спектром КД мономолекулярного антипараллельного G-квадруплекса [8–12]. В спектре КД RA36 (рис. 1, А) наблюдаются максимумы при 294 и 247 нм и минимумы при 267 и 230 нм, что полностью соответствует спектру КД 15TGT (рис. 1, Б). Но в отличие от 15TGT амплитуда максимума при 294 нм в спектре КД RA36 больше на 25–35%. Этот эффект можно объяснить формирова-

нием двух квадруплексов. Исследована структура ряда аналогов RA36, полученных путем укорочения последовательности RA36 по 3'- или 5'-концу. Аптамеры RA36_51, RA36_52 и RA36_53, полученные делецией 1-, 2- и 3-нуклеотидов с 5'-конца последовательности RA36, также имеют спектры КД с экстремумами, характерными для антипараллельного G-квадруплекса. Таким образом, при наличии вырожденного паттерна на 5'-конце второй G-квадруплексный паттерн образует G-квадруплекс (рис. 2). Как показано на рис. 3, температура плавления G-квадруплекса при уменьшении длины вырожденного паттерна изменяется незначительно: 23,5±0,3°C, 24,9±0,2°C и 24,0±0,9°C для аптамеров RA36_51, RA36_52 и RA36_53 соответственно.

Аптамеры RA36_31, RA36_32 и RA36_33, полученные делецией соответственно 1-, 2- и 3-нуклеотидов с 3'-конца последовательности RA36, также имеют спектры КД с экстремумами, характерными для антипараллельного G-квадруплекса. Таким образом, при наличии вырожденного паттерна на 3'-конце второй G-квадруплексный паттерн также образует G-квадруплекс (рис. 4). Температура плавления G-квадруплекса при уменьшении длины вырожденного паттерна изменяется незначительно (рис. 3): 18,1±0,3°C, 18,0±1,0°C и 17,8±0,5°C для аптамеров RA36_31, RA36_32 и RA36_33 соответственно. При одновременной делеции по 1 нуклеотиду с 3'- и 5'-концов (RA36_31_51), когда оба паттерна являются вырожденными, полностью исчезает максимум КД при 294 нм (рис. 5), характеризующий квадруплексную структуру, а значит G-квадруплекс не образуется, что коррелирует с полученными ранее данными об отсут-

Исследуемые аптамерные олигодезоксирибонуклеотиды

Название олигодезоксирибонуклеотида	Первичная структура, 5'-3'
15TGT	dGGTTGGTGTGGTTGG
RA36	dGGTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG
RA36_51	dGTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG
RA36_52	dTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG
RA36_53	dTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG
RA36_31	dGGTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG
RA36_32	dGGTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG
RA36_33	dGGTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG
RA36_51_31	dGTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG

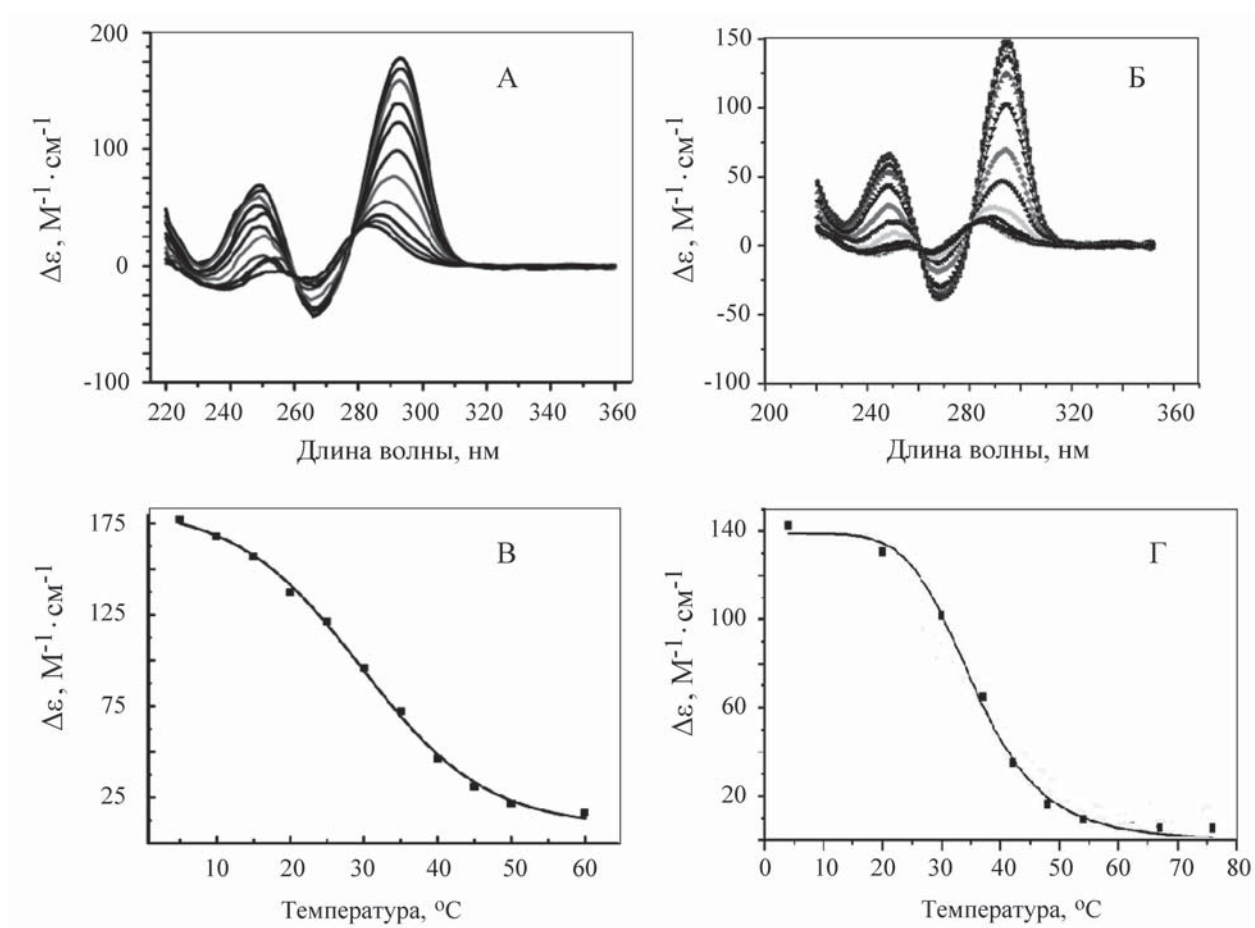


Рис. 1. А – спектры КД аптамера RA36 в диапазоне температур от 5 до 50°C с шагом 5°C (буфер 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl); Б – спектры КД аптамера 15TGT в диапазоне температур от 5 до 50°C с шагом 5°C (буфер 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl); В – термостабильность G-квадруплексной структуры аптамера RA36 (длина волны 295 нм); Г – термостабильность G-квадруплексной структуры аптамера 15TGT (длина волны 295 нм)

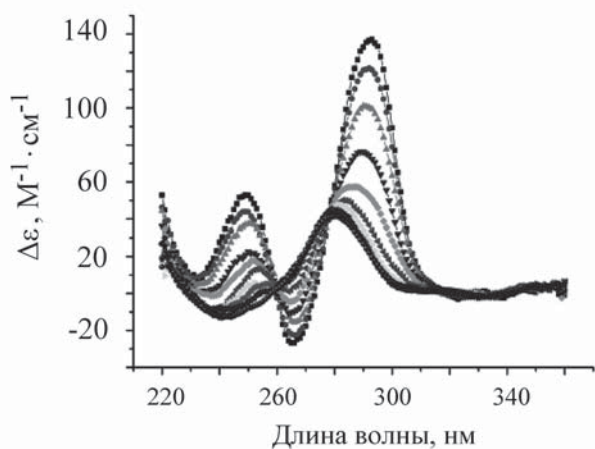


Рис. 2. Спектры КД аптамера RA36_31 в диапазоне температур от 5 до 50°C с шагом 5°C (буфер 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl)

ствии физиологической активности этого ДНК-олигонуклеотида [21].

Температура плавления, рассчитанная по изменению амплитуды при 294 нм, аптамера RA36 значительно ниже, чем 15TGT (30,0 и 39,0°C соответственно), что указывает на дестабилизирующее влияние дополнительного G-богатого квадруплексного участка у RA36 на стабильность квадруплексной структуры. Очевидно, что один из двух квадруплексных модулей становится менее стабилен, чем 15TGT. Делеции дезоксирибонуклеотидов по 3'-концу обладают большим дестабилизирующим действием, чем делеции по 5'-концу, что выражается в снижении температуры плавления G-квадруплексных структур (рис. 5). Делеционный анализ позволяет предположить, что квадруплекс находящийся на 3'-части RA-36 более стабилен, чем квадруплекс расположенный на 5'-конце. Ин-

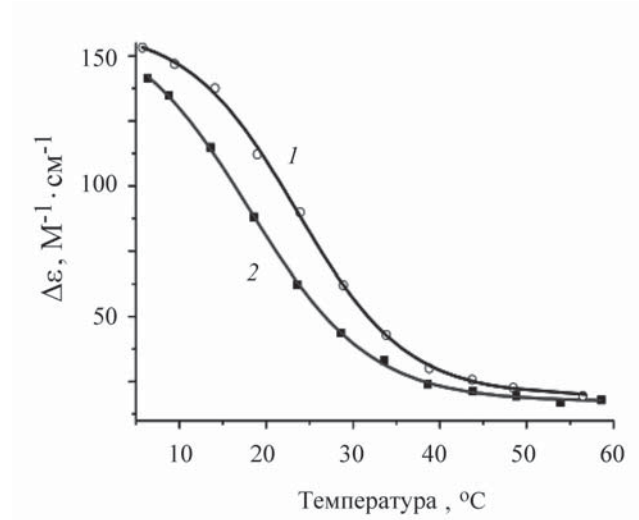


Рис. 3. Термостабильность G-квадруплексной структуры аптамеров: 1 – RA36_31 ($T_m = 23,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$) и 2 – RA36_51 ($T_m = 18,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$), длина волны 295 нм

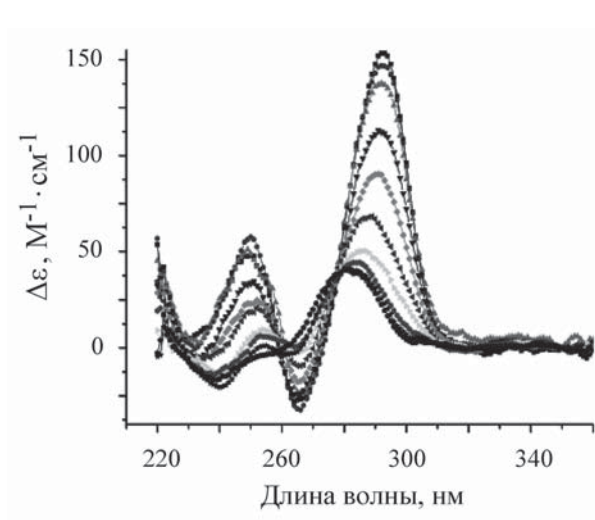


Рис. 4. Спектры КД аптамера RA36_51 в диапазоне температур от 5 до 50°C с шагом 5°C (буфер 20 мМ Трис-НСI (рН 7,5), 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl)

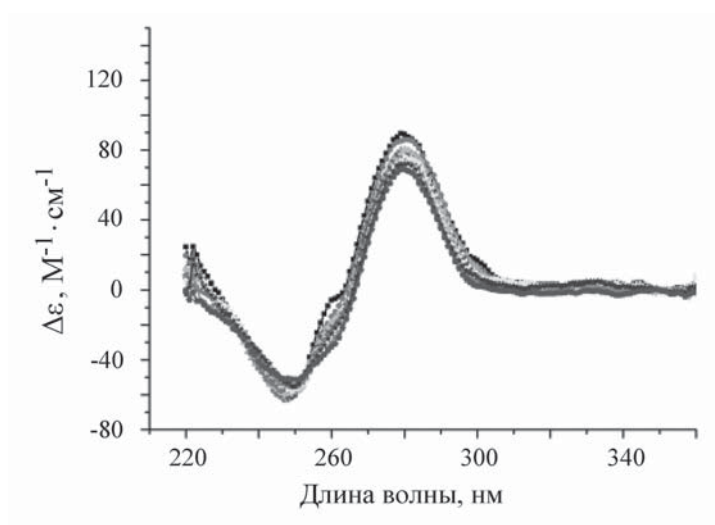


Рис. 5. Спектры КД аптамера RA36_31_51 в диапазоне температуры от 5°C до 50°C с шагом 5°C , в буфере 20 мМ Трис-НСI (рН 7,5), 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl

интересно отметить, что структурная стабильность прямо коррелирует с ингибирующей активностью делеционных мутантов описанных ранее [21].

Аптамер RA36 образует антипараллельный G-квадруплекс, менее стабильный, чем G-квадруплекс широкоизвестного аптамера 15TGT (15TBA). G-квадруплекс может быть образован как первым, так и вторым G-квадруплексным паттерном последовательности

GTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG.

Влияние дополнительных дезоксирибонуклеотидов на G-квадруплекс не равнозначно относительно хода цепи: наличие дополнительной G-богатой последовательности на 5'-конце последовательности в меньшей степени дестабилизирует G-квадруплекс аптамера, чем аналогичная дополнительная последовательность на 3'-конце. Для эффективной разработки антикоагулянтных препаратов необходимо понимание причин, определяющих структуру и свойства аптамеров к тромбину.

Работа была поддержана грантом РФФИ (проект № 14-04-01757 а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burke J.M., Bezzal-Herranz A. // FASEB J. 1993. 7. P. 106.
- Breaker R.R., Joyce G.F. // TIBTECH. 1994. 12. P. 268.
- Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O., Yarus M. // Annu. Rev. Biochem. 1995. 64. P. 763.
- Osborne S. E., Matsumura I., Ellington A. D. // Curr. Opin. Chem. Biol. 1997. 1. P. 5.
- Копылов А.М., Спиридонова В.А. // Молекулярная биология. 2000. 34. С. 1097.
- Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J. // Nature. 1992. 355. P. 564.
- Tasset D.M., Kubik M.F., Steiner W. // J. Mol. Biol. 1997. 272. P. 688.
- Macaya R.F., Schultze P., Smith F.W., Roe J. A., Feigon J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1993. 90. P. 3745.
- Padmanabhang K., Padmanabhang K.P., Ferrarag J.D., Sadled J.E., Tulinsky A. // J.B.C. 1993. 268. P. 17651.
- Padmanabhang K., Tulinsky A. // Acta Crystallogr., Sect. D. 1996. 52. P. 272.
- Berova N., Nakanishi K., Woody R.W. // Circular Dichroism: Principles and Applications. Weinheim, 2000. P. 724.
- Kumar N., Maiti S. // BBRC. 2004. 319. P. 759.
- Kankia B.I., Marky L.A. // J. Am. Chem. Soc. 2001. 123. P. 10799.
- Smirnov I.V., Shafer R.H. // J Mol Biol. 2000. 296. P. 1.
- Smirnov I.V., Shafer R.H. // Biochemistry. 2000. 39. P. 1462.
- Chen F.-M. // Biochemistry. 1992. 31. P. 3769.
- Basu S., Szewczak A.A., Cocco M., Strobel S.A. // J. Am. Chem. Soc. 2000. 122. P. 3240.
- Peng C.G., Damha M.J. // Nucleic Acids Res. 2007. 35. N 15. P. 4977.
- Savchik E.Y., Kalinina T.B., Drozd N.N., Makarov V.A., Zav'yalova E.G., Lapsheva E.N., Mudrik N.N., Babij A.V., Pavlova G.V., Golovin A.V., Kopylov A.M. // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. 156. N 1. P. 44.
- Головин А., Решетников Р., Завьялова Е., М. Копылов А., Павлова Г., Бабий В. Пат. РФ. № 2429293. М., 2009.
- Zavyalova E., Golovin A., Pavlova G., Kopylov A. Module-Activity Relationship of G-quadruplex Based DNA Aptamers for Human Thrombin // Current Medicinal Chemistry. 2013. 20. N 38. P. 4836.

Поступила в редакцию 10.10.14

THE STRUCTURE OF G-QUADRUPLEX THROMBIN BINDING DNA-APTAMER RA36

A.V. Yuminova, I.G. Smirnova, A.M. Arutyunyan, A.M. Kopylov, A.V. Golovin, G.V. Pavlova

(Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University; Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology Lomonosov Moscow State University; Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, APTO-PHARM, LTD)

The structure of 31-mer aptameric DNA-oligonucleotide RA36 has been studied. This aptamer more effectively inhibits coagulant activity of thrombin compared with widely known aptamer 15TGT (Thrombin binding aptamer). RA36 aptamer has two-pattern structure, which includes two G-rich regions capable of forming G-quadruplex. We showed by Circular dichroism that the aptamer RA36 forms a antiparallel G-quadruplex similar the G-quadruplex of 15TGT. Under physiological conditions (concentration of the stabilizing cation 5 mM) the thermal stability of G-quadruplex RA36 significantly lower than 15TGT. Double-quadruplex structure of RA36 is confirmed by CD spectra of deletion mutants, ie G-quadruplex formation could be both the first and second G-rich site of the aptamer RA36.

Key words: G-quadruplex, DNA, aptamers, circular dichroism, thermal stability

Сведения об авторах: Юминова Алина Валерьевна – мл. науч. сотр. ООО «АПТО-ФАРМ», канд. хим. наук (yumatina@gmail.com); Смирнова Инна Григорьевна – доцент кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, канд. хим. наук (sig@genebee.msu.ru); Арутюнян Александр Мигранович – вед. науч. сотр. НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ, канд. физ.-матем. наук (alarut@genebee.msu.ru), Копылов Алексей Михайлович – профессор кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, докт. хим. наук (korylovalex@gmail.com); Головин Андрей Викторович – ст. препод. факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, канд. хим. наук (golovin@belozersky.msu.ru); Павлова Галина Валерьевна – вед. науч. сотр. ООО «АПТО-ФАРМ», докт. биол. наук (lkorochkin@mail.ru).