

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.113.6

©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРОМБИНА С АНТИТРОМБИНОВЫМИ АПТАМЕРАМИ И ИХ ГЕТЕРОДИМЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ

С.Ю. Рахметова, С.П. Радько, О.В. Гнеденко, Н.В. Бодоев,
А.С. Иванов, А.И. Арчаков*

Учреждение Российской академии медицинских наук научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: (499) 246-71-15; факс: (499) 245-08-57; эл. почта: radko@ibmc.msk.ru

Аптамеры, селективно взаимодействующие с анион-связывающими экзосайтами 1 и 2 тромбина, объединяли в димерные олигонуклеотидные конструкции с помощью поли-(dT)-линкера длиной 35 нуклеотидов. Образование комплексов тромбина с аптамерами и их гетеро- и гомодимерными конструкциями измеряли на оптическом биосенсоре Bioscye-3000. Значения K_D , полученные для гетеро- и гомодимерных конструкций были соответственно в 25-30 раз и 2-3 раза ниже значений K_D для исходных аптамеров. Анализ температурных зависимостей K_D в интервале 10°C–40°C показал, что аффинность увеличивается с понижением температуры. При этом изменение энтальпии ΔH при образовании комплексов тромбина с аптамерами и гетеродимерной конструкцией было практически одинаково. Значение изменения энтропии ΔS при образовании комплекса тромбина с гетеродимерной конструкцией было в 1,5-2 раза выше, чем значение ΔS для комплексов с аптамерами. При возрастании температуры с 10°C до 37°C скорости как образования, так и распада комплексов увеличивались. При этом скорость диссоциации комплекса тромбин с гетеродимерной конструкцией была заметно ниже, чем для комплексов с аптамерами, при обеих температурах.

Ключевые слова: аптамеры, тромбин, гетеродимерная конструкция, аффинность, термодинамика.

ВВЕДЕНИЕ. Аптамеры представляют РНК- или ДНК-(олиго)нуклеотиды обычно размером от 20 до 80 нуклеотидов (нт), которые способны образовывать устойчивые трехмерные структуры, и обладающие сродством к заданной молекулярной мишени [1, 2]. Их находят в библиотеках случайных нуклеотидных последовательностей методом селекции *in vitro*, известным как SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), при этом аффинность получаемых аптамеров сравнима в среднем с аффинностью моноклональных антител [1]. Аптамеры рассматривают как потенциальные терапевтические средства благодаря их способности ингибировать функциональную активность мишени и как новый класс аффинных реагентов для диагностических целей в медицине [2, 3]. Их использование в качестве “биоузнающих элементов” биосенсоров и биочипов для детекции белков представляется крайне перспективным, поскольку аптамеры

* - адресат для переписки

обладают рядом технологических преимуществ перед антителами, среди которых в первую очередь следует отметить легкость ориентированной иммобилизации и способность к многократной регенерации без потери аффинности [2]. В силу того, что аптамеры являются химически синтезированными олигонуклеотидами, они могут быть легко объединены в молекулярные конструкции, содержащие более одного аптамера, как в процессе синтеза, так и постсинтетически. Известен ряд успешных попыток создания аптамерных конструкций [4-14], в том числе гетеродимерных конструкций, объединяющих две аптамерные последовательности, узнающие различные участки поверхности одного белка [9-14]. Наибольший интерес был проявлен к гетеродимерным конструкциям антитромбиновых ДНК-аптамеров [10-14]. Антитромбиновые аптамеры эффективно ингибируют протеолитическую активность тромбина – многофункциональной протеазы, участвующей в регуляции гомеостаза – и рассматриваются как перспективные антикоагулянты для терапевтического применения [15]. С другой стороны, они являются привлекательной модельной системой для изучения взаимодействия гетеродимерных аптамерных конструкций с белком-мишенью как в растворе, так и при их иммобилизации на рабочих поверхностях биосенсоров и микрочипов [2]. Два антитромбиновых аптамера, селективно узнающих соответственно анион-связывающие экзосайты 1 и 2 тромбина, были использованы до настоящего времени для создания гетеродимерных аптамерных конструкций с помощью линкеров как нуклеотидной [10, 11, 14], так и ненуклеотидной [12, 13] природы. Как правило, такие конструкции показывали усиление как сродства к тромбину [10, 11, 13, 14], так и способности ингибировать его протеолитическую активность [10, 12]. При включении фотоаптамера к тромбину в гетеродимерную конструкцию, концентрационный порог детекции фотоиндуцированных ковалентных комплексов понижался на два порядка [14].

В настоящее время известно несколько работ, где проводился термодинамический анализ взаимодействия аптамер–молекулярная мишень. В большинстве случаев мишени представляли низкомолекулярные соединения [16-20]. В случае белковых мишеней, термодинамический анализ взаимодействия был выполнен для Таq-полимеразы [21] и тромбина [22]. Энергетика процессов, связанных с молекулярными механизмами взаимодействия белка-мишени с гетеродимерной аптамерной конструкцией, лежащими в основе усиления аффинности, до настоящего времени не исследовалась. В настоящей работе методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) был проведён сравнительный термодинамический анализ взаимодействия тромбина с антитромбиновыми аптамерами и их гетеродимерной конструкцией.

МЕТОДИКА. Синтез и очистку олигонуклеотидов проводили, как описано ранее [14]. Последовательности использованных в работе антитромбиновых аптамеров и их обозначения приведены ниже. Аптамер A1 – 5'-TCAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGA CT-3'; аптамер A2 – 5'-ATGTCTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG-3'. Выделенные жирным шрифтом последовательности аптамеров A1 и A2 идентичны соответственно последовательностям аптамера, полученного Tasset и соавт. (узнающего селективно экзосайт 2) [23] и аптамера G15, полученного Bock и соавт. (узнающего селективно экзосайт 1 тромбина) [24]. Аптамер A2 содержит дополнительно фланкирующие последовательности, способные образовывать дуплекс (подчёркнуты) по аналогии с антитромбиновыми ДНК-аптамерами, полученными Масауа и соавт. [25]. Гетеродимерную аптамерную конструкцию A1(35)A2 получали, синтезируя олигонуклеотиды, состоящие из аптамерных последовательностей A1 и A2 (считая с 5'-конца), соединённых поли-(dT)-линкером протяжённостью 35 нт. Гомодимерные конструкции получали, объединяя аналогичным способом две идентичные аптамерные последовательности и обозначали как A1(35)A1 или A2(35)A2. Во всех конструкциях во второй аптамерной последовательности (считая с 5'-конца) отсутствовали нуклеотиды, выделенные курсивом.

Олигонуклеотидные последовательности были биотинилированы с 5'-конца в процессе синтеза. Взаимодействие тромбина с иммобилизованными аптамерами и их димерными конструкциями исследовали на оптическом биосенсоре Biacore 3000 (GE, США), работающем на принципе ППР, как описано ранее [14]. Типичные сенсограммы представлены на рис. 1. Все измерения были выполнены в буфере, содержащем 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-HCl, (pH 7,5), 20 мкМ бычьего сывороточного альбумина. Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов тромбина с аптамерами и димерными конструкциями вычисляли методом нелинейной регрессии из уравнения [26]:

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

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 использовали значения R_{eq} , полученные из сенсограмм для 7 и более концентраций тромбина. Изменение энтальпии и энтропии реакции связывания тромбина с аптамерами A1, A2 и аптамерной конструкцией A1(35)A2 вычисляли методом линейной регрессии из температурных зависимостей равновесной константы диссоциации комплексов 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 – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура.

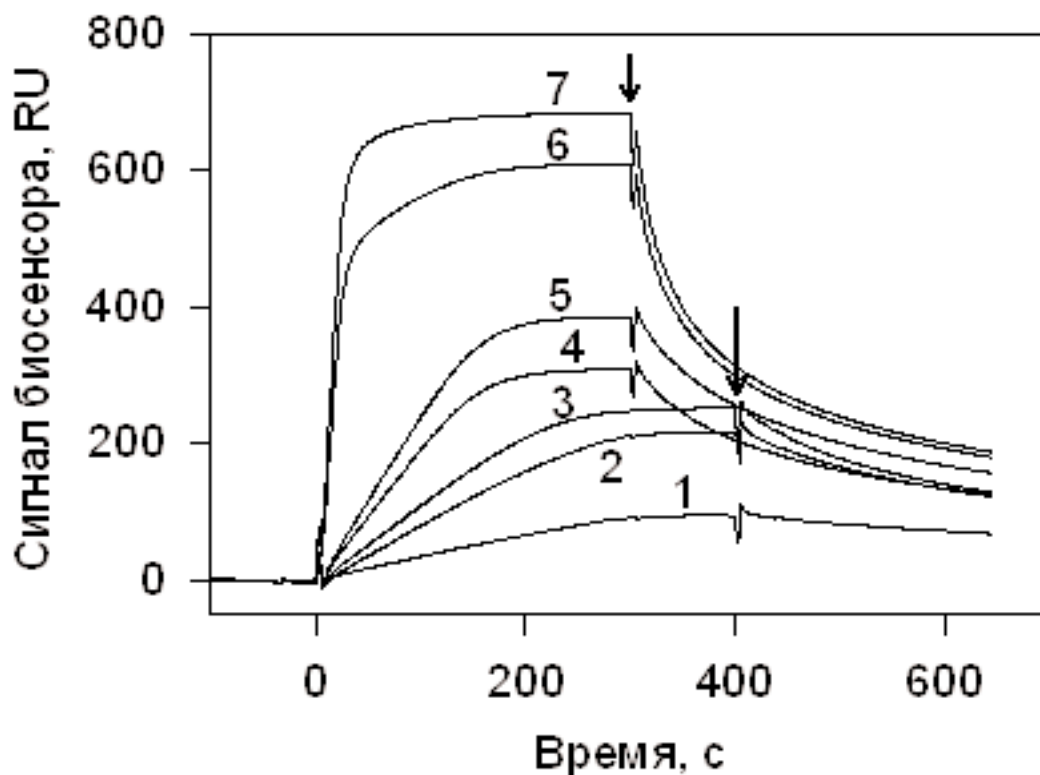


Рисунок 1.

Типичные сенсограммы. Иммобилизованный аптамер – A1. Концентрация тромбина в инжектируемом растворе: 1 – 2 нМ; 2 – 5 нМ; 3 – 7 нМ; 4 – 10 нМ; 5 – 20 нМ; 6 – 75 нМ; 7 – 100 нМ. Нулевое время соответствует началу инъекции раствора тромбина. Стрелками показано начало инъекции буферного раствора, не содержащего тромбин. Скорость потока – 5 мкл/мин.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРОМБИНА С АНТИТРОМБИНОВЫМИ АПТАМЕРАМИ

РЕЗУЛЬТАТЫ. В таблице 1 приведены значения K_D для комплексов тромбина с аптамерами и их димерными конструкциями. Объединение аптамеров в гетеродимерную конструкцию A1(35)A2 приводит к приблизительно 25-30-кратному уменьшению значений K_D . Гомодимерные конструкции характеризовались 2-3-кратным усилением аффинности по сравнению с аптамерами. На рисунке 2 приведены сенсограммы, полученные для аптамеров и гетеродимерной конструкции при температурах 10°C и 37°C. С повышением температуры образование комплексов и их распад происходят с большей скоростью. В обоих случаях скорость диссоциации комплекса тромбин/гетеродимерная конструкция заметно меньше, чем для комплексов с аптамерами (рис. 2). На рисунке 3 приведены температурные зависимости K_D для аптамеров A1 и A2 и конструкции A1(35)A2. Зависимости константы диссоциации от обратной температуры ($1/T$) в полулогарифмическом масштабе имели близкий наклон как для A1 и A2, так и A1(35)A2. При этом значения K_D для конструкции лежат на графике существенно ниже. Полученные оценки изменения энтальпии и энтропии при формировании комплексов приведены в таблице 2. Комплексообразование характеризуется отрицательными значениями как ΔH , так и $-T\Delta S$. Абсолютные значения энтальпийной составляющей изменения свободной энергии близки для A1, A2 и A1(35)A2. Более низкое значение изменения свободной энергии реакции комплексообразования ΔG по сравнению с аптамерами в случае конструкции A1(35)A2 определяется увеличением значения изменения энтропии реакции ΔS (табл. 2).

Таблица 1. Равновесные константы диссоциации (K_D) антитромбиновых аптамеров и их димерных конструкций.

Лиганд	A1	A2	A1(35)A2	A1(35)A1	A2(35)A2
K_D , нМ	11 ± 3	9 ± 2	$0,4 \pm 0,1$	5 ± 1	3 ± 1

Примечание: измерения выполнялись при 37°C. Представлены средние значения \pm средноквадратичное отклонение, полученные из трёх независимых экспериментов.

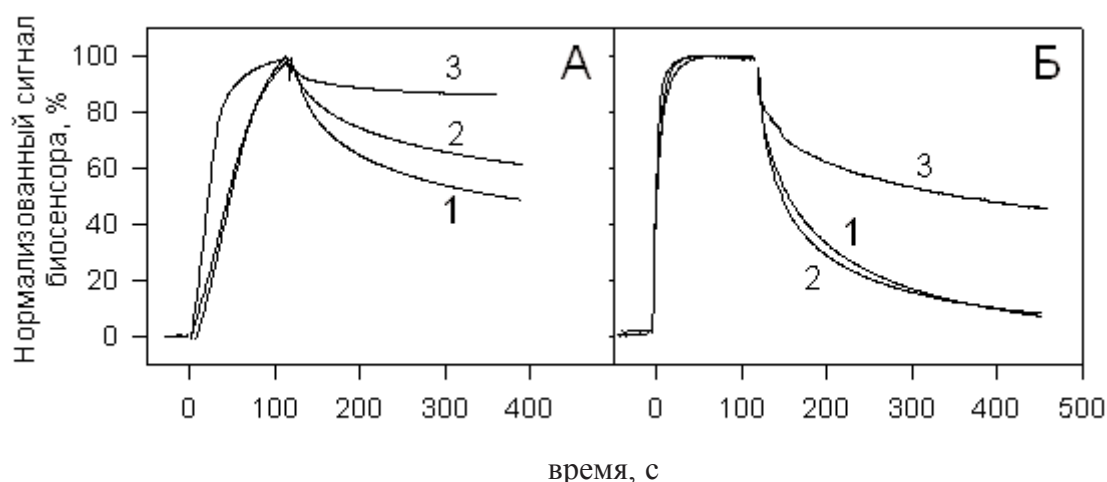


Рисунок 2.

Нормализованные сенсограммы. Значения сигнала биосенсора в момент остановки инъекции раствора тромбина приняты за 100%. Имобилизованные олигонуклеотиды: 1 – A1, 2 – A2, 3 – A1(35)A2. Концентрация тромбина – 50 нМ. Скорость потока – 20 мкл/мин. Панель А – 10°C; панель Б – 37°C.

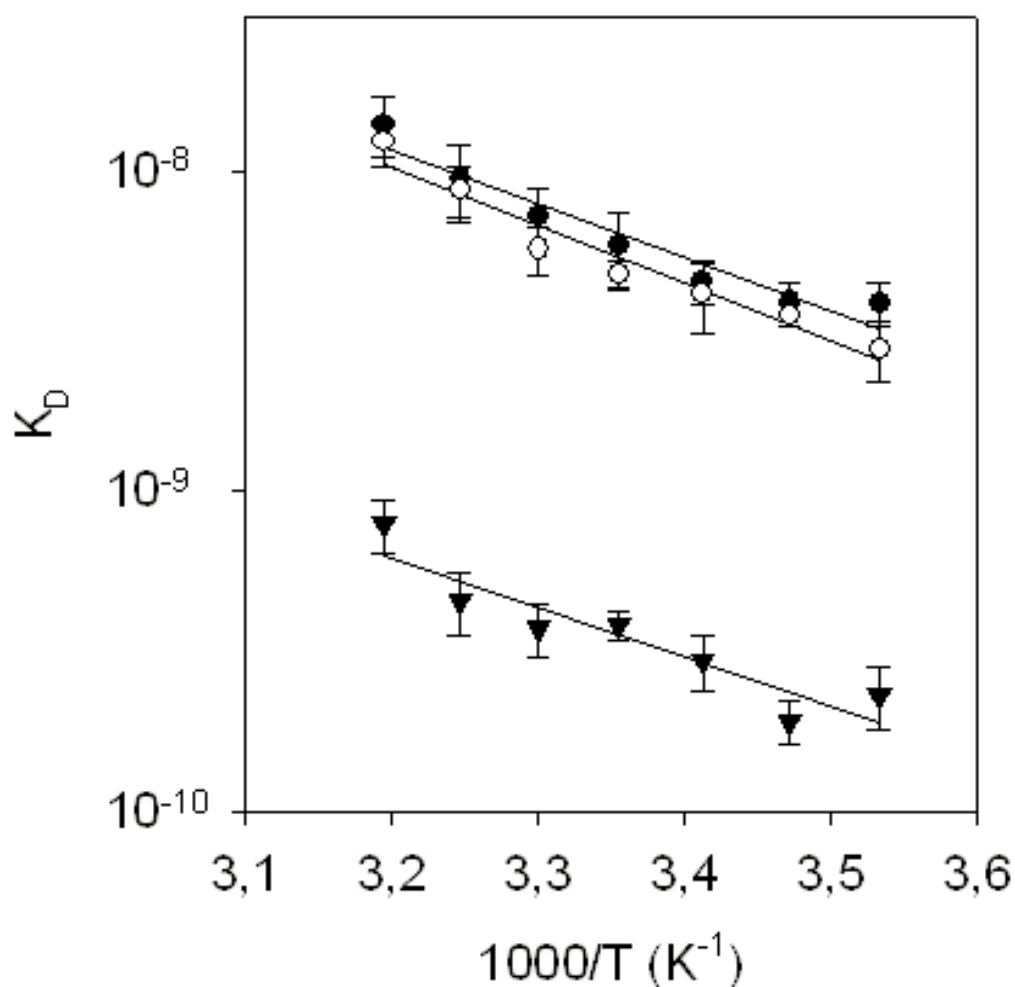


Рисунок 3.

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.

Таблица 2. Изменения энтальпии и энтропии при образовании комплексов тромбина с иммобилизованными аптамерами A1 и A2 и аптамерной гетеродимерной конструкцией A1(35)A2.

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

ОБСУЖДЕНИЕ. Ранее было показано, что объединение аптамеров A1 и A2 в гетеродимерные конструкции с помощью поли-(dT)-линкера приводит к усилению сродства к тромбину [14]. При длинах линкера от 35 до 55 нт, средние значения константы диссоциации комплексов тромбина с конструкциями достигали минимума ($K_D=0,2-0,4$ нМ) и были приблизительно в 30 раз меньше, чем для исходных аптамеров. Гетеродимерные конструкции состоят из двух аптамеров, которые, как считается, селективно взаимодействуют с экзосайтами тромбина, расположенными приблизительно на противоположных сторонах белковой молекулы [23-25]. Усиление аффинности может определяться тем, что при определённых длинах линкера становится возможным формирование двух контактов между молекулой тромбина и гетеродимерной конструкцией [14].

Оценка термодинамических параметров связывания тромбина с иммобилизованными аптамерами A1 и A2 (рис. 1) показала, что реакция комплексообразования характеризуется отрицательными значениями как ΔH , так и $-T \cdot \Delta S$ (табл. 2). То, что энтропия наряду с энтальпией может быть движущей силой комплексообразования, хорошо известно. Например, образование комплексов тромбомодулин/тромбин практически определяется только изменением энтропии, связанным с десольватацией и высвобождением ионов в местах контакта молекул [27].

В случае гетеродимерной конструкции A1(35)A2, вклад энтропийной составляющей ($-T \cdot \Delta S$) в изменение свободной энергии реакции комплексообразования ΔG возрастает, в то время как вклад энтальпийной составляющей (ΔH) практически не меняется. Таким образом, наблюдаемое усиление аффинности гетеродимерной конструкции полностью определяется изменением энтропии, а не энтальпии, как можно было бы ожидать, исходя из мнемонических изображений комплекса, на которых оба аптамера конструкции одновременно связаны с молекулой белка [12, 13]. Механистическое объяснение усиления аффинности может быть дано в рамках концепции “эффективной” или “локальной” концентрации, лежащей в основе теоретического описания связывания “бивалентного” лиганда с “бивалентным” рецептором [28, 29]: после возникновения контакта по одной паре сайтов взаимодействия, образование второго контакта будет определяться не только аффинностью сайтов, но и тем, что их локальная концентрация высока. В случае гетеродимерной конструкции, тромбин, связанный с одним из аптамеров конструкции, имеет высокую вероятность образовать второй контакт с конструкцией из-за высокой локальной концентрации другого аптамера. Если возникновение этого контакта сопряжено с нарушением связи с другим аптамером (например, в силу стерических ограничений на одновременное связывание из-за особенностей иммобилизации конструкции или возможной аллостерической связи между экзосайтами 1 и 2 [30]), то тромбин всё равно остаётся связанным с конструкцией. Это проявляется в том, что скорость диссоциации комплекса тромбина с гетеродимерной конструкцией становится ниже, чем для комплекса с аптамером (рис. 2). То, что оба аптамера при этом не конкурируют за один и тот же экзосайт тромбина, является, по-видимому, важным обстоятельством и определяет значительно большее усиление аффинности в случае гетеродимерных конструкций по сравнению с гомодимерными (табл. 1). Связывание тромбина со “свободным” аптамером гетеродимерной конструкции приводит к большему энтропийному выигрышу, чем связывание с действительно свободным аптамером в силу того, что аптамер в составе конструкции уже имеет ограничения на степени свободы, связанные с вращательным и, отчасти, колебательным движениями. Это, вероятно, и определяет “энтропийную” природу усиления аффинности гетеродимерных аптамерных конструкций, иммобилизованных на поверхности оптического чипа биосенсора.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jayasena S.D.* (1999) Clin. Chem., **45**, 1628-1650.
2. *Радько С.П., Рахметова С.Ю., Бодоев Н.В., Арчаков А.И.* (2007) Биомед. химия, **53**, 5-24.
3. *Mairal T., Ozalp V.C., Lozano Sánchez P., Mir M., Katakis I., O'Sullivan C.K.* (2008) Anal. Bioanal. Chem., **390**, 989-1007.
4. *Davis K.A., Abrams B., Lin Y., Jayasena S.D.* (1996) Nucleic Acids Res., **24**, 702-706.
5. *Lin Y., Jayasena S.D.* (1997) J. Mol. Biol., **271**, 100-111.
6. *Ringquist S., Parma D.* (1998) Cytometry, **33**, 394-405.
7. *Santulli-Marotto S., Nair S.K., Rusconi C., Sullenger B., Gilboa E.* (2003) Cancer Res., **63**, 7483-7489.
8. *Di Giusto D.A., King G.C.* (2004) J. Biol. Chem., **279**, 46483-46489.
9. *Umehara T., Fukuda K., Nishikawa F., Kohara M., Hasegawa T., Nishikawa S.* (2005) J. Biochem. (Tokyo), **137**, 339-347.
10. *Müller J., Wulffen B., Pötzsch B., Mayer G.* (2007) Chembiochem., **8**, 2223-2226.
11. *Hasegawa H., Taira K., Sode K., Ikebukuro K.* (2008) Sensors, **8**, 1090-1098.
12. *Kim Y., Cao Z., Tan W.* (2008) Pros. Natl. Acad. Sci. USA, **105**, 5664-5669.
13. *Tian L., Heyduk T.* (2009) Biochemistry, **48**, 264-275.
14. *Рахметова С.Ю., Радько С.П., Гнеденко О.В., Бодоев Н.В., Иванов А.С., Арчаков А.И.* (2010) Биомед. химия, **56**, 72-80.
15. *Nimjee S.M., Rusconi C.P., Harrington R.A., Sullenger B.A.* (2005) Trends. Cardiovasc. Med., **15**, 41-45.
16. *Andre C., Xicluna A., Guillaume Y.-C.* (2005) Electrophoresis, **26**, 3247-3255.
17. *Gilbert S.D., Stoddard S.D., Wise S.J., Batey R.T.* (2006) J. Mol. Biol., **359**, 754-768.
18. *Bishop G.R., Ren J., Polander B.C., Jeanfreau B.D., Trent J.O., Chaires J.B.* (2007) Biophys. Chem., **126**, 165-175.
19. *Michaud M., Jourdan E., Ravelet C., Villet A., Ravel A., Grosset C., Peyrin E.* (2004) Anal. Chem., **76**, 1015-1020.
20. *Muller M., Weigand J.E., Weichenrieder O., Suess B.* (2006) Nucl. Acids Res., **34**, 2607-2617.
21. *Berezovski M., Krylov S. N.* (2005) Anal. Chem., **77**, 1526-1529.
22. *Pagano B., Martino L., Randazzo A., Giancola C.* (2008) Biophys. J., **94**, 562-569.
23. *Tasset D.M., Kubik M.F., Steiner W.J.* (1997) Mol. Biol., **272**, 688-698.
24. *Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermass E.H., Toole J.J.* (1992) Nature, **355**, 564-566.
25. *Macaya R.F., Waldron J.A., Beutel B.A., Gao H., Joeston M.E., Yang M., Patel R., Bertelsen A.H., Cook A.G.* (1995) Biochemistry, **34**, 4478-4492.
26. *Majka J., Speck C.* (2007) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., **104**, 13-36.
27. *Baerga-Ortiz A., Bergqvist S., Mandell J.G., Komives E.A.* (2004) Protein Sci., **13**, 166-176.
28. *Crothers D.M., Metzger H.* (1972) Immunochemistry, **9**, 341-357.
29. *Zhou X.H.* (2001) Biochemistry, **40**, 15069-15073.
30. *Fredenburgh J.C., Stafford A.R., Weitz J.I.* (1997) J. Biol. Chem., **272**, 25493-25499.

Поступила: 12. 04. 2010.

COMPARATIVE THERMODYNAMIC ANALYSIS OF THROMBIN INTERACTION WITH
ANTI-THROMBIN APTAMERS AND THEIR HETERODIMERIC CONSTRUCT

S.Yu. Rakhmetova, S.P. Radko, O.V. Gnedenko, N.V. Bodoev, A.S. Ivanov, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya, 10,
Moscow, 119121 Russia; tel.: +7 (499) 246-7115; fax: +7 (499) 245-0857; e-mail: radko@ibmc.msk.ru

Aptamers interacting selectively with the anion-binding exosites 1 and 2 of thrombin were merged into dimeric oligonucleotide constructs with use of a poly-(dT)-linker of 35 nucleotides (nt) long. Complexes of thrombin with the aptamers and their hetero- and homodimeric constructs were measured using the optical biosensor Biacore-3000. K_D values measured for the hetero- and homodimeric constructs were correspondingly 25-30- and 2-3-fold lower than those for the primary aptamers. Analysis of temperature dependencies of K_D values within the temperature interval of 10°C–40°C has shown that the values of enthalpy change ΔH upon formation of complexes of thrombin with the aptamers and the heterodimeric construct are close. The value of the entropy change ΔS upon complex formation of thrombin with the aptamer heterodimeric construct was 1.5-2-fold higher than ΔS values for the complexes with the aptamers. The complex formation and dissociation rates increased with the elevation of temperature from 10°C to 37°C. However, the dissociation rate for the complex of thrombin with the heterodimeric construct was evidently lower than that for the complexes with the aptamers.

Key words: aptamers, thrombin, heterodimeric construct, affinity, thermodynamics.