

УДК 577.113.6
©Коллектив авторов

ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ ФОТОАПТАМЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ФОТОСШИВОК С БЕЛКОМ-МИШЕНЬЮ

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

На модели ДНК-аптамеров, селективно узнающих анион-связывающие экзосайты 1 и 2 тромбина показано, что их объединение в гетеродимерные аптамерные конструкции с помощью поли-(dT)-линкера длиной от 5 до 65 нуклеотидов (нт) приводит к усилению аффинности. При длинах линкера от 35 до 55 нт, значения кажущейся константы диссоциации, K_d^{app} , комплексов тромбина с гетеродимерными конструкциями, измеренные на оптическом биосенсоре Bioscore-3000, достигали минимума ($K_d^{app} = 0,2-0,4$ нМ) и были приблизительно в 30 раз меньше, чем для исходных аптамеров. Гетеродимерную фотоаптамерную конструкцию получали, соединяя фотоаптамерную и аптамерную последовательности с помощью поли-(dT)-линкера длиной 35 нт. Использовали фотоаптамер, способный к фотоиндуцированному ковалентному связыванию с экзосайтом 2 тромбина и аптамер, узнающий экзосайт 1. Значение K_d^{app} такой конструкции было приблизительно в 40 раз меньше, чем для фотоаптамера (5,3 и 190 нМ, соответственно). При облучении ультрафиолетовым излучением с длиной волны 308 нм эквимоларных смесей тромбина с гетеродимерной фотоаптамерной конструкцией, одинаковый выход необратимых комплексов достигался при значениях концентраций, которые были на два порядка ниже, чем в случае исходного фотоаптамера. Выявлено, что наряду с процессом образования необратимых комплексов с тромбином происходит фотоиндуцированная инактивация фотоаптамера, предположительно за счёт формирования внутримолекулярных сшивок.

Ключевые слова: фотоаптамеры, гетеродимерные конструкции, фотосшивки, аффинность, тромбин.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Аптамеры представляют олигонуклеотиды, которые селективно взаимодействуют с заданной молекулярной мишенью с аффинностью, сравнимой с аффинностью моноклональных антител [1]. Их рассматривают как потенциальные терапевтические средства благодаря способности ингибировать функциональную активность мишени и как новый класс аффинных реагентов для аналитических целей [2, 3]. Отбор аптамеров в библиотеках случайных нуклеотидных последовательностей по аффинности к мишени происходит в условиях *in vitro* (методом селекции, известным как SELEX – Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) [4], что делает возможным получение аптамеров с различными заданными свойствами, в том числе фотоаптамеров, способных образовывать фотоиндуцированные ковалентные связи (фотосшивки) селективно с белком-мишенью.

Фотоаптамеры отбирают в библиотеках случайных нуклеотидных последовательностей методом селекции, известным как Photo-SELEX, при котором отбор по аффинности сопровождается отбором по способности образовывать с мишенью фотосшивки [5, 6]. Возможность возникновения сшивок обеспечивается наличием в составе фотоаптамеров нуклеотидов с галогенсодержащими фотоактивными основаниями (5-I- или 5-Br-урацил), способными образовывать ковалентные связи с рядом аминокислот (в первую очередь ароматическими и серосодержащими) при облучении ультрафиолетовым (УФ) излучением, если последние находятся в физическом контакте с данным основанием. При проведении фотоселекции, возможность образования такого контакта является одним из условий отбора олигонуклеотидов. Образование неспецифического комплекса фотоаптамер/белок не обязательно приводит к физическому контакту Br или I с соответствующими функциональными группами аминокислот. Таким образом, образование фотосшивок происходит специфично и привносит дополнительную селективность во взаимодействие фотоаптамер-белок [6]. Наряду с фотоселекцией, фотоаптамеры можно получать и методом подбора, заменяя последовательно dT или U в известных ДНК- и РНК-аптамерах на их фотоактивные аналоги. Данный подход лишь в ряде случаев привёл к получению фотоаптамеров, но с существенной потерей аффинности [7, 8].

Использование фотоаптамеров в качестве “биоузнающих элементов” микрочипов для мультиплексной детекции белков в сыворотке и плазме крови представляется крайне перспективным. Специфическое узнавание белка-мишени фотоаптамером, дополненное специфическим образованием фотосшивки, может приблизить селективность детекции по формированию ковалентного комплекса с фотоаптамером к селективности иммунохимических методов в так называемом “сэндвич-формате” [6, 9, 10]. Необратимый характер связывания белка-мишени с поверхностью чипа через фотоаптамер при формировании фотосшивки позволяет использовать “жесткие” условия отмывки поверхности от неспецифически связавшегося белка и других возможных загрязнений. Наряду с понижением фона при использовании традиционных методов детекции (например, флуоресцентные красители, связывающиеся с белком [9]), это открывает возможность применять для детекции белка-мишени в биологических жидкостях так называемые “молекулярные счётчики” (основанные на сканирующей атомно-силовой или ближнепольной оптической микроскопии) с исключительно низкими физическими пределами детекции [11].

Являясь химически синтезированными олигонуклеотидами, аптамеры могут быть легко объединены в молекулярные конструкции, содержащие более чем один аптамер, как в процессе синтеза, так и пост-синтетически. Возможность одновременного взаимодействия двух сайтов лиганда с двумя сайтами мишени должна приводить к образованию более стабильного комплекса, так как его диссоциация требует одновременного нарушения обоих контактов. Таким образом, объединение аптамеров, взаимодействующих с разными участками

поверхности белка-мишени, в молекулярную конструкцию делает возможным создание “биоузнающих элементов” с аффинностью, превышающей аффинность исходных аптамеров. В литературе известен ряд успешных попыток создания аптамерных молекулярных конструкций [2], в том числе гетеродимерных конструкций, объединяющих две аптамерные последовательности, узнающие различные участки поверхности одного белка [12-16]. Как правило, такие конструкции состояли из аптамеров, один из которых являлся эффективным ингибитором функциональной активности белка-мишени, в то время как второй обладал существенно более высокой аффинностью к белку [13, 14]. Их объединение в гетеродимерную конструкцию приводило к существенному (более чем на порядок) понижению IC_{50} [14]. Как представляется, подобный подход может быть реализован и для создания фотоаптамерных конструкций с целью повышения чувствительности детекции при использовании фотоаптамеров в качестве “биоузнающих элементов” микрочипов.

В настоящей работе на модели анти-тромбиновых аптамеров исследовалась возможность повышения эффективности формирования необратимых комплексов фотоаптамер/белок-мишень путём включения фотоаптамера в гетеродимерную аптамерную конструкцию. В случае фотоаптамерной конструкции, сравнимый выход фотосшивок достигался при существенно меньших концентрациях эквимольной смеси фотоаптамерная конструкция/белок, чем в случае исходного фотоаптамера.

МЕТОДИКА. В работе использовались реактивы для синтеза олигонуклеотидов производства Acros Organics (Бельгия) и Glen Research (США). Другие использованные реактивы были производства Sigma-Aldrich (США), качества ACS или выше, включая тромбин из плазмы крови человека (кат. № T7009, лот № 115K7545) и бычий сывороточный альбумин (БСА, кат. № A3059). Олигонуклеотиды синтезировали на ДНК-синтезаторе ASM-800 (“Биоссет”, г. Новосибирск, Россия) в соответствии со стандартными протоколами фирмы-производителя и очищали с помощью ПААГ в присутствии 7 М мочевины. Последовательности использованных в работе аптамеров и их обозначения приведены в таблице. Гетеродимерные аптамерные конструкции получали синтезируя олигонуклеотиды, состоящие из аптамерных последовательностей A1 и A2 (считая с 5'-конца), соединённых поли-(dT)-линкером протяжённостью от 5 до 65 нт. Гетеродимерная фотоаптамерная конструкция состояла из фотоаптамера A1Ph (табл.), соединённого поли-(dT)₃₅-линкером с последовательностью A2 (далее A1Ph-A2). Во всех гетеродимерных конструкциях в аптамерной последовательности A2 отсутствовали нуклеотиды, показанные курсивом. В качестве контроля использовались случайные олигонуклеотидные последовательности длиной 30 и 74 нт. Все олигонуклеотидные последовательности были биотинилированы с 5'-конца в процессе синтеза. Фотоаптамер A1Ph и фотоаптамерная конструкция дополнительно имели на 3'-конце амиолинкер.

Таблица. Обозначения и последовательности аптамеров и фотоаптамера к тромбину.

A1	5'-TCAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTCACT-3'
A2	5'-ATGTCCTACTGGTTGGTGTGGTTGGGTAG-3'
A1Ph	5'-AATCAGTCCGTGGTAGGGCAGG(5-I-<u>du</u>)TGGGGTCACTTCGTGGA-3'

Эксперименты по исследованию взаимодействия аптамеров с белками выполняли на оптическом биосенсоре Biacore 3000 (Biacore AB, Швеция) при 37°C с использованием стандартных протоколов фирмы-производителя. В работе использовались оптические чипы типа SA (Biacore AB), несущие на рабочей поверхности стрептавидин. После иммобилизации 5'-биотинилированных олигонуклеотидов на поверхности оптического чипа, взаимодействие аптамер-тромбин исследовали в буфере R (100 mM NaCl / 50 mM KCl / 1 mM MgCl₂ / 50 mM трис-HCl, pH 7,5), содержащем дополнительно BCA (20 мкМ). Поверхность оптического чипа регенерировали раствором 0,05% SDS. Обработка сенсограмм проводилась с помощью программного пакета BIAevaluation v.4.1 ("Biacore AB"). Кажущиеся равновесные константы диссоциации (K_d^{app}) комплексов тромбина с аптамерами и димерными конструкциями вычисляли с помощью метода нелинейной регрессии, имеющегося в пакете программ BIAevaluation v.4.1, на основе зависимости величины равновесного сигнала биосенсора от концентрации тромбина.

Комплексы фотоаптамер/тромбин подвергали воздействию УФ-излучения с длиной волны 308 нм, используя эксимерный лазер CL-5000 ("Оптосистемы", г. Троицк, Россия). Смеси тромбин с фотоаптамером или фотоаптамерной конструкцией в эквимольных количествах инкубировали в буфере R при 37°C в течение 30 мин, после чего помещали в кварцевую кювету. Облучение проводили при комнатной температуре. Использовали 0,5 мл кювету с оптическим путём 1 см и внутренним зазором 2 мм. Объем облучаемого раствора составлял 200 мкл. Сечение светового пучка имело прямоугольную форму размерами 6×12 мм. Мощность излучения составляла 10 мДж/импульс, частота – 10 Гц. Если объем пробы превосходил 200 мкл, то облучение проводили частями. Облучённые пробы при необходимости концентрировали ультрафильтрацией, используя микроконцентраторы Microcon YM-3 ("Millipore", США).

Облучённые и необлучённые пробы анализировали с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза в ТВЕ-буфере в присутствии 7 М мочевины, используя 8% и 12% гели. Полосы, соответствующие фотоаптамерам и их комплексам с тромбином 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) в соответствии с протоколом производителя. Суммарное количество олигонуклеотидов, наносимое на дорожку геля, составляло 300 или 30 нг. Электрофореграммы анализировали с помощью программы ImageQuant 5.2 ("Amersham Biosciences"), позволяющей вычислять в условных единицах флуоресценции площади пиков, соответствующих свободным фотоаптамерам и фотоаптамерам в составе комплекса (рис. 1А и пики 1 и 2 на рис. 1В). 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 тромбином, F (%), проводили с использованием площади пика 1 при нанесении 30 нг (S_1^*), по формуле: $F = [S_2 / (S_2 + 10 \cdot S_1^*)] \cdot 100\%$, где S_2 - площадь пика 2 при нанесении 300 нг.

Масс-спектрометрический анализ олигонуклеотидов проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker, Германия), используя в качестве матрицы водный раствор 3-гидроксипиколиновой кислоты (10 мг/мл) и диаммониумгидроцитрата (1 мг/мл).

Концентрацию 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. Растворы тромбина готовили, основываясь на доле тромбина в коммерческом препарате (определялась с помощью ПААГ-электрофореза с окраской Кумасси G-250 и составляла 75%) и концентрации суммарного белка, определённой по методу Бредфорд. В работе использовались свежеприготовленные растворы тромбина.

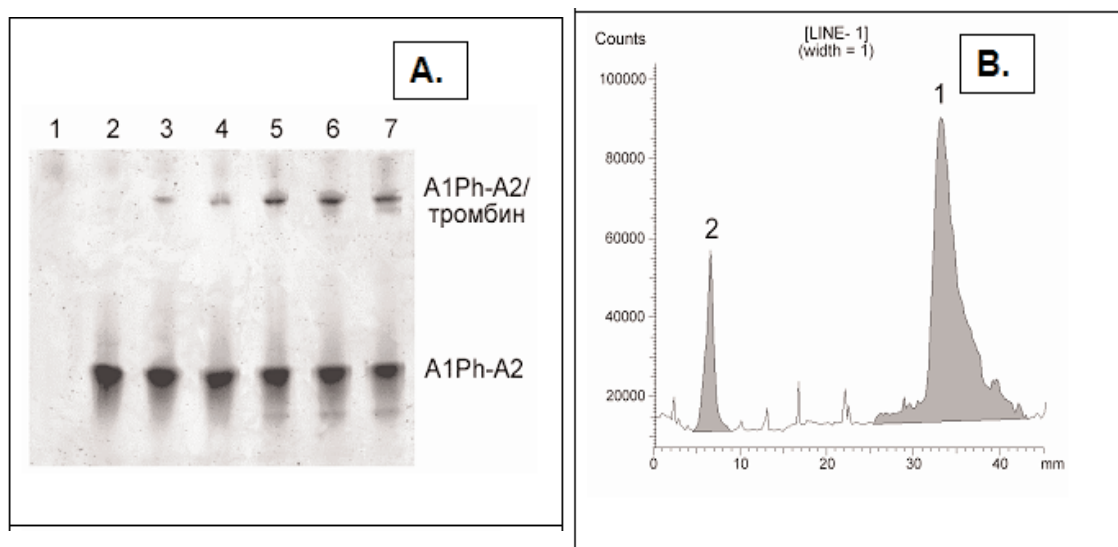


Рисунок 1.

Панель А: Денатурирующий ПААГ-электрофорез комплексов тромбина с фотоаптамерной конструкцией A1Ph-A2. 1 - тромбин; 2 - необлучённый комплекс; 3, 4, 5, 6 и 7 - облучение 100, 200, 400, 800 и 1200 импульсами. Эквимольная смесь, концентрация тромбина 0,75 мкМ. Панель В: Типичная электрофореграмма. Пик 1 соответствует свободным фотоаптамерам, пик 2 - ковалентным комплексам аптамер/тромбин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Анти-тромбиновые аптамеры представляют удобную модель для изучения свойств гетеродимерных 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 (узнающий фибриноген) и 2 (связывающий гепарин) [7]. Выделенные жирным шрифтом последовательности использованных в работе аптамеров A1 и A2 (табл.) идентичны соответственно последовательностям аптамера 60-18 (узнающим селективно экзосайт 2), полученному Tasset et al. [7] и аптамера G15 (узнающему селективно экзосайт 1), полученному Bock et al. [16]. Аптамер A2 содержит дополнительно фланкирующие последовательности, способные образовывать дуплекс (подчёркнуты) по аналогии с анти-тромбиновыми ДНК-аптамерами, полученными Mасауа et al. [17]. Добавление дуплекса к последовательностям, способным формировать G-квартеты, приводило к усилению сродства аптамера к тромбину [17]. Аптамер A2 взаимодействовал с тромбином с $K_d^{app} = 9$ нМ, в то время как G15 имеет $K_d^{app} = 100-200$ нМ по данным разных авторов [7, 13, 16, 17]. Выделенная жирным шрифтом последовательность фотоаптамера A2Ph соответствует фотоаптамеру, который способен к фотоиндуцированному ковалентному связыванию с экзосайтом 2 тромбина и был получен Tasset et al. из аптамера 60-18 методом подбора [7]. Нуклеотиды, указанные в последовательностях курсивом (табл.), были добавлены, что бы служить как дополнительный гибкий линкер между аптамерными последовательностями и биотином на 5'-конце или аминокислотным линкером на 3'-конце.

Данные, полученные на модели анти-тромбиновых аптамеров, показывают (рис. 2), что объединение аптамеров в гетеродимерные конструкции позволяет значительно увеличить аффинность при правильном подборе длины линкера. Полученные средние значения K_d^{app} для аптамерных конструкций с поли-dT-линкером длиной от 35 до 55 нт лежали в интервале 0,2-0,4 нМ, что приблизительно в 30 раз меньше их значений для аптамеров A1 и A2

ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ ФОТОАПТАМЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ

(11 и 9 нМ, соответственно). Представляется наиболее вероятным, что в данном диапазоне длин линкера обе аптамерные последовательности могут одновременно взаимодействовать со своими сайтами узнавания на поверхности тромбина, что приводит к большей стабильности образующихся комплексов и, как результат, существенному возрастанию аффинности.

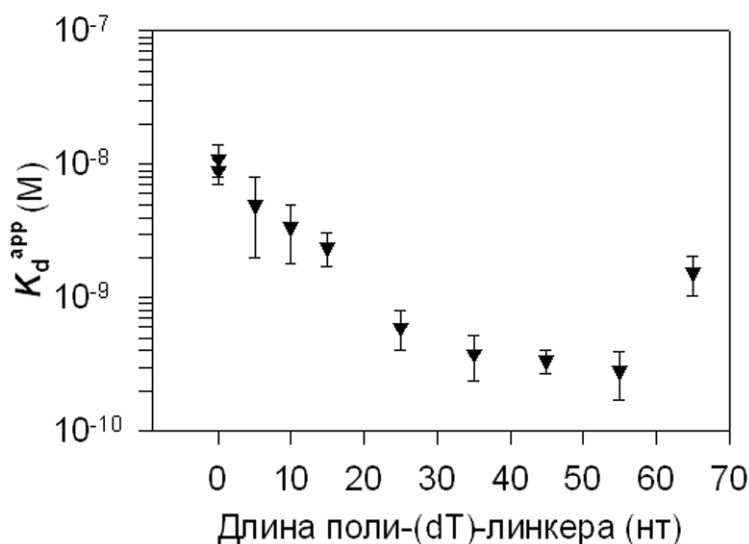


Рисунок 2.

Зависимость кажущейся константы диссоциации, K_d^{app} , комплексов тромбина с аптамерами и гетеродимерными аптамерными конструкциями от длины поли-(dT)-линкера. Приведены среднеарифметические значения \pm среднеквадратичное отклонение, полученные из трёх независимых экспериментов.

Конвертация аптамера 60-18 в фотоаптамер была осуществлена Tasset et al. с целью идентификации места связывания аптамера с тромбином с помощью фотосшивки, при этом только одна из замен тимидинов на 5-I-dU привела к появлению фотоактивности [7]. Как показали измерения на Bioscore-3000, аффинность аптамера A1Ph с аналогичной заменой невелика – $K_d^{app} = (190 \pm 35)$ нМ, в то время как K_d^{app} для гетеродимерной фотоаптамерной конструкции A1Ph-A2 равнялось $(5,3 \pm 0,6)$ нМ. Облучение смеси тромбина как с A1Ph, так и с A1Ph-A2 приводило к появлению фракции фотоаптамеров с существенно меньшей электрофоретической подвижностью (рис. 1А), что было интерпретировано как образование необратимых комплексов фотоаптамер/тромбин. Доля фотоаптамеров, ковалентно связанных с тромбином (F), нарастала с дозой облучения, выходя на плато после 500 импульсов (рис. 3А). При этом значения F, соответствующие плато, лежали существенно ниже 100%. Такая же зависимость от дозы УФ-облучения наблюдалась и в случае фотоаптамеров к щелочному фактору роста фибробластов и белку gp120MN вируса иммунодефицита человека, что было интерпретировано как наличие двух одновременно идущих процессов – образования фотосшивок и фотоиндуцированная инактивация фотоаптамеров [18]. Максимальные значения F, полученные нами при облучении 750 импульсами эквимольных смесей тромбина с A1Ph и A1Ph-A2 составили соответственно $\approx 6\%$ и $\approx 12\%$ (рис. 3В). Столь низкий выход фотосшивок вероятно определяется тем, что A1Ph был получен методом подбора и, таким образом, его эффективность как фотоаптамера не была оптимизирована фотоселекцией. Для фотоаптамеров, полученных методом Photo-SELEX, доля олигонуклеотидов, необратимо связавшихся с белком, лежала в интервале от 20% до 80% [6, 18].

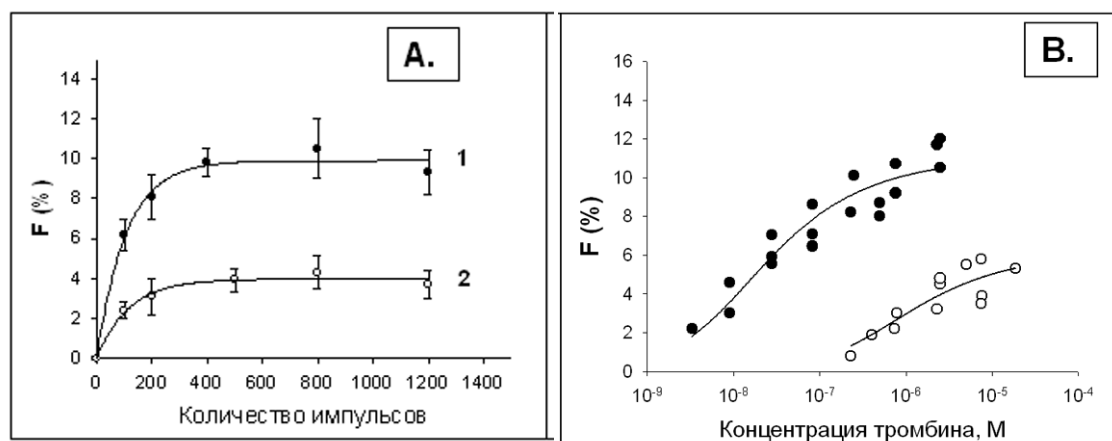


Рисунок 3.

Панель А: Зависимость доли олигонуклеотидов, ковалентно связанных с тромбином (F), от дозы УФ-облучения. 1 - A1Ph-A2, 0,75 мкМ тромбин; 2 - A1Ph, 2,5 мкМ тромбин.

Панель В: Доля олигонуклеотидов в ковалентном комплексе с тромбином как функция концентрации. 1 - A1Ph-A2, 2 - A1Ph. Облучение - 750 импульсов.

Включение A1Ph в состав гетеродимера существенно понижает концентрацию эквимольной смеси олигонуклеотидов с тромбином, необходимую для эффективного образования фотоиндуцированных ковалентных комплексов. Концентрации, при которых методом гель-электрофореза с флуоресцентной окраской детектировалось одинаковое относительное количество A1Ph и A1Ph-A2, необратимо связавшихся с белком, различаются не менее чем на 2 порядка (рис. 3В). Вероятно, более высокая эффективность фотоаптамерной конструкции в отношении формирования фотосшивок определяется её более высокой аффинностью к белку-мишени по сравнению с исходным фотоаптамером и является следствием того, что при облучении смеси фотоаптамер/белок идут два конкурирующих процесса – образование фотосшивок и инактивация фотоаптамеров, как свободных, так и возможно находящихся в составе обратимого комплекса. Если при поглощении фотона фотоактивным основанием с разной вероятностью возможно как образование фотосшивки (если фотоаптамер находится в комплексе с мишенью), так и протекание фотохимического процесса, приводящего к потере основанием фотоактивности (а, возможно, и аффинности фотоаптамера к мишени), то выход фотосшивок при данных концентрациях фотоаптамера и мишени должен с очевидностью зависеть от величины K_d^{app} .

Чтобы убедиться, что индуцированная УФ-облучением инактивация фотоаптамеров действительно происходит, мы определили выход необратимых комплексов при облучении смеси тромбина с фотоаптамерной конструкцией, предоблучённой в различных дозах. Как видно из рисунка 4А, облучение раствора A1Ph-A2 перед смешиванием с тромбином приводит к дозово-зависимому уменьшению величины F . При этом деградации олигонуклеотидов не происходит - мы не обнаружили фрагментации A1Ph-A2 при облучении вплоть до дозы, соответствующей 2000 импульсам (рис. 4В). Был также проведён масс-спектрометрический анализ необлучённого и облучённого (5000 импульсов) фотоаптамера A1Ph (рис. 4С). В обоих случаях спектры содержали только пики, соответствующие разнозарядным состояниям молекулярных ионов с массами, отличающимися от расчётной на 20-25 Да (ожидаемая молекулярная масса – 12920 Да). Это позволяет исключить из причин инактивации выщепление оснований в результате облучения, что должно было бы изменить молекулярную массу олигонуклеотида более чем на 100 дальтон. Представляется наиболее вероятным, что в процессе облучения возникают сшивки между фотоактивным

ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ ФОТОАПТАМЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ

галоге́н-содержаще́м осно́ванием и одним из прилежащих оснований. В случае дуплексов образование таких внутримолекулярных сшивок было показано экспериментально [19], причём эффективность их формирования зависела от типа соседнего (с 5'-конца) нуклеотида и была значительно выше для dG в сравнении с dA.

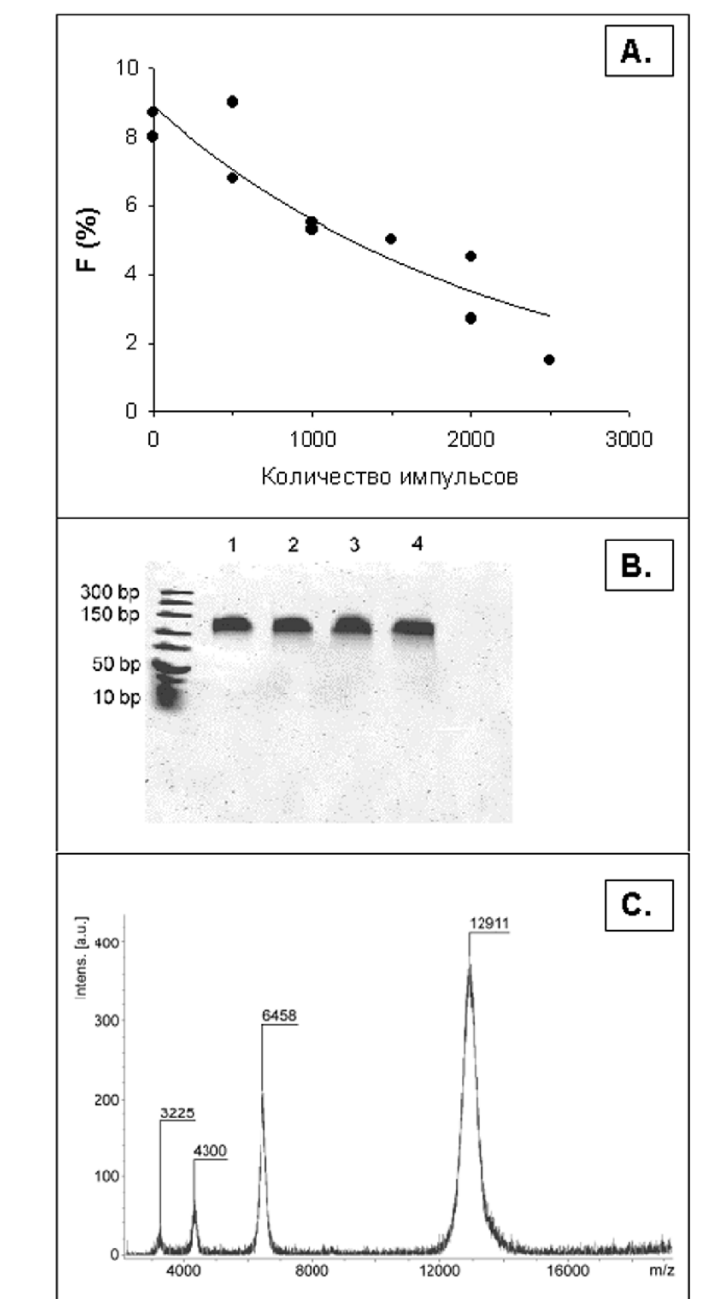


Рисунок 4.

Панель А: Зависимость доли A1Ph-A2, ковалентно связанного с тромбином (F), от дозы предоблучения. A1Ph-A2 в концентрации 1 мкМ облучали указанными дозами и смешивали с равным объемом 1 мкМ раствора тромбина. После инкубации в течение 30 мин при 37°C смесь облучали дозой, эквивалентной 1000 импульсам. Панель В: Денатурирующий ПААГ-электрофорез (в присутствии 20 М формамида) необлучённых (дорожка 1) и облучённых 500, 1000 и 2000 импульсами (дорожки 2, 3 и 4, соответственно) образцов A1Ph-A2. Концентрация растворов A1Ph-A2 при облучении - 0,5 мкМ. Панель С: Масс-спектр фотоаптамера A1Ph, облучённого в концентрации 10 мкМ в воде дозой, эквивалентной 5000 импульсам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В процессе химического синтеза, аптамеры могут быть объединены в молекулярные гетеродимерные конструкции, связывающиеся с мишенью с существенно более высокой аффинностью. Объединение фотоаптамера и аптамера, узнающих разные участки поверхности белка-мишени, в гетеродимерную конструкцию, может привести к значительному понижению концентрационного предела детекции необратимых комплексов.

Работа выполнена в рамках научной программы РАМН “Протеомика для медицины и биотехнологии”.

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. *Кульбачинский А.В.* (2006) Успехи биологической химии, **46**, 193-224.
5. *Golden M.C., Collins B.D., Willis M.C., Koch T.H.* (2000) J. Biotechnol., **81**, 167-178.
6. *Smith D., Collins B.D., Heil J., Koch T.H.* (2003) Mol. Cell. Proteomics., **2**, 11-18.
7. *Tasset D.M., Kubik M.F., Steiner W.* (1997) J. Mol. Biol., **272**, 688-698.
8. *Ruckman J., Green L.S., Beeson J., Waugh S., Gillette W.L., Henninger D.D., Claesson-Welsh L., Janjic N.* (1998) J. Biol. Chem., **273**, 20556-20567.
9. *Bock C., Coleman M., Collins B., Davis J., Foulds G., Gold L., Greef C., Heil J., Heilig J.S., Hicke B., Hurst M.N., Husar G.M., Miller D., Ostroff R., Petach H., Schneider D., Vant-Hull B., Waugh S., Weiss A., Wilcox S.K., Zichi D.* (2004) Proteomics, **4**, 609-618.
10. *Gander T.R., Brody E.N.* (2005) Expert Rev. Mol. Diagn., **5**, 1-3.
11. *Ivanov Y.D., Govorun V.M., Bykov V.A., Archakov A.I.* (2006) Proteomics, **6**, 1399-1414.
12. *Umehara T., Fukuda K., Nishikawa F., Kohara M., Hasegawa T., Nishikawa S.* (2005) J. Biochem. (Tokyo), **137**, 339-347.
13. *Müller J., Wulffen B., Pöttsch B., Mayer G.* (2007) Chembiochem., **8**, 2223-2226.
14. *Kim Y., Cao Z., Tan W.* (2008) Pros. Natl. Acad. Sci. USA, **105**, 5664-5669.
15. *Tian L., Heyduk T.* (2009) Biochemistry, **48**, 264-275.
16. *Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Verma E.H., Toole J.J.* (1992) Nature, **355**, 564-566.
17. *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.
18. *Koch T.H., Smith D., Tabacman E., Zichi D.A.* (2004) J. Mol. Biol., **336**, 1159-1173.
19. *Zeng Y., Wang Y.* (2006) Nucleic Acids Res. **34**, 6521-6529.

Поступила: 27. 02. 2009.

**PHOTOAPTAMER HETERODIMERIC CONSTRUCTS AS A NEW APPROACH
TO ENHANCE THE EFFICIENCY OF FORMATION OF PHOTOCROSSLINKING
WITH A TARGET PROTEIN**

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

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

Using two DNA aptamers selectively recognizing anion-binding exosites 1 and 2 of thrombin as a model, it has been demonstrated that their conjugation by a poly-(dT)-linker (ranging from 5 to 65 nt in length) to produce aptamer heterodimeric constructs results into affinity enhancement. The apparent dissociation constant (K_d^{app}) measured at the optical biosensor Biacore-3000 for complexes of thrombin with the heterodimeric constructs reached minimum values ($K_d^{app} = 0,2-0,4$ nM) which were approximately 30-fold less than for the complexes with the primary aptamers. A photoaptamer heterodimeric construct was designed connecting photoaptamer and aptamer sequences with the poly-(dT)-linker of 35 nt long. The photoaptamer used could form photo-induced cross-links with the exosite 2 of thrombin and the aptamer used could bind to the exosite 1. The measured value of K_d^{app} for the photoaptamer construct was approximately 40-fold less than that for the primary photoaptamer (5,3 and 190 nM, respectively). Upon exposure to the UV radiation at 308 nm of the equimolar mixtures of thrombin with the photoaptamer construct, the equal yield of the crosslinked complexes was observed at concentrations which were lower by two orders of magnitude than in the case of the primary photoaptamer. It was found that concurrently with crosslinking to thrombin a photo-induced inactivation of the photoaptamer occurs presumably due to formation of the intermolecular crosslinking.

Key words: photoaptamers, heterodimeric constructs, photocrosslinking, affinity, thrombin.