



На правах рукописи

ГОЛОВИН Андрей Викторович

**КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ЛИГАНДАМИ**

Специальность 02.00.10 — биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора химических наук

Москва – 2014

Работа выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики и в отделе химии и биохимии нуклеопротеидов научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова.”

**Официальные
оппоненты:**

Долинная Нина Германовна,
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник,
Химический факультет, Федеральное государственное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования “Московский
Государственный Университет имени М.В.
Ломоносова”, Москва

Ефремов Роман Гербертович,
доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий лабораторией моделирования
биомолекулярных систем, Федеральное
государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской
академии наук (ИБХ РАН), Москва

Ефимов Александр Васильевич
доктор химических наук, главный научный сотрудник,
заведующий группой моделирования белковых
структур, Институт белка РАН, Пущино

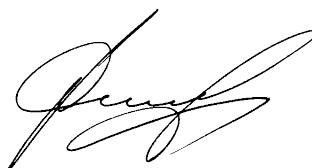
**Ведущая
организация:**

Лаборатория ДНК-белковых взаимодействий,
Институт молекулярной биологии имени В. А.
Энгельгардта РАН, Москва

Защита состоится 17 июня 2014 г. в 16⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М. В. Ломоносова, и на сайте химического факультета www.chem.msu.ru
Автореферат разослан “ ” апреля 2014 года.

Учёный секретарь диссертационно-
го совета, кандидат химических наук,
доцент



Смирнова И.Г.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Сложная трёхмерная организация биологических макромолекул определяет их биологическую функцию. Благодаря успехам современной структурной химии, появилась возможность изучать большое разнообразие структур белков и нуклеиновых кислот. В то же время принципиальное ограничение современных методов определения их атомного строения состоит в том, что они позволяют выявлять и характеризовать только самые представленные конформации молекул и их комплексов. Кроме того, при описании процессов, в которых участвуют биологические макромолекулы, обычно оперируют только структурой исходных реагентов и продуктов их превращений, в то время, как сам механизм и динамика взаимодействия зачастую остаются неизвестными.

Молекулярное узнавание биологических макромолекул достигается за счёт нековалентных взаимодействий, сопряжённых с конформационными переходами, которые или предшествуют образованию комплекса, или следуют за ним. Такие процессы описываются либо механизмами конформационного отбора, либо индуцированного соответствия. Выявление путей, по которым протекает процесс, – нетривиальная задача даже для анализа взаимодействия биомacroмолекул с низкомолекулярными лигандами. Современные работы показывают, что в большинстве исследованных систем реализуется путь конформационного отбора. Поэтому на первый план выходит поиск и изучение набора конформационных состояний, которые может принимать макромолекула. При этом путь, по которому происходит конформационный отбор, предполагает выбор таких малопредставленных состояний, которые сложно регистрировать экспериментальными методами установления структуры. Большинство современных исследований конформационного профиля биомacroмолекул посвящены пептидам и белкам. В то же время, структура и функция нуклеиновых кислот (НК) всё больше привлекает внимание исследователей, в связи с возможностью терапевтического применения олигонуклеотидов, а также с растущим потенциалом использования нуклеиновых кислот в качестве мишеней для разработки лекарств.

Экспериментальные подходы к определению конформационного профиля нуклеиновых кислот так же, как и для белков, имеют ограничения, связанные с представленностью интересующих исследователей конформаций. Знания

о природе и о кинетических переходах между конформациями можно получить современными методами молекулярного моделирования. Данная работа посвящена разработке и применению методов молекулярного моделирования к различным по размерам и сложности системам, в которых ключевую роль играют нуклеиновые кислоты. Выбор систем для исследования определялся современными вычислительными возможностями; по мере перехода к системе меньшего размера, увеличивалась и детализация моделирования. Крупные системы аппроксимировали до упрощённых моделей, в то время, как структуры сравнительно коротких олигонуклеотидов были проанализированы гораздо более детально, благодаря возможности применения методов молекулярной и квантовой механики.

Цель работы – разработать подходы к молекулярно-динамическому моделированию НК (ДНК и РНК), найти и описать конформационную динамику для нуклеиновых кислот разного размера и сложности. Используя разработанные алгоритмы и подходы, найти варианты решений фундаментальных и прикладных задач для систем, в которых нуклеиновые кислоты играют ключевую роль.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать подход к упрощённому моделированию супрамакромолекулярных комплексов НК и построить модель конформационных изменений тмРНК в комплексе с рибосомой;
2. Разработать подход к полноатомному моделированию комплексов 23S рРНК с антибиотиками-макролидами и исследовать конформационные изменения нуклеотидов 23S рРНК, с точностью до положения атомов оснований, при взаимодействии с антибиотиком;
3. Исследовать конформации G-квадруплексных ДНК и их зависимость от структурной организации молекулы;
4. Исследовать конформационную динамику ДНК, соответствующую минимальному G-квадруплексу.

Объект исследования – структура нуклеиновых кислот и её динамика.

Предмет исследования – методы и подходы молекулярного моделирования, анализ данных, рациональное изменение структуры.

Научная новизна и практическая значимость. Все результаты работы получены впервые и не описаны ранее в научной литературе. В ходе работы был предложен новый подход к компьютерному моделированию структуры больших супрамолекулярных комплексов, основанный на упрощённом представлении нуклеотидов и аминокислот. На основе разработанного подхода впервые были предложены структуры комплексов тмРНК с рибосомой на разных этапах элонгации трансляции. Последующие данные о структуре тмРНК, полученные экспериментально, подтвердили высокое качество моделирования. Наличие пространственных ограничений было ключевым фактором, который позволил использовать упрощённые модели при сохранении точности моделирования.

– В работе впервые, по данным моделирования молекулярной динамики комплексов производных тилозина с рибосомным тоннелем, предсказана ингибирующая активность производных тилозина по отношению к рибосоме *E. coli*. В работе создано полноатомное локальное окружение антибиотика в рибосоме.

– Впервые было показано, что эффективность ингибирования элонгации трансляции тилозиновыми производными связано с образованием сетки водородных связей, которые позиционируют альдегидную группу лактонного кольца для формирования ковалентной связи.

– Впервые предложена классификация малых G-квадруплексных ДНК по топологии петель на основе геометрического описания структуры самого квадруплекса. С помощью разработанной классификации были сделаны предположения о влиянии топологии на структурную стабильность и динамическое поведение G-квадруплексных структур.

Применение метода моделирования молекулярной динамики к минимальному 15-звенному квадруплексу ДНК впервые позволило продемонстрировать, что латеральные петли могут оказывать на квадруплекс как стабилизирующее, так и дестабилизирующее влияние, в зависимости от длины и петель последовательности нуклеотидов.

– Впервые показано, что произвольное направленное перемещение катиона металла в центральную полость квадруплекса может быть сложным процессом, который проходит различными путями. В ходе этого процесса возмож-

ны значимые структурные перестройки в G-квадруплексе. Установлено, что эффективное хелатирование катионов в центре минимального 15-звенного квадруплекса определяется действием латеральных петель: подвижность петель уменьшает вероятность диссоциации комплекса с катионом.

Полученные результаты имеют не только фундаментальную научную ценность; они были использованы для создания нового вещества антитромботического действия на основе ДНК-аптамера к тромбину: RA-36. В *in vitro* и *in vivo* экспериментах RA-36 показал высокую эффективность и низкую токсичность и в настоящее время проходит формализованные доклинические испытания для регистрации в качестве лекарственного средства.

Понимание структурной динамики аптамера к тромбину было использовано для создания сенсоров для определения концентрации тромбина. В качестве основы сенсора был выбран электропроводник на основе углеродных нанотрубок.

– Впервые предложен механизм работы аптасенсора. В настоящее время проводится оптимизация опытных образцов аптасенсоров к тромбину.

Основные положения, выносимые на защиту. Модель структуры комплекса тмРНК с рибосомой *E. coli*. Структурные модели взаимодействия производных макролидов с рибосомным тоннелем. Структурная динамика аптамера к тромбину 15-ТВА. Структурные модели взаимодействия катионов металлов с аптамером 15-ТВА. Улучшение терапевтических свойств аптамерной ДНК к тромбину.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на 19 конгрессах и конференциях: 38th Congress of the Federation of European Biochemical Societies FEBS (РФ, Санкт-Петербург, 2013), 5-th International Conference on Drug Discovery & Therapy (United Arab Emirates, Dubai, 2013), 32nd European Peptide Symposium (Greece, Athens, 2012), 22nd IUBMB Congress/37th FEBS Congress (Spain, Seville, 2012), XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 57th Annual SSC meeting (Japan, Kyoto, 2011), 36th FEBS Congress of the Biochemistry for Tomorrows Medicine (Italy, Torino, 2011), 34th Congress of the Federation of European Biochemical Societies (Czech Republic, Prague, 2009), Meeting on G-Quadruplex and G-assembly (Italy, Sorrento, 2010), 17th Congress of the European Hematology Association (Netherlands, Amsterdam, 2012), BIT's 9th Annual Congress of International Drug Discovery

Science and Technology (China, Shenzhen, 2011), XVIII Российский национальный конгресс “Человек и лекарство” (РФ, Москва, 2011), V Всероссийская конференция “Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии” (РФ, Москва, 2011).

Достоверность полученных результатов доказывается публикацией работ в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, выступлением на международных конференциях, а также экспериментальными данными других исследователей.

Внедрение результатов исследования. В ООО “Апто-Фарм” проводятся формализованные доклинические испытания антитромботического препарата на основе аптамерной ДНК к тромбину, разработанной автором.

Личный вклад автора является определяющим на всех этапах исследования: от постановки задачи до обсуждения и оформления результатов. Все новые методы и подходы разработаны лично автором, все вычислительные эксперименты выполнены лично автором. Остальные результаты получены в соавторстве.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 16 печатных изданиях, 12 из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАК, и 4 являются патентами, и в 19 тезисах докладов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, материалов и методов, выводов. Полный объём диссертации – **317** страниц текста с **79** рисунками и **11** таблицами. Список литературы содержит **416** наименований.

Содержание работы

Конформации тмРНК при взаимодействии с рибосомой

Основной целью данной работы является поиск подходов к пониманию особенностей функционирования НК и определения особенностей динамики структуры при функционировании. Наиболее известным и распространённым сложным рибонуклеопротеидом клетки, где НК играет ключевую роль, является рибосома. Кроме того, рибосома образует транзитные комплексы с большим количеством разнообразных РНК, которые меняют свою конформацию

при функционировании рибосомы. Одним из наиболее ярких примеров является тмРНК. тмРНК имеет два домена: матричный и транспортный, что обуславливает её значительные структурные перестройки при взаимодействии с рибосомой.

Процесс, в который вовлечена тмРНК, называется транс-трансляцией. Это сложный и хорошо организованный процесс, который переключает синтез полипептидной цепи с мРНК на специальный участок (MLD) тмРНК. В данной работе особенное внимание было сосредоточено на значимых структурных изменениях, которые претерпевает тмРНК при функционировании в комплексе с рибосомой. С использованием подходов молекулярного моделирования и накопленных экспериментальных данных был разработан метод, который позволил представить расположение и примерную структурную организацию тмРНК в комплексе с рибосомой на разных этапах транс-трансляции. Моделирование комплексов рибосомы с тмРНК с использованием полноатомного описания всех молекул выявило недостаточную эффективность доступных вычислительных ресурсов и алгоритмов.

Рибосома является очень крупным супрамолекулярным комплексом, численное моделирование подвижности всех атомов для которого требует недоступных на сегодня вычислительных мощностей. Для решения поставленной задачи было решено использовать упрощённое описание нуклеотида РНК. Вместо описания всех атомов и их возможных попарных взаимодействий, каждый нуклеотид описывался одной частицей, и центр этой частицы приходится на атом фосфора. При описании хода сахаро-фосфатного остова связь, которая соединяет частицы, описывается как гармонический осциллятор, где равновесная длина связи составляет 5.6 Å. Заряд частицы составляет -1. Такой набор параметров не описывает ни водородные связи, ни стэкинг-взаимодействия. Для компенсации потерянной при упрощении информации использовали метод дистанционных ограничений. Этот подход позволяет сохранить относительное взаимное расположение нуклеотидных остатков, используя набор попарных ограничений на расстояние между атомами.

Для структурного описания конформации тмРНК в рибосоме на разных этапах трансляции проводилось моделирование с оптимизацией геометрии тмРНК. При описании структуры рибосомы использовали координаты атомов, полученные методом рентгеноструктурного анализа (РСА). Были выбраны дан-

ные, где было указано расположение мРНК в рибосоме. Расчёты проводили, опираясь на предположение, что открытая рамка считывания тмРНК должна располагаться там же, где располагается мРНК в рибосоме. Так, для модели, которая названа тмРНК-2, стоп-кодон находится в А-сайте, а предыдущий кодон вместе с тРНК должен занимать Р-сайт. тРНК-подобная часть тмРНК тогда должна находиться в Е-сайте рибосомы, сохраняя структуру, подобную акцепторному стеблю тРНК.

В ходе оптимизации геометрии только тРНК- и мРНК-подобные части были неподвижны в пространстве. Подход предполагает, что вся остальная часть тмРНК произвольно располагается в пространстве. Мы расположили нуклеотиды по кругу таким образом, что концы замыкались на неподвижных элементах соответствующей тРНК-подобной части тмРНК. Вторичная структура тмРНК имеет 11 двуцепочечных участков (h1-h11), часть которых входит в состав четырёх псевдоузлов (pK1-pK4). Формирование нефиксированных структурных элементов вторичной структуры происходило в ходе оптимизации геометрии под действием дистанционных ограничений (рис. 1).

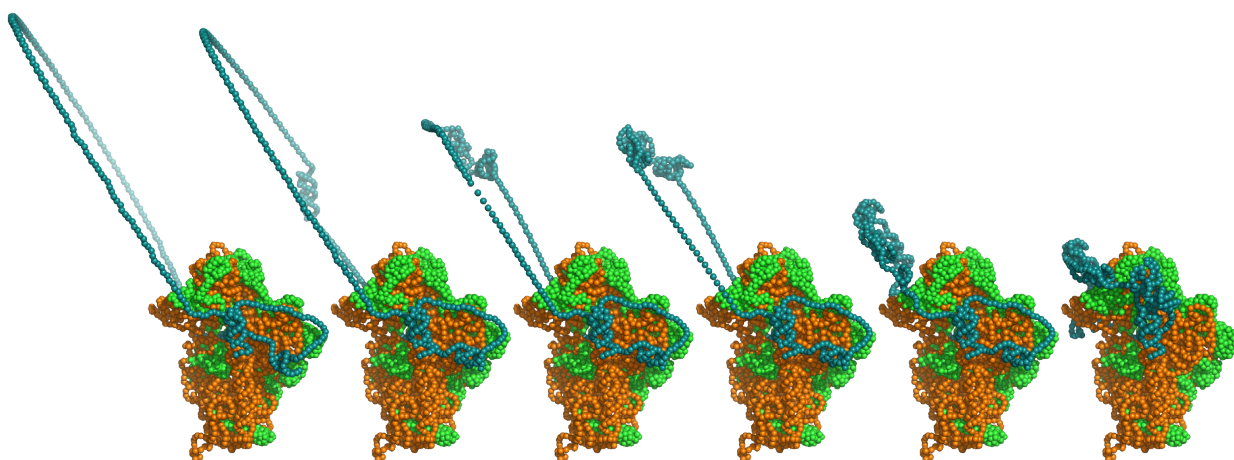


Рис. 1: Этапы сборки структурных элементов тмРНК на 70S рибосоме. 50S субчастица скрыта для удобства представления. Тёмно-бирюзовым цветом отмечены остатки моделируемой тмРНК. Оранжевым отмечены нуклеотиды рРНК. Зелёным цветом отмечены аминокислотные остатки рибосомных белков.

Модель структуры для тмРНК при расположении транспортной части в пептидилтрансферазном центре рибосомы (тмРНК-2) хорошо объясняет данные по химической модификации, которые получены экспериментально в лаборатории Донцовой О.А. Белок SmpV занимает своё положение на тРНК-

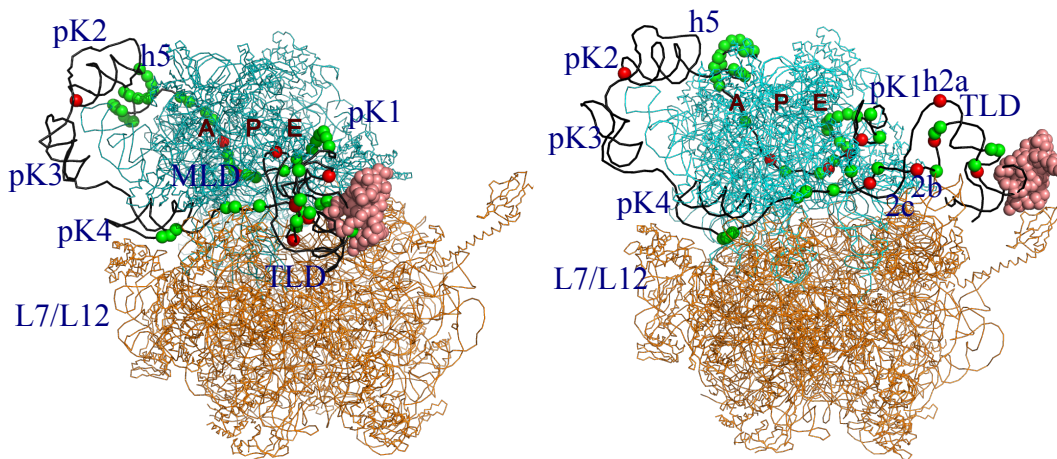


Рис. 2: Модель структуры тмРНК-2 (слева) и тмРНК-4 (справа) в комплексе с рибосомой. 30S субчастица окрашена синим, 50S субчастица окрашена зелёным. тмРНК показана чёрной линией, которая отражает ход сахаро-фосфатного остова. Белок SmpV показан розовыми сферами. Нуклеотиды тмРНК, которые защищены рибосомой от химической модификации, показаны зелёными сферами. Нуклеотиды, доступность которых увеличилась при образовании комплекса, показаны красными сферами.

подобной части тмРНК (TLD), как это было показано методом PCA Gutman и коллегами (Gutmann и др., 2003). TLD-домен тмРНК располагается в E-сайте рибосомы. Защищённые остатки A79-A86 расположены рядом со входом в мРНК-связывающий сайт рибосомы. Псевдоузел рК1 расположен рядом с E-сайтом, где выходит тРНК. Положение стебля L1 определялось данными криоэлектронной микроскопии для комплекса, соответствующего выходу деацелированной РНК из рибосомы. Однако, в нашем случае оказалось, что между субъединицами недостаточно места со стороны стебля L1, чтобы одновременно разместить TLD вместе с белком SmpV и псевдоузлом рК1. Стебли 2a, 2b и 2c определяют расположение домена TLD в E-сайте рибосомы. Стебель 2d образует связку между псевдоузлом рК1 и аркой, которая опоясывает голову 30S и располагается на плече субчастицы. Арка образована псевдоузлами рК4, рК2 и рК3. Стебель h5 располагается рядом со входом в тоннель для мРНК и может легко расплетаться при трансляции рибосомой мРНК-подобной части тмРНК. При расплетании стебля h5 образуется достаточно длинный участок тмРНК для того, чтобы арка не смещалась со своей позиции на плече 30S субчастицы рибосомы. Кодон “восстановления” находится в P-сайте рибосомы, а второй кодон – в рамке считывания в A-сайте. Из полученной модели видно, что все нуклеотиды в одноцепочечных участках взаимодействуют с рибосомой, а наличие данных

об остатках с доступностью для химической модификации могут объясняться скрытыми разрывами цепи РНК при экспериментах *in vitro*. В целом можно заключить, что полученная модель для состояния тмРНК-2 хорошо коррелирует с данными химической модификации.

Также была получена модель комплекса тмРНК с рибосомой, в которой транспортная часть тмРНК покинула рибосому (тмРНК-4) (рис. 2). Как и в случае модели для тмРНК-2, наблюдается хорошая корреляция с данными по химической модификации и данными криоэлектронной микроскопии. На этом этапе транс-трансляции домен TLD в тмРНК вместе с белком SmpB переместился за пределы рибосомы и расположился на “платформе” 30S субчастицы. Он не зафиксирован на поверхности рибосомы и может занимать практически любую позицию так, чтобы не пересекаться с деацелированной тРНК, покидающей рибосому через E-сайт. Стебли 2a, 2b и 2c, с одной стороны, соединяют TLD и псевдоузел рК4, который является частью арки, а, с другой стороны, петля A79-A86 поддерживается стеблем 2d. Этот стебель, благодаря дегидратации, может быть частично расплетён в рибосоме, но по-прежнему останется недоступным для химической модификации, что и наблюдается при сравнении модификации этого участка в комплексе с рибосомой и в свободном состоянии.

Защищённая от модификации петля A79-A86 фиксирована в участке связывания мРНК, что приводит к изменению конформации первого нуклеотида в кодоне “восстановления” и, как результат, к увеличению доступности для химической модификации.

Спираль h5 расположена рядом со входом в тоннель для мРНК. Третий и четвёртый кодоны открытой рамки считывания тмРНК расположены в P- и A-сайтах, соответственно, как было показано данными РСА. И вновь, все защищённые в комплексе нуклеотиды тмРНК, принадлежащие однополовым участкам тмРНК, вовлечены во взаимодействие с рибосомой. Расположение нуклеотидов, доступность которых увеличивается, соответствует возможным скрытым разрывам РНК. Созданная модель принимает во внимание участие белка SmpB на всех этапах функционирования тмРНК, что коррелирует с экспериментальными данными, полученными ранее (Bugueva и др., 2008).

Суммируя результаты моделирования, подтверждённые экспериментальными данными, можно отметить ключевую роль псевдоузла рК1 в позиционировании петли A79-A86. Это позиционирование, прежде всего, достигается

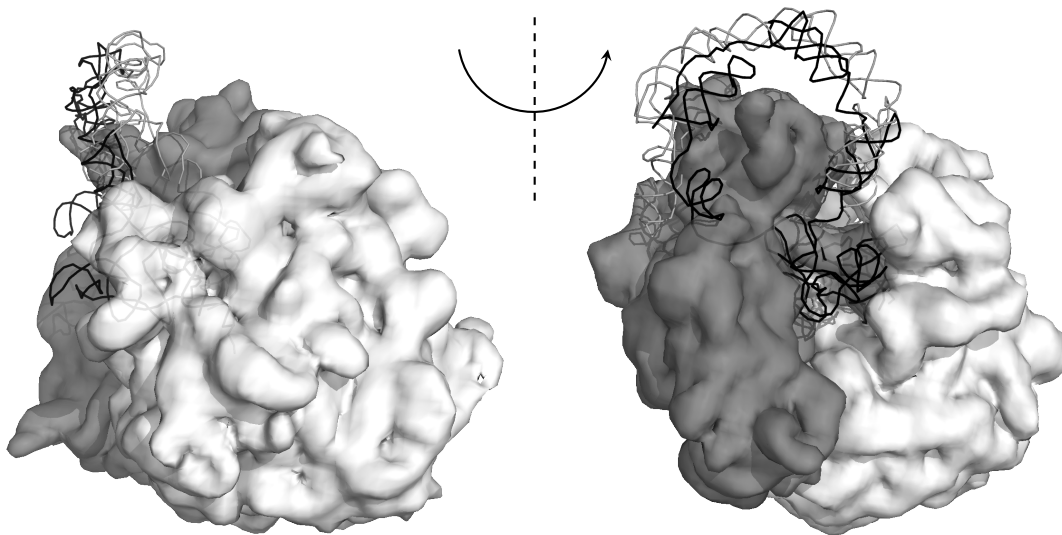


Рис. 3: Сравнение созданной модели и экспериментальных данных для пре-инициаторного комплекса рибосомы и тмРНК в двух проекциях. Серым и белым отмечена поверхность субчастиц рибосомы. Серыми линиями отмечено положение тмРНК, по данным криоэлектронной микроскопии. Чёрными линиями отмечено положение тмРНК в рибосоме, на основе авторского моделирования.

за счёт ограниченности доступного пространства и определяется простыми геометрическими ограничениями, и разрабатываемый подход адекватно воспроизводит это.

Оценка достоверности упрощённого моделирования

После публикации результатов данного моделирования была опубликована работа (Ramrath и др., 2012), в которой, на основе криоэлектронной томографии, была предложена полноатомная модель тмРНК в комплексе с рибосомой. Сравнительный анализ нашей модели и новых данных показывает достаточно высокую точность моделирования для части тмРНК, которую мы называем аркой (рис. 3). Наибольшее несоответствие двух моделей наблюдалось при расположении стеблей, за ориентацию которых отвечают стэкинг-взаимодействия внутри петель. Как уже было указано ранее, в данной работе решено пренебречь такого рода взаимодействиями для того, чтобы получить принципиальную возможность построить модель такого крупного комплекса, как комплекс тмРНК-рибосома. Необходимо отметить, что для моделей, которые рассматриваются в этой части работы, структурные данные с атомарным разрешением ещё не получены.

В заключение необходимо отметить, что переход от полноатомного представления модели к упрощённому моделированию позволяет относительно достоверно наблюдать расположение крупных элементов структур РНК, но для детального понимания атомарных механизмов, которые определяют функционирование крупных НК на уровне отдельных атомов, необходимо использовать полноатомное моделирование.

Взаимодействие конъюгатов аминокислот и 5-О-микаминозилтилонолида с рибосомным тоннелем

В первой части работы было показано, что упрощённое моделирование при достаточном количестве экспериментальных данных может привести к реалистичной модели пространственной структуры тмРНК в комплексе с рибосомой. Успех моделирования заключался в том, что оно было основано на распределении крупных элементов в ограниченном пространстве, при этом внутренние стерические ограничения рассматриваемой системы приводили к снижению конформационного разнообразия и, как следствие, к разумному результату. В то время, как, в реальности, уникальная третичная структура обеспечивается широким разнообразием нековалентных взаимодействий, которые необходимо учитывать при точном моделировании. В этой части работы с помощью моделирования была предсказана активность производного антибиотика, который связывается в рибосомном тоннеле *E. coli*.

Полипептидная цепь после очередной реакции в пептидилтрансферном центре рибосомы (ПТЦ) двигается по рибосомному тоннелю (РТ). Рибосомный тоннель пронизывает тело 50S субчастицы насквозь от ПТЦ до выхода из рибосомы. Основная роль РТ — это направление синтезируемой полипептидной цепи от ПТЦ к выходу из рибосомы, где начинается первый этап самосборки белковой молекулы. В последних работах было показано, что некоторые пептиды ингибируют рибосому, если синтезируется некая заданная последовательность (Ramu, Mankin и Vazquez-Laslop, 2009). Известны две области РТ, где происходит взаимодействие полипептидной цепи с рибосомой, приводящее к остановке трансляции. Первый сайт состоит из остатков 23S рРНК, которые относятся к так называемому внешнему окружению ПТЦ, второй сайт расположен дальше по ходу тоннеля и состоит не только из нуклеотидов 23S рРНК, но

и из некоторых остатков рибосомных белков L4 и L22. Эти два регуляторных сайта перекрываются с сайтами связывания антибиотиков макролидов, которые тормозят выход растущей полипептидной цепи, блокируя тоннель. Макролиды — это члены большого семейства природных и синтетических антибиотиков, которые действуют на рибосому. Они содержат макроциклическое лактонное кольцо, состоящее из 14, 15 и 16 атомов, и к кольцу присоединён один или более остатков сахаров. Ранее было получено значительное количество информации о структурных аспектах взаимодействия макролидов с рибосомой. В частности, было показано, что остатки сахара в макролиде располагаются вдоль РТ, в то время, как само лактонное кольцо образует обширный контакт с РТ и практически полностью занимает единственную полость в РТ.

В связи с тем, что часть РТ представлена рибосомной РНК, интересно исследовать подвижность нуклеотидов 23S рРНК, которые представлены на поверхности тоннеля. На сегодняшний день есть только общие представления о функции некоторых остатков 23S рРНК в рибосомном тоннеле. В отличие от предыдущей задачи, отметим, что нас интересует подвижность отдельных оснований, и не ожидается изменение подвижности сахаро-фосфатного остова, так как все экспериментальные данные, полученные РСА, говорят о чрезвычайно малой подвижности 23S рРНК в районе рибосомного тоннеля. Очевидно, что для решения такой задачи необходимо максимально точное описание возможных нековалентных взаимодействий азотистых оснований.

Ранее Богдановым А.А. и коллегами был синтезирован ряд пептидных производных тилозина и родственных ему макролидов. Идея синтеза таких производных состоит в том, что с помощью пептидной части воспроизводится растущая цепь, а макролидная часть выполняет роль “якоря” для позиционирования пептида в РТ. Было показано, что подобные конъюгаты могут быть эффективным инструментом для исследования участка РТ, примыкающего к пептидилтрансферазному центру. Недавно в той же лаборатории были синтезированы производные, у которых остаток триптофана отстоял на разных расстояниях от лактонного кольца. Предполагается, что остатки триптофана играют ключевую роль в функционировании TnaC и SecM пептидов, которые тормозят трансляцию, связываясь в РТ.

В связи с тем, что наша задача состоит в получении информации о взаимодействии РТ с антибиотиками на атомарном уровне, то был выбран метод моде-

лирования молекулярной динамики, который позволяет наблюдать за эволюцией системы во времени. Важной особенностью этого метода является возможность достоверно моделировать гидрофобный эффект. На основании известных данных РСА, можно предположить положение лактонного кольца, но начальное положение всех частей антибиотика и его производных неизвестно. При таких исходных данных сначала необходимо достичь структурного равновесия системы и только потом проводить анализ. Оценка сложности задачи показала, что для достижения равновесия может понадобиться длительное время наблюдения за системой. Полноразмерное моделирование молекулярной динамики рибосомы является очень затратным подходом, что не позволяет учитывать в моделировании МД все атомы рибосомы и растворителя, количество которых достигает $\approx 10^6$. Ранее был описан подход (Yam и Wahab, 2009), при котором создавалось сферическое окружение из фрагментов рибосомы вокруг интересующего объекта. Атомы, которые находились на краю такой сферы, подвергали позиционным ограничениям, т.е. их движение было запрещено. В данной работе предложено строить не сферическое окружение, а кубическое, что позволяет более адекватно воспроизводить электростатические взаимодействия, характерные для рибосомы, минимизируя количество молекул воды в системе. Важным моментом является расположение нейтрализующих заряд катионов. Известно, что для образования компактной нативной структуры рибосоме необходимо высокое содержание ионов магния в растворе. Количество ионов магния, которое удалось обнаружить с помощью РСА, недостаточно для нейтрализации отрицательного заряда в системе. Известно, что существует определённая геометрия расположения фосфатных групп двух прилежащих остатков НК, между которыми образуется так называемый “магниевый мостик”. В данной работе разработали инструмент, который позволяет располагать катионы магния для образования таких мостиков в любой заданной системе, содержащей остатки нуклеиновой кислоты. После насыщения системы катионами магния оставшийся избыток отрицательного заряда нейтрализовали одновалентными катионами.

Взаимодействие пептидных производных 5-О-микаминозилтилонолида с рибосомным тоннелем

Для проверки возможностей выбранной стратегии сначала исследовали динамику комплекса тилозина с 23S рРНК из *H. marismortui*, структура кото-

рого известна (PDBID:1k9m). Среди множества доступных параметров, описывающих динамику системы, выбрано среднеквадратичное смещение (MSD) лактонного кольца относительно исходного (экспериментального) положения после суперпозиции системы относительно рибосомной части. Выбор такого параметра обуславливается его высокой чувствительностью к смещению антибиотика. Ожидается, что в ходе моделирования рибосомная часть не сможет иметь ни поступательных, ни вращательных движений. Именно смещение ключевого фрагмента макролида лактонного кольца будет индикатором нестабильности комплекса. В дополнение к нековалентным взаимодействиям, комплекс тилозина с рибосомой стабилизирован ковалентной связью, образованной экзоциклической аминогруппой нуклеотида A2062 и альдегидной группой лактонного кольца. В траекториях моделирования молекулярной динамики тилозин показал незначительное смещение за всё время наблюдения во временном диапазоне 250 нс. Это наблюдение показывает применимость нашего подхода для моделирования в микросекундном диапазоне времён. Суммарные данные об изменении MSD для всех изучаемых систем приведены на рисунке 4. Значения MSD для тилозина и его производного Вос-Gly-ОМТ (ОМТ – это 5-О-микаминозилтилонолид) выходят на равновесные значения на уровне 0.01 нм^2 , что соответствует смещению на 1 \AA . Это значение меньше разрешения РСА-структуры комплекса тилозина с рибосомой, что показывает высокое качество построенной модели. Значения MSD для Вос- γ -аминобутирил-ОМТ и ОМТ составляют 0.03 нм^2 и 0.06 нм^2 , соответственно. Смещение тилозина меньше производного Вос-Gly-ОМТ, благодаря наличию двух дополнительных остатков сахара, которые образуют дополнительные водородные связи с остатками РТ. В частности, остаток мицинозы образует три очень стабильные водородные связи с остатками G748 и A751 23S рРНК рибосомы *E. coli* (рис. 5). ОМТ образует всего одну стабильную водородную связь с остатками РТ, что, вероятно, и является основной причиной его относительно высокой подвижности при моделировании.

Необходимо отметить, что значения MSD для Вос-Gly-ОМТ производного сравнимы с таковыми для тилозина и значительно ниже, чем у исходного ОМТ и Вос- γ -аминобутирил-ОМТ. Это наблюдение указывает на эффективность сетки водородных связей, которую образует Вос-Gly группа. Действительно, обнаружено, что карбонильная группа глицина образует две водород-

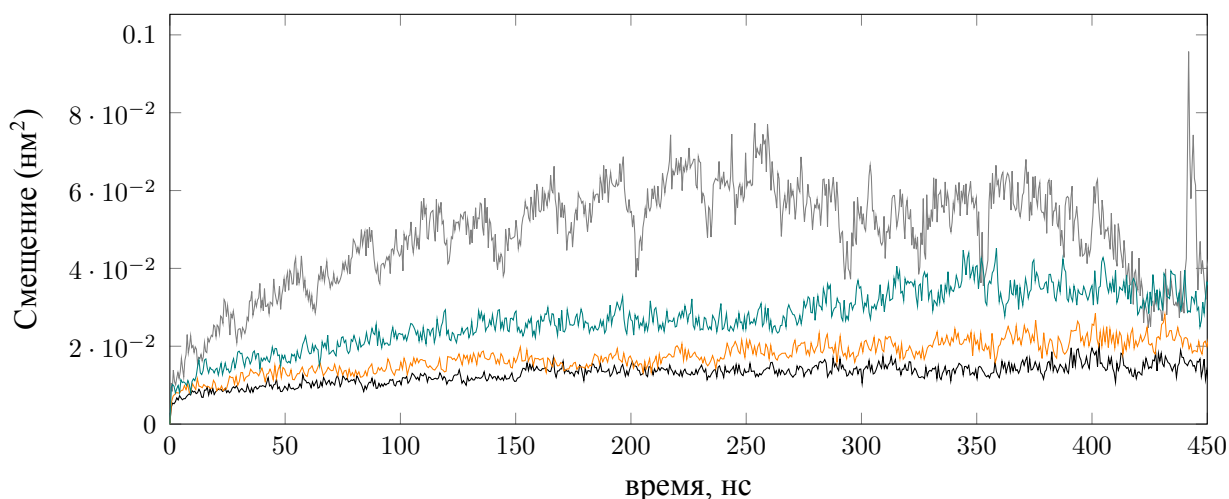


Рис. 4: Среднеквадратичное смещение лактонного кольца тилозина (чёрная линия), ОМТ (серая линия), Woc-Gly-OMT (оранжевая линия) и Woc- γ -аминобутирил-OMT (зелёная линия) производных в рибосомном тоннеле 50S субчастицы рибосомы *E. coli*.

ные связи: одна с аминокислотой Lys90 белка L22, вторая связь образуется с аминокислотой A752 из 23S рРНК (рис. 5B). Стабильность водородных связей составила 42% и 58% – эти значения показывают представленность водородной связи во всех полученных конфигурациях системы. Результаты моделирования согласуются с известным фактом о возможности карбонильного кислорода выступать в роли акцептора двух водородных связей. Принято считать, что водородная связь стабильна, если её доля составляет более 30%.

В отличие от Woc-Gly-OMT, Woc- γ -аминобутирил-OMT может формировать только одну стабильную водородную связь с A752 23S рРНК (рис. 5Г) и не образует водородную связь с остатком лизина из-за высокой подвижности прилегающей Woc- γ -аминобутирил группы.

Надо заметить, что Woc-группировка не вовлечена в явно выраженный гидрофобный контакт. Высокая эффективность гидрофобных взаимодействий определяется разницей в подвижности молекул воды в фазе и на поверхности контакта. В случае рибосомного тоннеля сложно рассматривать воду, находящуюся в фазе: практически все молекулы воды структурированы, что делает гидрофобный вклад минимальным.

Из рисунка 5 видно, что все рассматриваемые соединения образуют водородную связь между гидроксильной группой карбониламинного мостика и атомами кислорода A2062 и/или атомами кислорода O3 и O9 из лактонного

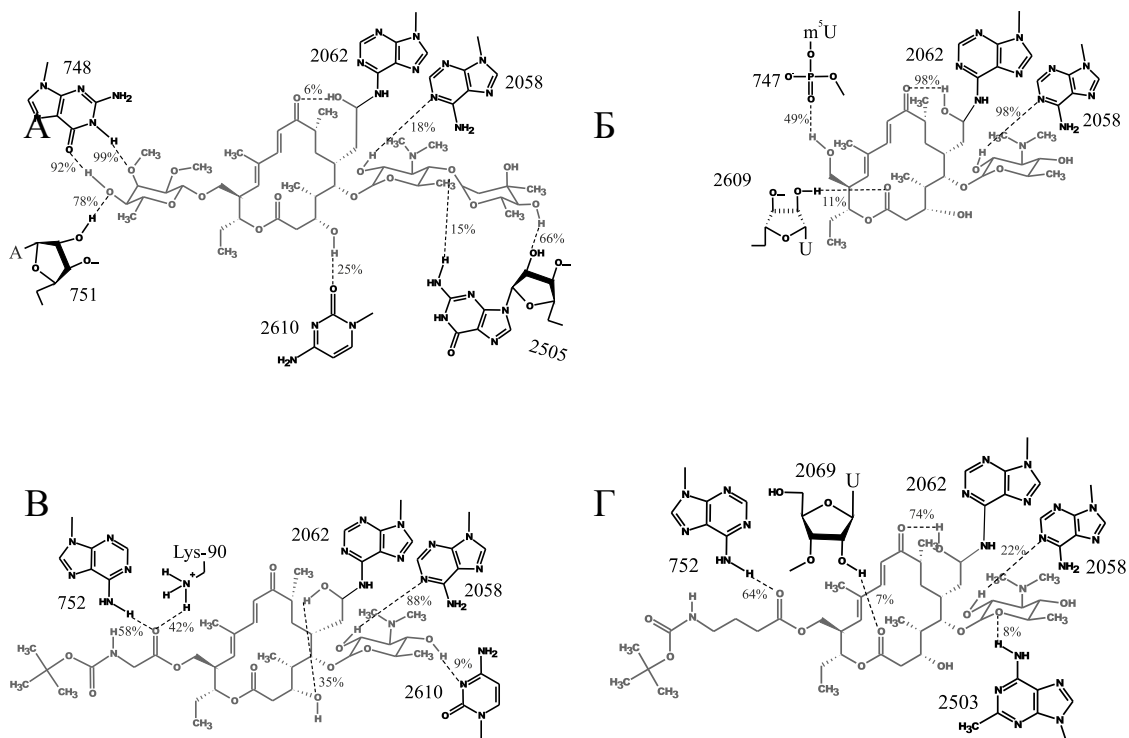


Рис. 5: Структуры тилозина (А), ОМТ (Б), Вос-Gly-ОМТ (В) и Вос- γ -аминобутирил-ОМТ (Г) и их водородные связи с остатками 23S рРНК и лизином 90 из белка L22 в рибосомном тоннеле 50S субчастицы рибосомы *E. coli*.

кольца. Роль этих водородных связей в стабилизации комплекса антибиотик-рибосома неочевидна.

При сравнении активности рассмотренных соединений в экспериментах по ингибированию трансляции *in vitro*, оказалось, что, действительно, Вос-Gly-ОМТ производное способно ингибировать трансляцию более эффективно, чем ОМТ. Замена большой гидрофобной Вос-группы на меньшую гидрофильную формил-группу не приводит к изменению активности, что подтверждают наблюдения, сделанные по результатам моделирования.

Мы уже отметили, что антибиотики тилозинового ряда обладают необычной возможностью формировать ковалентную связь с РТ, благодаря наличию альдегидной группы в шестом положении. Эффективность реакции определяется ориентацией альдегидной группы антибиотика в положении С20 и аминогруппы А2062 23S рРНК. Именно на этапе нековалентного связывания водородные связи обеспечивают достаточно точную ориентацию молекул в пространстве. Электростатические, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия и гид-

рофобный эффект не вносят вклад в точное расположение участников реакции, и их энергия равномерно убывает с изменением расстояния. Водородным связям для эффективного вклада в общую энергию связывания требуются достаточно жесткие геометрические ограничения, которые позволяют специфически ориентировать молекулу антибиотика для успешного протекания реакции образования ковалентной связи. Этот сложный двухступенчатый процесс уже описывался ранее кинетически. Тем не менее, наше моделирование проводилось для состояния так называемого конечного комплекса модели, похожей на РСА-модель для *H. marismortui*, что не позволяет *apriori* утверждать о наличии прямых корреляций результатов моделирования с экспериментами на рибосомах *E. coli*. Тем не менее, сравнивая ингибирующую активность производных в ряду тилозин-ОМТ-производные с изменением представленности водородных связей антибиотиков с РТ в моделировании, можно предложить достаточно разумное объяснение для наблюдаемых экспериментальных данных. Особенно интересно отметить высокую активность N-ацилглицин-содержащих соединений. Удивительно, что именно атомы, принадлежащие остову пептида, способны образовывать две стабильные водородные связи как с белком L22, так и с A752 23S рРНК. Известно, что A752 образует Уотсон-Криковскую пару с U2609, и эта пара является ключевым структурным и функциональным элементом рибосомного тоннеля. Она вовлечена во взаимодействия как с “тормозящим” пептидом, так и с макролидными антибиотиками. С другой стороны, функциональная значимость лизина 90 рибосомного белка L22 также хорошо известна. Его мутации приводят к множественным изменениям ассоциированных с активностью “тормозящего” пептида TnaC.

В этой части работы исследован новый потенциальный сайт взаимодействия остова растущего пептида с поверхностью рибосомного тоннеля. Эти взаимодействия и их эффективность зависят от последовательности и конформации остова соответствующей части растущей полипептидной цепи, регулируя скорость прохождения растущим пептидом рибосомного тоннеля. Вероятно, эти контакты могут влиять на самосборку белка на выходе из рибосомного тоннеля.

Низкоамплитудные движения азотистых оснований рРНК играют ключевую роль в связывании антибиотиков. Результат работы указывает на высокую точность полноатомного моделирования и детальное воспроизведение гео-

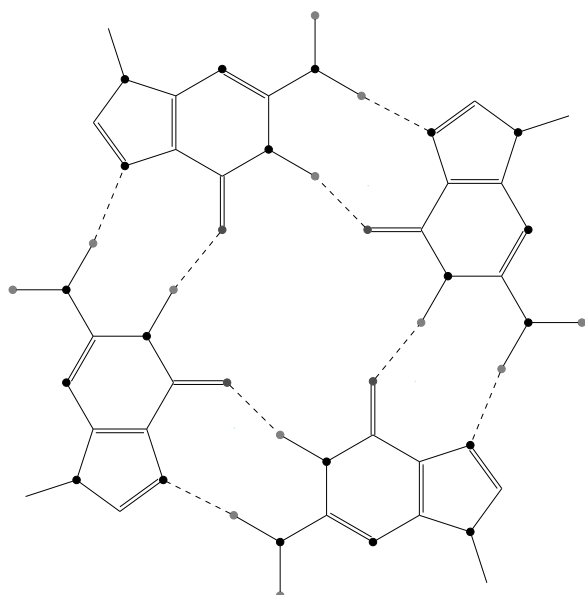


Рис. 6: Схема G-квартета. Представлены четыре остатка гуанина из копланарной четвёрки квартета. Каждый нуклеотид одновременно является и донором, и акцептором водородной связи. Донорами протонов являются атомы N1 и N2. Акцепторы в водородной связи – атомы O6 и N7.

метрии водородных связей, необходимых, в данном случае, для позиционирования альдегидной группы тилозиновых производных. Важно отметить, что значительных изменений в сахаро-фосфатном остове обнаружено не было, что и предполагалось при построении модели. Для полного описания и определения динамики движения остова НК рибосома не самый удобный объект.

Зависимость структуры квадруплексов от топологии молекулы

Для полного понимания функциональной динамики НК было решено исследовать небольшие НК, обладающие характерным структурно-функциональным профилем.

Известно, что в различных условиях тяжи гуаниновых олиго- и полинуклеотидов способны взаимодействовать друг с другом. С помощью РСА было показано, что такие полигуаниновые фрагменты образуют неканоническую структуру ДНК - четырёхцепочечную спираль, где четыре гуаниновых основания из разных цепей образуют плоскую структуру, удерживаемую попарными водородными связями (рис. 6). Каждый G-квартет стабилизирован восемью водородными связями.

Гуаниновые квадруплексы могут формировать короткие олигонуклеотиды с соответствующей последовательностью, имеющей следующий паттерн: $G_m X_n G_m X_o G_m X_p G_m$, где m — количество гуанинов в G-блоке в последовательности ДНК, которые и формируют G-тетрады. X_n , X_o и X_p могут быть комби-

нацией любых остатков, включая G; такие участки формируют петли между G-тетрадами.

Внутримолекулярные тетраплексы образуются из одноцепочечной молекулы в результате сложной пространственной укладки, которую часто называют топологией. Фундаментальный элемент всех квадруплексных структур — G-квартет. Квартеты в структуре квадруплекса располагаются друг над другом, а для структурной стабильности тетраплекса необходимо минимум два квартета.

Кроме перечисленных особенностей, у квадруплексов существует весьма специфическая важная составляющая: большой вклад в стабильность вносит координация Об-карбонилов катионами металлов. Атомы Об образуют квадрат в каждом квартете, и в квадруплексе, состоящем из двух квартетов, образуют бипирамидальную антипризму с расстоянием $3,3\text{\AA}$ между квартетами.

Участки НК, разделяющие G-блоки, формируют петли трёх типов. Во внутримолекулярном квадруплексе с параллельными тяжами необходима петля, соединяющая нижнюю G-тетраду с верхней, в результате чего получают петли пропеллерного типа. Антипараллельные квадруплексы образуются, если хотя бы одна цепь антипараллельна другим. Такая топология тетрад обнаружена в большинстве определённых на текущий момент бимолекулярных и внутримолекулярных квадруплексных структур. В этих структурах, помимо пропеллерных петель, наблюдается ещё один тип петель. Латеральные (боковые) петли соединяют соседние G-тяжи. Две таких петли могут располагаться как с одного, так и с противоположных полюсов молекулы, что в бимолекулярных комплексах соответствует расположению “голова к голове” или “голова к хвосту”. Второй тип антипараллельных петель - диагональные петли, которые соединяют противоположные G-тяжи.

В этой части работы была сделана попытка выявить взаимосвязь между структурой и свойствами G-квадруплексных ДНК и определить топологические факторы, влияющие на геометрию квадруплексов.

Классификация квадруплексных структур

В качестве структурных характеристик квадруплексов было выбрано два параметра: первый - это угол закручивания квадруплекса, т.е., угол закручивания двух соседних квартетов относительно друг друга, описываемый углом

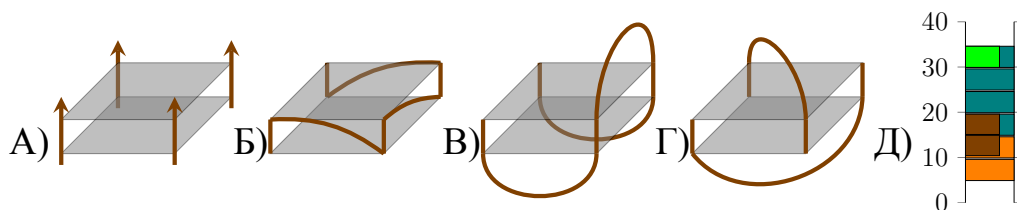


Рис. 7: Схематическое изображение разных топологий G-квадруплексов. А) Четерёхтяжевой беспетлевой квадруплекс. Б) Мономолекулярный квадруплекс с пропеллерными петлями. В) Мономолекулярный квадруплекс с латеральными петлями. Г) Двухтяжевой квадруплекс с диагональными петлями. Д) Распределение значений углов закрутки для разных топологий квадруплексов. Оранжевым отмечены квадруплексы с латеральными петлями, тёмно-зелёным – беспетлевые квадруплексы, коричневым – квадруплексы с диагональными петлями, зелёным – с пропеллерными петлями.

между двумя векторами, проходящими через атомы С1' двух соседних гуанинов. Этот параметр используется для описания структур двойной спирали. В качестве второго параметра выбрано расстояние между центрами масс двух квадратов, образованных атомами О6 и N9, соответственно, которое описывает отклонение квартетов от идеальной планарности. Два таких параметра позволяют описать конформационный полиморфизм и конформационную подвижность структуры квадруплексной ДНК.

Четырёхтяжевой межмолекулярный параллельный квадруплекс является простейшим случаем, который характеризуется лишь одной из указанных переменных — количеством G-квартетов. Эта переменная определяет границы, в которых могут существовать такие структуры без нарушения своей целостности. Границы довольно широки: угол закручивания может составлять 19° - 36° , с двумя областями предпочтительных значений: 21° и 27° - 34° . Движения крайних квартетов таких структур ограничены лишь стэкинг-взаимодействиями с прилежащими квартетами и координационными связями со стабилизирующими катионами, если таковые есть.

Латеральные петли структур типа “кресло” ограничивают геометрию квадруплексов, более того, они переводят её в такую область, где значения углов закручивания несвойственны беспетлевым квадруплексам. Для структур с петлями только латерального типа область предпочтительных значений угла находится в промежутке $15^\circ \pm 5^\circ$. Отсюда следует, что латеральные петли, в ос-

новном, из-за небольшой длины делают структуру квадруплекса существенно напряжённой.

Интересно, что петли диагонального или пропеллерного типа в структуре типа “кресло” существенно влияют на распределение углов закручивания. Происходит сдвиг предпочтительной области значений углов в сторону больших величин, уже характерных для беспетлевых параллельных G-квадруплексов. Кроме того, появляется второе множество значений угла, которое соответствует области, отличной от характерных значений для петель латерального типа.

В структурах типа “корзина” хорошо видно, насколько велико изменение, создаваемое латеральными петлями, располагающимися с одного полюса молекулы. Момент, создаваемый этими силами, разворачивает прилегающую к диагональной петле часть квадруплекса в область, где углы закручивания составляют $36^\circ \pm 4^\circ$. Такие значения углов закручивания нехарактерны для структур с петлями только диагонального типа. В подобных структурах геометрия квадруплексов довольно жёстко ограничена значениями углов $19^\circ \pm 4^\circ$, что ближе к значениям, приемлемым для беспетлевых квадруплексов.

Можно заключить, что напряжения, создаваемые латеральными петлями, сильнее напряжений, создаваемых петлями диагонального типа.

Пропеллерные петли наиболее жёстко определяют геометрию квадруплекса. Как в мономолекулярных, так и в бимолекулярных тетраплексах с петлями только пропеллерного типа значения углов закручивания изменяются в пределах $31^\circ \pm 3^\circ$. Даже добавление к таким структурам латеральных петель слабо сказывается на закручивании прилежащих к пропеллерным петлям областей — оно характеризуется значением угла $28^\circ \pm 4^\circ$. Видимо, такие углы закручивания соответствуют оптимальной геометрии G-квартета, поскольку тетрады структур с петлями пропеллерного типа отличаются высокой планарностью, в отличие от квадруплексов с диагональными петлями.

В данной части работы проанализированы все известные на данный момент G-квадруплексные структуры. Эти структуры группируются не только по топологии; многие группы представлены структурами с общим или родственным происхождением. Основным источником напряжений в структуре квадруплексов являются петли, соединяющие блоки G-тяжей. Петли латерального типа больше всего изменяют геометрию G-квадруплексов, однако их воздей-

ствие компенсируется присутствием в структуре петель диагонального и пропеллерного типа. Петли диагонального типа также достаточно жёстко определяют структуру квадруплекса, однако создаваемые ими напряжения не столь велики, как в случае с латеральными петлями. Оптимальной геометрией характеризуются квадруплексы с петлями пропеллерного типа.

Очевидный интерес для дальнейшего детального исследования динамики молекулы НК представляют небольшие квадруплексы с дестабилизирующими петлями. Эти объекты позволяют наблюдать всё разнообразие конформационных переходов молекулы в процессе функционирования.

Конформационная динамика минимального аптамера к тромбину

Аптамеры - это молекулы ДНК или РНК, отобранные из рандомизированных библиотек олигонуклеотидов, на способность связываться с заданным лигандом.

Тромбин-связывающий 15-нуклеотидный аптамер (15-ТВА, 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') – это интригующий пример структуры ДНК, содержащей G-квадруплекс. Кроме заложенной отбором возможности связываться с тромбином и, следовательно, высокого потенциала для медицинского применения, 15-ТВА является уникальной молекулой для исследования основных физико-химических свойств сборки и для анализа баланса стабилизирующих сил G-квадруплексов в ДНК. 15-ТВА содержит минимально возможное количество G-квартетов: всего два. Поскольку беспетлевые квадруплексы с двумя квартетами не найдены, возникает вопрос: как петли стабилизируют G-квадруплексную структуру 15-ТВА?

15-ТВА содержит три коротких петли, которые обеспечивают целостность структуры квадруплекса и необходимы для связывания с тромбином. Петли могут влиять на G-квадруплексный стебель как путём стабилизации, так и путём дестабилизации. Дестабилизирующий эффект может определяться длиной петель. Например, короткая петля не соответствует оптимальной геометрии квадруплекса. Стабилизирующее действие может быть следствием дополнительных стэкинг-взаимодействий и экранированием молекул воды, которые

могут обменивать любую водородную связь внутри структуры без потери энтальпии системы.

Наряду с общими нетривиальными свойствами 15-ТВА, понимание его структуры осложняется взаимоисключающими экспериментальными данными, полученными для электронной плотности аптамера в комплексе с тромбином методом РСА, и данными ЯМР о взаимном расположении протонов для свободного аптамера в растворе. Основное различие - это ориентация цепи ДНК: одна конформация является зеркальным отражением другой. Кроме того, различаются положение и способ координации стабилизирующего катиона. Marathias и Bolton предположили, что с 15-ТВА связываются два катиона калия; по другим данным, с ним связывается только один катион. Информация о связывании аптамера с тромбином тоже противоречива, например, в случае предполагаемого комплекса аптамера с тромбином в стехиометрии 1:2 вторая молекула белка может стабилизировать структуру аптамера. Моделирование молекулярной динамики нередко используют для выяснения механизмов взаимодействия одновалентных катионов с нуклеиновыми кислотами, включая G-квадруплексные ДНК. Однако существуют очевидные ограничения. Например, описание простого парного взаимодействия в силовом поле не может учесть поляризацию электронного облака, что является ключевым фактором при координации катионов. На этом этапе работы нас интересовало влияние на стабильность квадруплекса частицы с положительным зарядом определённого радиуса.

В данной части работы проведено сравнение динамики опубликованных конформаций 15-ТВА, их поведение в комплексе с тромбином, а также искусственно созданной структуры двуквартетного беспетлевого квадруплекса (рис. 8).

Суммарное время наблюдения в проведенных расчётах превышает 12 микросекунд, что является достаточно значимым для такой небольшой молекулы. Эта часть разбита на два основных раздела. Сначала проведён анализ двух известных на сегодняшний день двух моделей аптамера 15-ТВА. Вторая часть посвящена сравнению этих моделей с моделями всех известных комплексов с тромбином.

Из результатов моделирования становится очевидно, что в свободном состоянии в растворе устойчива только ЯМР-модель (Таблица 1, рис. 9); в

Система	Исследуемый фактор	Результат
Четырёхтяжевой квадруплекс, состоящий из двух G-квартетов с катионом калия в центре.	Влияние петель на стабильность G-стебля	G-стебель был стабилен в течение всех 700 наносекунд наблюдения
Четырёхтяжевой квадруплекс, состоящий из двух G-квартетов без катиона в центре*	Роль катиона в стабилизации G-стебля.	G-стебель потерял структуру в начале наблюдения
ЯМР-модель с заменой катиона калия на катион натрия.	Влияние параметров описания катиона на поведение стабильной структуры 15-ТВА и её геометрию	Не замечено значительной разницы в поведении структуры в комплексе с разными катионами.
ЯМР-модель без катиона внутри квадруплекса	Влияние стабилизирующего иона на структурную стабильность 15-ТВА.	Несмотря на высокую амплитуду флуктуаций, модель сохранила квадруплексную структуру. Через 72 нс катион натрия из раствора проник в центр квадруплекса через ТТ-петли и стабилизировал молекулу до конца наблюдения.
ЯМР-модель, где основание Т9 ориентировано в раствор и не образует стэкинга с верхним квартетом (TG(-T) ЯМР)	Способна ли ЯМР-модель сохранить структуру, если только G8 из TGT-петли образует стэкинг с G-квадруплексом?	Аптамер потерял структуру квадруплекса; все квартеты потеряли геометрию, несмотря на наличие пары Т4-Т13 в стартовой структуре
РСА-модель, где основание Т9 образует стэкинг с G-квартетом (TG(+T) РСА)	Может ли стекинг-взаимодействие одного основания сделать РСА-модель стабильной?	Модель проявила гораздо большую стабильность и сохраняла квадруплексную структуру в течение 790 нс; в этот момент основания Т4 и Т13 образовали стекинг-взаимодействие, которое привело к нарушению планарности нижнего квартета, и квадруплексная геометрия была потеряна

Таблица 1: Исследование влияния различных факторов на структурную стабильность 15-ТВА методом моделирования молекулярной динамики;

* Исходно катиона не было в центральной полости квадруплекса, но в растворе, очевидно, были катионы, способные проникнуть внутрь квадруплекса.

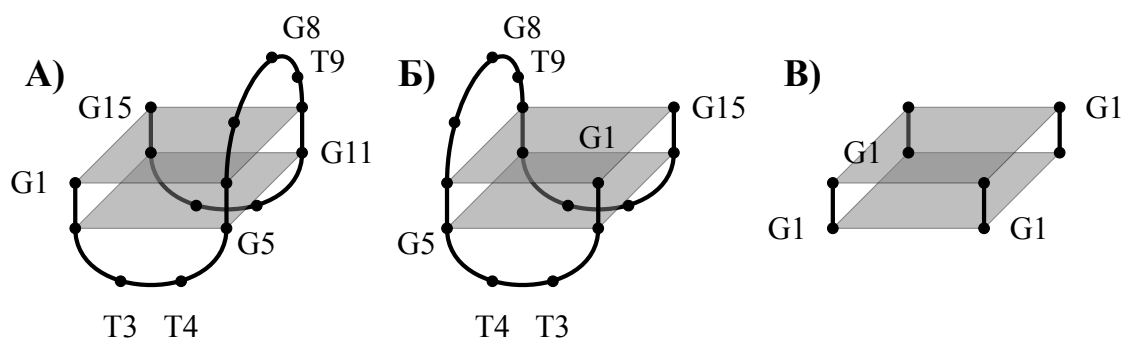


Рис. 8: G-квадруплексные молекулы, которые использовались в моделировании молекулярной динамики. А) 15-ТВА, по данным ЯМР (Schultze, Macaya и Feigon, 1994). Б) 15-ТВА, по данным РСА (Padmanabhan и др., 1993). В) Двуквартетный беспетлевой квадруплекс.

то время, как РСА-модель даже при усилении стэкинг-взаимодействий теряла структуру квадруплекса. Основная причина такого различия в стабильности – внутримолекулярные взаимодействия, которые могут либо стабилизировать, либо разрушать структуру G-квадруплекса. Стабилизирующая роль, в основном, принадлежит TGT-петле и катиону внутри квадруплекса; в настоящий момент нельзя достоверно оценить относительный вклад каждого из них. Модель структуры аптамера, по данным ЯМР проявила относительно высокую стабильность даже в отсутствие катиона внутри квадруплекса. Более того, в ходе моделирования наблюдался захват катиона из раствора и полноценная стабилизация структуры. В то время, как “беспетлевая версия” 15-ТВА не способна сохранять структуру до захвата катиона.

Полученные данные позволяют построить следующий ряд в порядке уменьшения стабильности: 15-ТВА (ЯМР-модель) > “беспетлевая модель” 15-ТВА > 15-ТВА (РСА-модель).

При смещении нуклеотида T9 из TGT-петли, сопровождаемом ослаблением стэкинг-взаимодействия петли с верхним квартетом, наблюдается дестабилизация структуры даже при наличии стабилизирующего катиона в центре квартета. Эти результаты указывают, но не доказывают потенциально важную роль стэкинг-взаимодействий нуклеотида T9 с квадруплексом, поскольку искусственное вмешательство в структуру аптамера может как-то иначе дестабилизировать структуру, и в ходе моделирования МД она не восстанавливается. В ходе динамики дестабилизированной структуры её разрушение было связано с поведением TT-петель: когда T9 не находится в стэкинг-взаимодействии с верх-

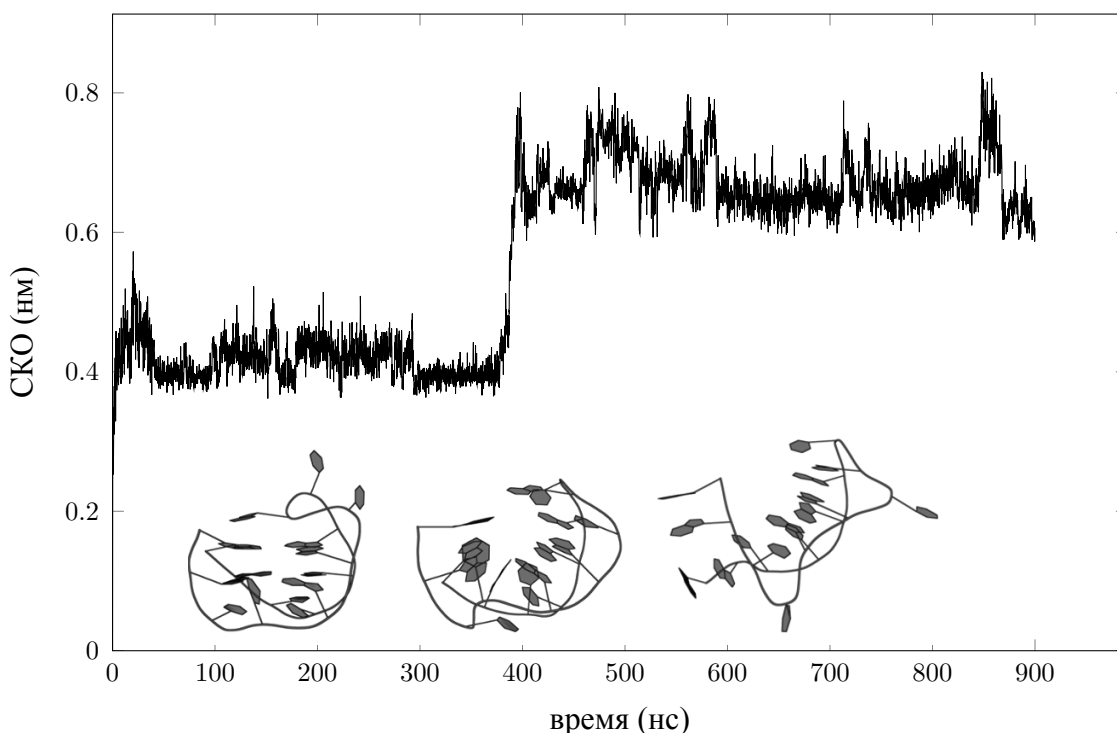


Рис. 9: Конформации аптамера 15-ТВА в соответствующие моменты траектории, совмещённые с графиком зависимости среднеквадратичного отклонения (СКО) всех атомов текущей структуры от времени наблюдения. Первое изображение соответствует стартовой структуре.

ним квартетом, TGT-петля не способна компенсировать дестабилизирующий эффект TT-петель. Безусловно, более точное описание взаимодействия квадруплекса с катионом может изменить оценку баланса сил, но экспериментальные данные по мутагенезу 15-ТВА косвенно подтверждают роль TGT-петли. Согласно полученным в работе данным, в стэкинг-взаимодействиях с квадруплексом должны участвовать, как минимум, два нуклеотида TGT-петли, а именно, G8 и T9, а внутримолекулярные взаимодействия для T7 не были найдены. Вероятно, T7 нужен для обеспечения достаточной длины петли. Согласно работе Смирнова и коллег (Smirnov и Shafer, 2000) оптимальная длина верхней петли составляет три нуклеотида. Это наблюдение также коррелирует с данными американского патента Griffin и коллег, в котором использовались модифицированные нуклеотиды при синтезе 15-ТВА. Единственная модификация, которая не нарушала ингибирующую активность аптамера, это апириимидиновое звено в положении 7.

Удаление гетероциклических оснований во всех остальных позициях 15-ТВА приводило к существенному падению активности аптамера (которую регистрировали по времени образования тромба в плазме крови). При моде-

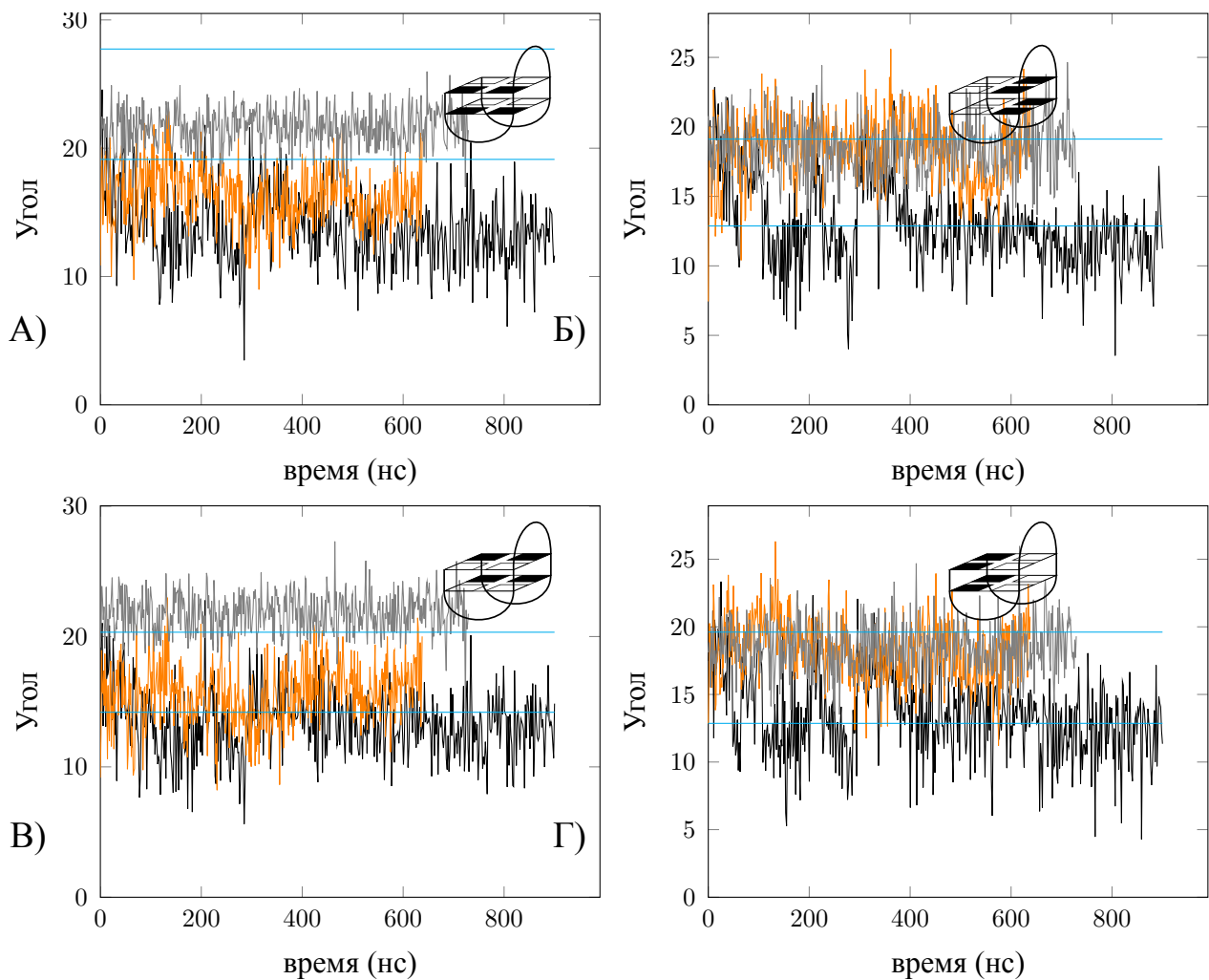


Рис. 10: Зависимость угла закрутки между квартетами от времени. Угол измерялся для разных систем в разных бороздках, что отражено в схематических вставках (А,Б,В,Г). Серыми линиями обозначен угол между квартетами в беспетлевой структуре, чёрными линиями – ЯМР-конформация 15-ТВА в свободном состоянии, коричневыми линиями – комплекс ЯМР-конформации с тромбином в соотношении 1:1. Две горизонтальные синие линии указывают на диапазон значений, которые можно обнаружить в 12 моделях ЯМР-структуры (PDBID:148d).

лировании обнаружилось несколько признаков дестабилизирующего эффекта ТТ-петель на G-квадруплекс. Одно из них – это изменение угла закрутки квадруплекса (рис. 10). Вероятно, ТТ-петли слишком коротки для оптимальной геометрии квадруплекса и вызывают напряжения в структуре. Надо отметить, что в ходе динамики ЯМР-модели 15-ТВА ТТ-петли существенно изменили свою конформацию (рис. 11), поскольку в исходной модели конформации ТТ-петель были напряжены и релаксировали в ходе моделирования МД.

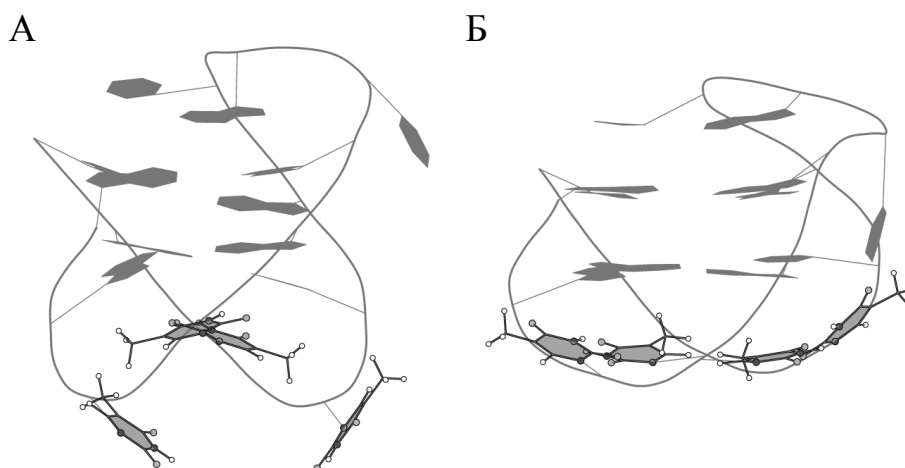


Рис. 11: А) Структура ЯМР-модели 15-ТВА из банка данных PDB (PDBID:148d). Б) Структура после моделирования МД для конформации слева. Тимины из ТТ-петель обведены чёрными линиями.

Подобное поведение петель можно объяснить двояко, причём оба объяснения равноценны. Первое: стартовая структура неидеальна, и в ходе моделирования происходит её оптимизация. Второе: геометрия петель в квадруплексе может неточно воспроизводиться при использовании приближений, на которых построено силовое поле, как это наблюдалось и ранее. Следовательно, в ходе моделирования МД происходит оптимизация структуры аптамера относительно стартовой геометрии, и она имеет смысл в терминах используемого силового поля. Важно отметить, что при моделировании ЯМР-структуры со смещённым из стэкинг-взаимодействий Т9 и при релаксированном состоянии ТТ-петель, структура показала высокую стабильность и в ходе моделирования восстановила положения нуклеотида Т9. Аналогичное наблюдение было сделано и при моделировании системы, где одновременно изменялись положения G8 и Т9. Таким образом, сделано очень важное наблюдение: оптимизация геометрии ТТ-петель приводила к общей стабилизации структуры аптамера 15-ТВА.

Влияние петель на структурную стабильность 15-ТВА в комплексе с тромбином

ТТ-петли играют критическую роль и при связывании аптамера с тромбином. Если конформация аптамера, полученная методом РСА, верна, то связывание с тромбином должно происходить при участии TGT-петли. Несмотря на множество контактов, которые образует петля с белком и которые могли бы стабилизировать квадруплекс, дестабилизирующее действие ТТ-петель становится ещё более выраженным в моделировании динамики. С другой стороны,

в случае ЯМР-модели, с тромбином взаимодействуют ТТ-петли (таблица 2), и этот контакт уменьшает напряжение G-квадруплекса в комплексе, по сравнению с моделированием динамики. Это видно из значения угла закрутки квадруплекса (рис. 10). Очевидно, что ЯМР-модель более предпочтительна. Кроме того, это созвучно идее о том, что тромбин является “шапероном” для 15-ТВА, поскольку экспериментально показано образование квадруплексной структуры при взаимодействии с тромбином в отсутствие катионов калия.

Интересна роль нуклеотида Т3, который не представлен в таблице 2. Этот нуклеотид также взаимодействует с тромбином путём стэкинг-взаимодействий с Туг76 (позже, в 2012 г. методом РСА было подтверждено такое взаимодействие (Krauss и др., 2012)). Необходимо отметить, что большинство новых водородных связей, образуемых Arg77 с аптамером, были также обнаружены экспериментально методом РСА; все эти связи могут существовать в комплексе, так как Arg77 достаточно подвижен. По новым данным РСА, атом азота в δ -положении Asn78 находится на расстоянии 4Å от O3'-кислорода нуклеотида Т13, что указывает на возможность образования водородной связи – это было показано в настоящей работе. Следовательно, моделирование МД комплекса обнаруживает новые водородные связи, наличие практически всех из которых были позднее подтверждены методом РСА (Russo Krauss и др., 2012). Из таблицы водородных связей видно, что Arg77 способен образовывать большее количество водородных связей, чем Arg75 (не одновременно). Именно такая возможность переключения водородных связей может приводить к эффективному связыванию. Для макромолекулярного комплекса гораздо выгоднее, когда тепловое движение вызывает переключение водородных связей между атомами самих макромолекул, чем их обмен с растворителем.

Моделирование МД комплексов аптамер-тромбин в стехиометрии 1:2 показало, что эти структуры стабильны и, вероятно, могут существовать. Комплекс аптамера в РСА-конформации и тромбина в соотношении 1:2 показал важность ТТ-петель для взаимодействия с белком. Множественные контакты ТТ-петель с белком в экзосайте II (эти контакты возникают благодаря контактам соседних кристаллических ячеек) предотвращают разрушение структуры аптамера при времени наблюдения 600 нс.

Как это отмечалось ранее, G-квадруплекс ЯМР-структуры аптамера 15-ТВА напряжён, благодаря малой длине ТТ-петель, в то время, как TGT-петля

Начальная модель			Конечная модель		
донор	водород	акцептор	донор	водород	акцептор
N3 (T12)	H3 (T12)	OE2 (Glu77)	<i>ND2 (Asn 78)</i>	<i>HD22</i>	<i>O3' (T13)</i>
N3 (T12)	H3 (T12)	O (Glu77)	<i>NH2 (Arg 77A)</i>	<i>HH22</i>	<i>O1P (G14)</i>
OG (Ser153)	HG (Ser153)	O4 (T7)	<i>NH2 (Arg 77A)</i>	<i>HH22</i>	<i>O4' (G14)</i>
OH (Tyr117)	HH (Tyr117)	O1P (T13)	<i>NH1 (Arg 77A)</i>	<i>HH12</i>	<i>O (T13)</i>
N (Asn78)	H (Asn78)	O (T13)	<i>NH1 (Arg 77A)</i>	<i>HH12</i>	<i>O5' (G14)</i>
NE (Arg77A)	HE (Arg77A)	O1P (G14)	<i>NH1 (Arg 77A)</i>	<i>HH12</i>	<i>O4' (G14)</i>
N (Tyr76)	H (Tyr76)	O4' (T4)	N (Tyr 76)	H	O4' (T4)
NH2 (Arg75)	HH22 (Arg75)	O (T4)	NH2 (Arg 75)	HH22	O4 (T13)
NH1 (Arg75)	HH12 (Arg75)	O4 (T13)	NH1 (Arg 75)	HH12	O (T4)
NE (Arg75)	HE (Arg75)	O (T4)	<i>NH1 (Arg 75)</i>	<i>HH12</i>	<i>O4 (T13)</i>

Таблица 2: Карта водородных связей в комплексе тромбина с ЯМР-конформацией аптамера 15-ТВА, по результатам моделирования молекулярной динамики. Водородные связи, которые сохранились в ходе моделирования МД, отмечены жирным, а вновь образованные отмечены наклонным шрифтом.

стабилизирует квадруплекс. Согласно исследованию Baldrich и коллег (Baldrich и O'Sullivan, 2005) при связывании тромбина наблюдается уменьшение структурного напряжения, вызванного ТТ-петлями в структуре аптамера. Необходимо подчеркнуть, что в данной работе заключения строятся только на анализе моделирования МД, но они хорошо коррелируют с экспериментальными данными. Эксперименты по численному моделированию с расчётом свободной энергии не предпринимались, т. к. подходящий прямой метод для расчётов с приемлемой точностью недоступен.

В 2010 году в нашем исследовании время наблюдения на 1-2 порядка превосходило известные данные о моделировании МД для G-квадруплексных ДНК. Такие “длинные” траектории МД повышают достоверность получаемых данных и лучше коррелируют с экспериментальными данными. Так, мы наблюдали несколько значимых изменений при времени наблюдения более 50 нс. Очевидно, что временные интервалы моделирования в микросекундном диапазоне короче, чем времена реальных конформационных изменений. Ранее для исследуемой структуры аптамера 15-ТВА некоторые структурные данные уже подвергались сомнению, которые подтвердились в наших расчётах, и позднее они были доказаны методом РСА высокого разрешения (Russo Krauss и др., 2012).

Наше моделирование позволяет сделать заключение о том, что петли, в целом, стабилизируют структуру квадруплекса в составе 15-ТВА. Однако ТТ-петли, которые помогают сохранять тяжи квадруплекса сближенными, имеют дестабилизирующее действие на квадруплекс, благодаря короткой длине в два

нуклеотида. TGT-петля, напротив, во всех отношениях, оказывает стабилизирующее действие. TT-петли участвуют в узнавании тромбина, и связывание белка уменьшает структурное напряжение в G-квадруплексе, приближая его геометрию к оптимальному состоянию. Проведённое моделирование полностью подтверждает выбор ЯМР-структуры аптамера 15-ТВА. Полученные результаты могут лечь в основу конструирования биосенсоров на основе аптамера 15-ТВА и, кроме того, возможные модификации структуры 15-ТВА необходимы для разработки терапевтического антитромботического аптамера.

Взаимодействие аптамера 15-ТВА с катионами

Динамика структуры и стабильность G-квадруплексов во многом определяется связыванием катионов внутри квадруплексного стебля, а также связыванием катиона с петлями.

В предыдущей главе мы показали, как длина и конформация петель, соединяющих тяжи квадруплекса, влияют на его геометрию и стабильность. Кроме того, правильно упакованный мономолекулярный G-квадруплекс без катиона в центре может быть стабильным при моделировании МД в явно заданном растворителе достаточно продолжительное время, чтобы иметь возможность захватить катион щелочного металла из раствора. В этой части работы мы исследовали роль катионов в структурной динамике квадруплексной ДНК на примере 15-ТВА.

В предыдущей части работы мы не наблюдали образования комплексов со стехиометрией 1:2 между аптамером и катионами, о которой ранее сообщали Marathias и Bolton (Marathias и Bolton, 2000). Более того, положение катиона внутри квадруплекса отличалось от описанного ранее в литературе, где предполагали существование двух сайтов связывания катиона калия в аптамере 15-ТВА. Первый сайт располагался между петлёй TGT и прилежащим к петле квартетом, а второй сайт был расположен между TT-петлями. О положении катиона в центре не сообщалось. В нашей работе мы исследовали эту систему методами моделирования молекулярной динамики, гибридной молекулярной механики/квантовой механики (ММ/КМ) и изотермической калориметрии. Рассчитано более 30 траекторий молекулярной динамики.

Моделирование МД не обнаружило образование комплекса аптамера с катионом со стехиометрией 1:2. Можно предположить три сайта связы-

вания катиона в структуре 15-ТВА. Один из них – это известный сайт в центре квадруплекса, а два другие – это сайты, которые обнаружили Marathias и Bolton в месте контакта квадруплекса и петель. При моделировании молекулярной динамики только один центральный сайт оказался стабильным. Два других действуют как промежуточные ловушки при захвате катиона из раствора и не могут удержать катион надолго, после чего он перемещается в центр квадруплекса или возвращается в раствор, если центр уже занят другим катионом. Мы полагаем, что верхний сайт связывания является более значимым, так как при связывании в нижнем сайте образование ТТ-пары препятствует диффузии катиона внутрь квадруплекса.

Атомное моделирование позволяет увидеть детали миграции катионов в центр G-ДНК В работе получена уникальная информация о путях диффузии катиона внутрь квадруплекса аптамера 15-ТВА. Диффузия может идти двумя путями с каждой стороны квадруплекса: сверху и снизу. Верхний путь определяется азотистым основанием остатка G8 из TGT-петли и размером поры, образуемой между атомами кислорода O6 гуанинов верхнего квартета. Нижний путь определяется неканонической ТТ-парой внизу аптамера и, как и в предыдущем случае, размером поры между атомами O6 гуанинов нижнего квартета. Когда квадруплекс не связан с катионом, все пути свободны, благодаря электростатическому отталкиванию карбонильных групп. Атом N3 из G8, расположенный над порой в квартете, тоже несёт частично отрицательный заряд, который сдвигает основание G8 в сторону от этой поры. Благодаря балансу гидрофобного эффекта и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, основание двигается только параллельно плоскости прилежащего квартета (рис. 12В). Основание T9 не имеет атомов с выраженным отрицательным зарядом рядом с центром квартета, и его положение и динамика незначительно меняется от присутствия катиона в центре квадруплекса.

Как только катион связался где-либо с аптамером, его перемещение в центр происходит достаточно быстро. При попадании катиона в центральный сайт связывания все перечисленные выше ворота стремятся “закрыться”. Размер поры между атомами кислорода в квартете уменьшается, благодаря электростатическому притяжению к катиону. Это движение предотвращает выход катиона обратно в раствор. По той же причине основание остатка G8 смещает-

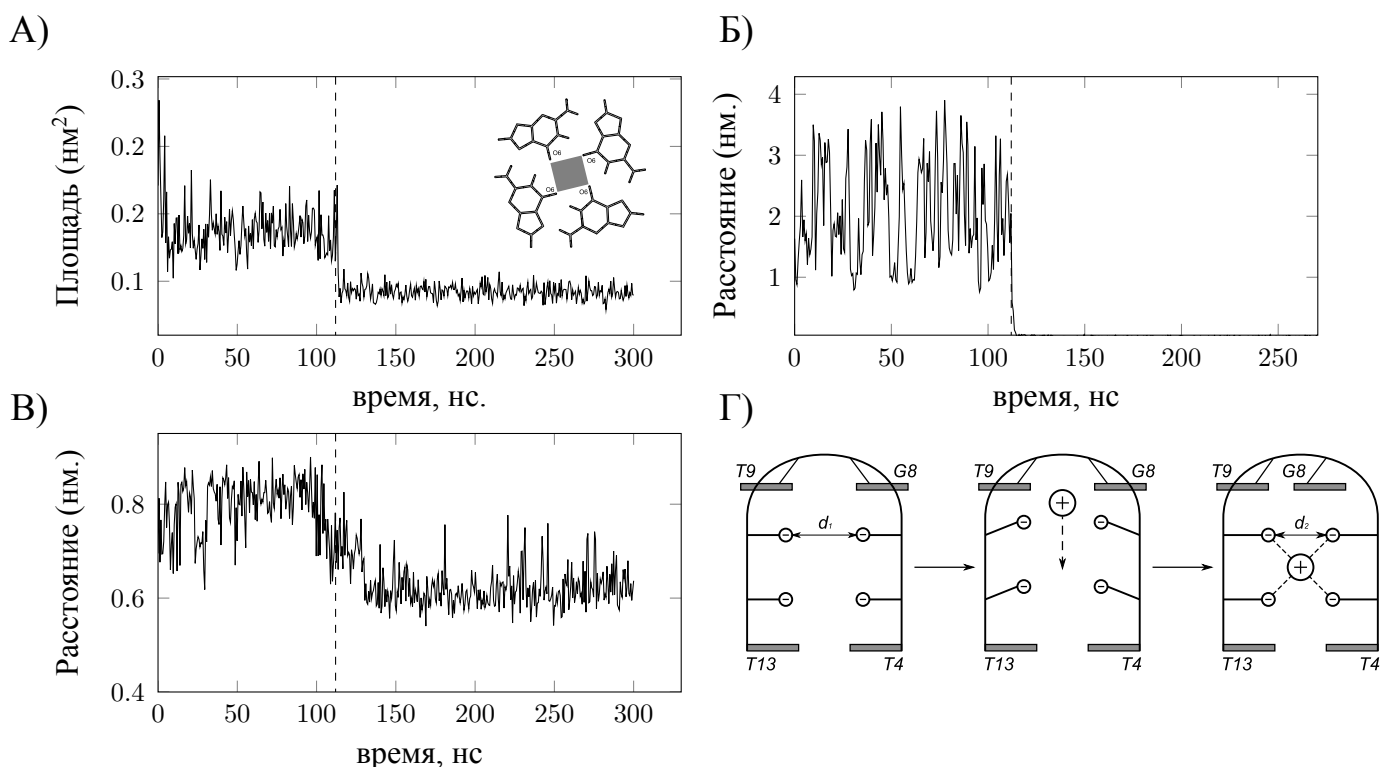


Рис. 12: Динамика структуры аптамера 15-ТВА при миграции катиона натрия в центральную полость квадруплекса через верхний квартет. (А) Площадь фигуры, образуемой атомами Об верхнего квартета, приведена в верхней правой части графика. Серым отмечена фигура, для которой вычисляли площадь. (Б) Расстояние между катионом натрия и центром масс восьми атомов Об, принадлежащих квадруплексному стеблю, т.е., центральному сайту связывания. (В) Расстояние между центром масс азотистого основания остатка G8 и центром масс атомов Об верхнего квартета квадруплекса. Подобный график для T9 не показан. Вертикальная прерывистая линия отмечает момент попадания катиона в центральный сайт связывания.

ся в сторону остатка T9, и TGT-петля закрывает верхний выход из квадруплекса (рис. 12Г).

Очевидно, что петли не являются принципиально важными элементами для связывания катиона с гуаниновым квадруплексом. Однако они существенно влияют на весь процесс. Моделирование показывает, что TGT-петля играет три независимые роли. Во-первых, она защищает структуру 15-ТВА от разрушения квадруплекса в отсутствие катиона. Из наших наблюдений следует, что существует 40% вероятность того, что структура квадруплекса будет потеряна в ожидании захвата катиона, если удалить TGT-петлю. В то же время, TGT-петля замедляет первоначальное связывание катиона, заслоняя вход в центральный сайт квадруплекса. Мы наблюдали, как конструкция без этой петли захватывает

катион быстрее, но сама такая конструкция менее стабильна. Как только катион оказывается внутри квадруплекса, петля помогает сохранить его во внутренней полости, благодаря смещению основания G8. По вышеописанным результатам, можно заключить, что TGT-петля оказывает стабилизирующую роль в структуре 15-TVA.

Корреляция движений катионов во время полного обмена ионами между G-ДНК и раствором С помощью моделирования мы впервые обнаружили случайный обмен катиона, связанного с квадруплексом G-ДНК, с катионом из раствора (рис. 13). Это наблюдали в одной из тех систем, где у аптамера 15-TVA были удалены обе TT-петли с образованием разрывов в цепи. Выталкивание катиона в такой системе происходит через нижнюю часть молекулы. Процесс миграции катиона начинается с приближения другого катиона с противоположной выходу стороны, т.е. со стороны TGT-петли (верхний связывающий сайт). Катион из раствора (промежуточно связанный в верхнем сайте) занимает центральный сайт связывания, как только его покидает предыдущий катион (рис. 13). Благодаря этой связи между промежуточным связыванием и высвобождением катиона из центральной полости квадруплекса, центральный сайт не остаётся пустым. Следовательно, весьма вероятно, для большинства G-ДНК катионный обмен происходит без потери стабильной структуры, по крайней мере, это справедливо для двуквартетных квадруплексов. Баланс между связыванием катиона из раствора и выталкиванием катиона из центральной полости могут сильно стабилизировать как малые квадруплексы, так и промежуточные состояния, образующиеся при самосборке G-ДНК. В общем виде возможность участия катиона из раствора в обмене, молекула с N последовательными квартетами может выпустить любой катион в центральной полости квадруплекса через промежуточные состояния с N-1 связанными катионами (рис. 14).

Однако подобный эффект, вероятно, менее значим для протяжённых квадруплексов, состоящих, например, из четырёх квартетов. Такой квадруплекс чрезвычайно стабилен при связывании всего двух катионов во внутренней полости. Он легко может обменивать катион через последовательность переходных состояний, имея два катиона внутри полости, и разделяя таким образом события связывания катиона из раствора и выход катиона в раствор.

Предварительные молекулярно-динамические/квантово-механические эксперименты (МД/КМ) Предварительное распознавание

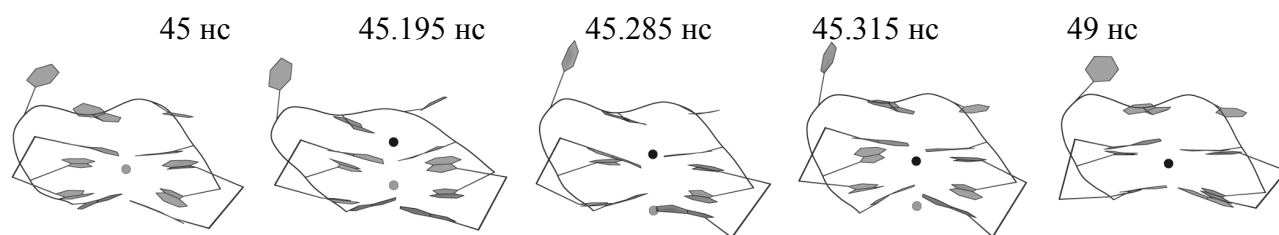


Рис. 13: Обмен катионами натрия между модифицированным аптамером 15-ТВА (без ТТ-петель) и раствором. На рисунке представлены конфигурации системы в ходе моделирования. Исходно связанный катион отмечен серой сферой, а вновь приходящий катион – чёрной сферой.

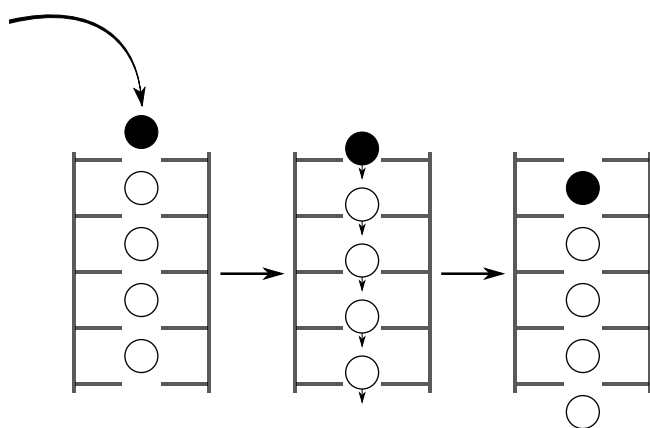


Рис. 14: Схема обмена катионами в молекуле, построенной из N последовательных квартетов. Приходящий катион отмечен чёрным, а катионы, связанные с квадруплексом, – белым.

катионов верхним и нижним связывающими сайтами может быть описано в терминах электростатического взаимодействия. Однако взаимодействия катиона с ДНК более сложны и только приблизительно описываются классическими силовыми полями, используемыми в моделировании МД. Таким образом, координационная составляющая взаимодействия катиона с аптамером не рассматривается. К сожалению, полное квантово-механическое (КМ) описание такой небольшой молекулы, как 15-ТВА, всё ещё находится за пределами современных вычислительных возможностей. Так, для расчёта одного шага (0.5 фс) требуется примерно 2-3 минуты вычислений на суперкомпьютере, а для достижения 1 мкс надо сделать $2 * 10^9$ шагов. Гибридные ММ/КМ моделирования стали распространёнными подходами в исследовании взаимодействий биополимеров с катионами, так как был предложен разумный компромисс между скоростью и точностью расчётов. Даже такие подходы весьма требовательны к вычислительной мощности, и современные работы оперируют временами наблюдения в пикосекундной шкале. Этого, к сожалению, недостаточно для достижения равновесия системы. Однако несколько

пикосекунд наблюдения все же даёт грубое представление о происходящих процессах в системе.

Используя метод МД/КМ, мы исследовали стабильность положения катиона калия во всех трёх сайтах связывания. Эти расчёты подтвердили результаты классического моделирования и указали на низкую вероятность стехиометрии 1:2 комплекса аптамера 15-ТВА с катионами калия. Один из катионов в комплексе со стехиометрией 1:2 сместился в сторону раствора, но не покинул зону аптамера. Тем не менее, мы считаем, что стехиометрия комплекса – 1:1, и катион калия расположен в центре квадруплекса между квартетами. В центральном положении катион в среднем координируется атомами кислорода O_6 из оснований гуанина, благодаря электростатическим и донорно-акцепторным взаимодействиям. Для контрольного эксперимента мы выбрали катион бария. Катион бария имеет близкий к стронцию размер и заряд, что приводит к практически идентичным спектрам кругового дихроизма комплексов аптамера 15-ТВА с катионами бария и стронция. Стехиометрия комплекса между стронцием и аптамером 1:1, и весьма вероятно, что катион находится во внутренней полости между квартетами. Расчёты были проведены с катионом бария исключительно из практических аспектов работы со стронцием, так как стронций склонен к накоплению в тканях, а барий не имеет такой особенности. В экспериментах по калориметрии мы использовали барий, и поэтому в расчётах был использован тоже барий.

В МД/КМ расчётах мы показали, что, находясь в центральном сайте связывания, положение катиона бария очень стабильно. Катион координирует все восемь атомов кислорода O_6 из гуаниновых оснований остатков квадруплекса.

Учёт электронной структуры комплекса в методе КМ/МД приводит к результатам, которые хорошо согласуются с данными классического моделирования, о том что самое стабильное положение катиона калия – это центр квадруплекса.

Калориметрические измерения образования комплексов 15-ТВА с катионами металлов

Эксперименты по титрованию комплекса методом изотермической калориметрии указывают на то, что стехиометрия комплекса аптамера 15-ТВА как с катионом бария, так и калия близка к соотношению 1:1. Более того, исследование конкуренции показало, что катионы занимают один и тот же связывающий

сайт. Эти результаты полностью коррелируют с выводами, полученными расчётными методами.

Альтернативные пути связывания катиона участвуют в динамике и образовании структуры квадруплексных ДНК

Кроме механистического представления о путях попадания катиона во внутреннюю полость квадруплекса, наши результаты помогают ответить на вопрос о том, что наиболее вероятно: образование структуры квадруплекса и захват катиона из раствора или сборка структуры вокруг катиона. Правильно собранная структура аптамера 15-ТВА без катиона способна сохранять свою структуру в течение сотен наносекунд, что, очевидно, достаточно для того, чтобы встретить в растворе катион и захватить его в растворе с ионной силой порядка $\approx 0.1-0.2$ М. Экспериментально было показано, что 15-ТВА может организовать мономолекулярный G-квадруплекс в растворе при низких температурах без стабилизации катионом. Вероятно, при комнатной температуре существует динамическое равновесие между собранной и расплавленной структурами, а появление катионов подходящего радиуса смещает равновесие в сторону собранной структуры. Таким образом, катион не является инициатором сборки, а стабилизирует собранную и частично собранную структуру. Процесс образования такой структуры находится за пределами доступного времени наблюдения за системой. Мы полагаем, что сам процесс сборки происходит разнообразными и, вероятно, независимыми путями. Это заключение согласуется с более ранними исследованиями по моделированию вероятных промежуточных состояний при формировании параллельного квадруплекса из четырёх тяжёлых $d(G_4)_4$. Разные микросостояния (и вероятности их существования) могут по-разному реагировать на изменение как последовательности петель, так и на изменение внешних условий.

Мы наблюдали разнообразные пути проникновения катиона внутрь квадруплекса. События, которые мы наблюдали, могут играть важную роль в процессах структурной самосборки, обмена катионами и взаимодействия с другими молекулами. Проведённые расчёты показывают, что даже такой простой процесс, как захват катиона, это достаточно сложный и вариативный процесс. Выбор между разными путями может строго зависеть от типа катиона.

В целом, все процессы, связанные с самосборкой квадруплексных ДНК, сложны и обладают вариативной природой, индивидуальной для каждого оли-

гонуклеотида. Практически невозможно получить такую информацию на основе экспериментальных данных, так как это потребовало бы эффективной детекции сигнала в микросекундном диапазоне с ангстремным разрешением для ДНК и катионов. Итак, несмотря на очевидные ограничения, длительные моделирования МД в будущем смогут обеспечить важное понимание картины переходов как между микросостояниями, так и между макросостояниями, которые можно обнаружить экспериментально в процессе организации и перестроения структуры квадруплексных ДНК.

Ключевые факторы, влияющие на конформационную динамику 15-ТВА, и возможности их использования

Потенциально ДНК/РНК-аптамеры могут рассматриваться как перспективный класс терапевтических препаратов, обладающих высокой специфичностью и низкой токсичностью; а возможности использования комплементарного антидота делают их уникальными. Принципиальное отличие аптамеров от олигонуклеотидов, активность которых определяется просто гибридизацией, - это формирование функциональной и стабильной третичной структуры. Именно стабильность структуры, вероятнее всего, является фактором, меняя который, мы можем изменять эффективность действия аптамера к мишени. Ранее методами калориметрии (ДСК) и кругового дихроизма (КД) было показано, что температура плавления 15-ТВА близка к температуре человеческого тела.

Для повышения эффективности действия аптамера необходимо увеличить его структурную стабильность. Результаты изучения структурно-динамических свойств аптамера 15-ТВА явно указывает на два возможных пути повышения его структурной стабильности. Первый путь подразумевает повышение стабильности квадруплекса путём формирования стабильного комплекса аптамера с катионом. С другой стороны, тромбин взаимодействует с ТТ-петлями, и как мы видели ранее, подвижность ТТ-петель связана с динамикой самого квадруплекса. Взаимодействие катиона в центре квадруплекса будет опосредованно влиять на функцию. Первый путь (стабилизация структуры аптамера катионом) легко оценить с помощью тромбин-ингибирующей активности в присутствии катиона бария.

Согласно полученным данным, константа связывания аптамера с катионом бария в 10 раз выше, чем для катиона калия, а энтальпия комплексообразования для обоих катионов сравнима. При этом катион бария значительно повышает наблюдаемую температуру плавления квадруплекса.

Энергия сольватации катиона бария составляет -1305 кДж/моль, а для катиона калия -302 кДж/моль. Действительно, в вычислительных экспериментах катион бария оставался практически неподвижен в комплексе с аптамером, по сравнению с катионом калия. Экспериментальная проверка совместно с Завьяловой Е.В. показала обратный эффект: использование катиона бария при определении ингибирующей активности приводит к падению эффективности действия аптамера.

Более того, в своей диссертационной работе Завьялова Е.В. показала, что ингибирующая активность аптамера 15-ТВА обратно пропорциональна степени стабилизации структуры катионами. Можно составить ряд катионов по стабилизирующему влиянию на квадруплекс, как: $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Ba}^{2+}$, то влияние этих катионов на ингибирующую активность имеет обратную зависимость: $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Ba}^{2+}$. Отсюда следует, что в ходе взаимодействия с тромбином квадруплекс или ГТ-петли не должны терять свою подвижность. Для изучения атомистических причин этого явления было использовано моделирование диссоциации комплекса 15-ТВА с тромбином методом зонтичного интегрирования (Umbrella sampling). Выдвинуто предположение, что диссоциация комплекса тромбин–15ТВА – это процесс линейного смещения центров масс тромбина и аптамера, тогда координатой реакции будет выступать расстояние между соответствующими центрами масс. В этом моделировании интересно изменение структуры аптамера в ходе реакции диссоциации с белком. При сканировании координат реакции с шагом 0.5 \AA квадруплексная часть аптамера претерпевает значительные изменения. В районе значения $\approx 35 \text{ \AA}$ расстояния между центрами масс аптамера и тромбина наблюдается падение количества водородных связей как между тромбином и аптамером, так и между гауниновыми основаниями квадруплекса (рис. 15).

Вероятно, при формировании комплекса структура квадруплекса теряет часть водородных связей при формировании конформации, которая способна связаться с тромбином. Высокая энергия координации катиона внутри квадруплекса существенно уменьшает вероятность образования такого переходного

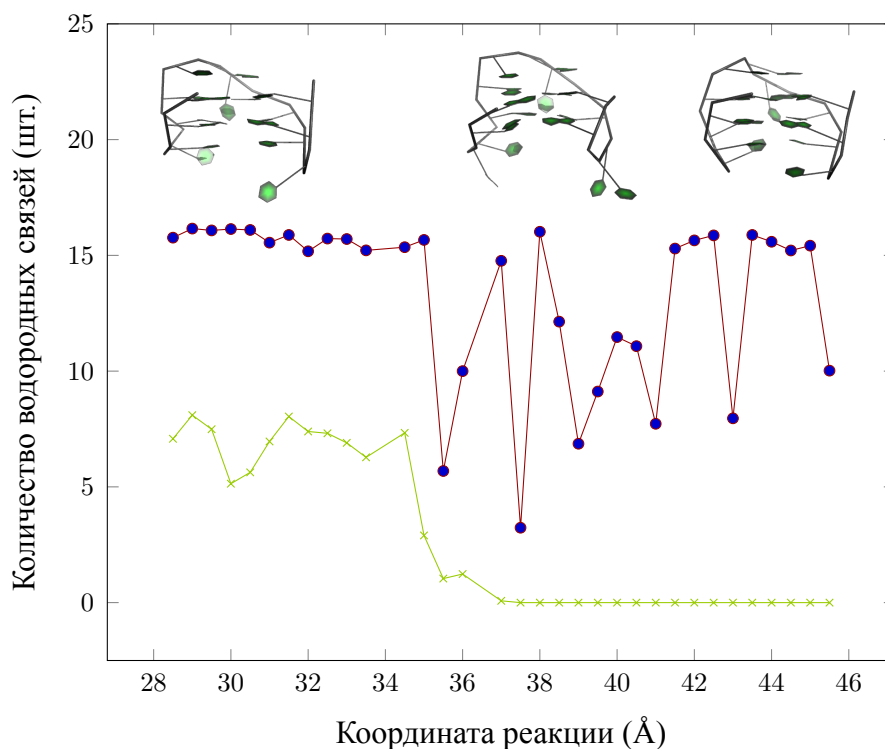


Рис. 15: Изменение количества водородных связей в ходе моделирования диссоциации комплекса 15ТВА-тромбин. Над графиками указаны структуры аптамера, соответствующие участкам траектории. Синими символами отмечены водородные связи в квадруплексе, зелёными символами отмечены водородные связи в комплексе 15ТВА-тромбин

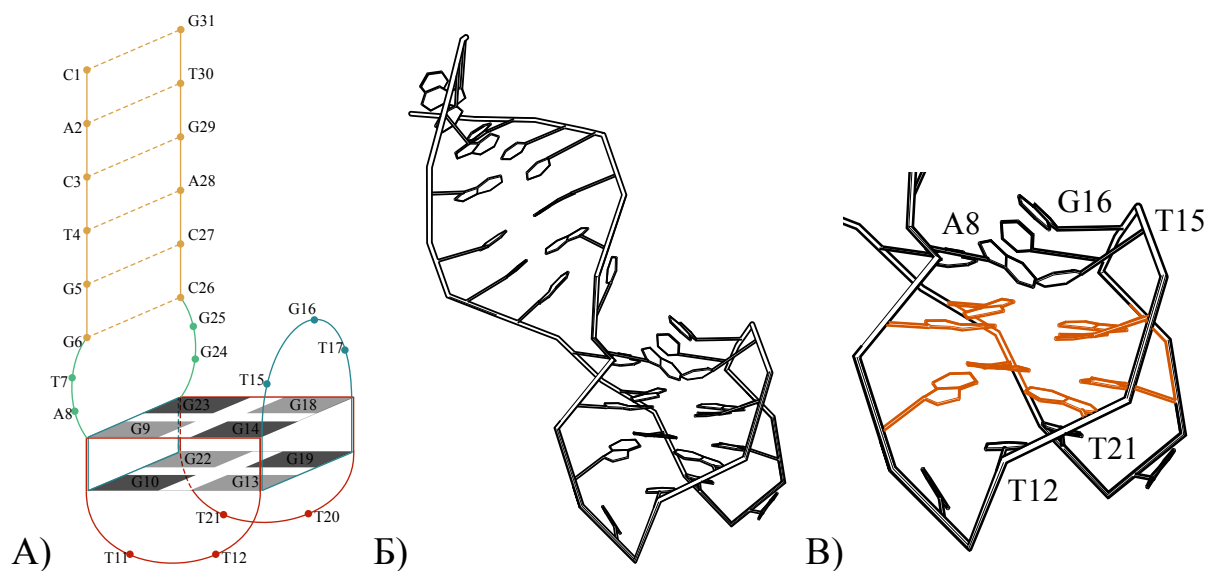


Рис. 16: Структура аптамера 31-TGT. А) Вторичная структура 31-TGT. Красным отмечена квадруплексная часть, оранжевым отмечена дуплексная часть. Б) Модель третичной структуры 31-TGT по данным ЯМР. В) Модель структуры квадруплексной части 31-TGT, оранжевым цветом отмечены G-квартеты

го состояния. Стабилизация квадруплексной структуры не приводит к повышению ингибирующей активности аптамера. Необходимо сохранять конформационную подвижность аптамера, близкую к подвижности 15-ТВА, но при этом уменьшить представленность конформаций, близких к полностью денатурированому состоянию.

Известно, что добавление дуплексного участка к концам 15-ТВА приводит к повышению ингибирующего действия такой конструкции на активность тромбина, и препятствующего образованию сгустка в плазме крови. Для установления структуры такого гибридного аптамера (31-TGT) мы провели экспериментальное исследование методами ЯМР. На основе соотнесения пиков в двумерных NOESY, DQF-COSY и HSQC спектров были найдены порядка 250 дистанционных ограничений между атомами 31-TGT. С использованием этих ограничений была построена модель структуры (рис. 16).

Аптамер 31-TGT содержит квадруплексный фрагмент с идентичной 15-ТВА конформацией ТТ-петель. Однако конформация TGT-петли претерпела существенные изменения (рис. 16), G16 (соответствует G8 из 15-ТВА) из TGT-петли образует стэкинг-взаимодействия не с квартетом, а с остатком A8 из дополнительной части. Надо отметить, что в 31-TGT наблюдается образование дуплексного участка, но этот участок не образует взаимодействий с квадруплексом. Таким образом, в аптамере 31-TGT реализовано отсутствие стабилизирующего эффекта дуплексной части на квадруплекс. К сожалению, аптамер 31-TGT способен связываться с протромбином, что снижает возможность его использования в терапии тромбозов, так как концентрация протромбина в крови сильно превышает концентрацию тромбина, что приведёт к высоким терапевтическим дозам.

Каким образом можно добиться стабилизации структуры 15-ТВА и положительного функционального эффекта (например, при добавлении структурного модуля), но при этом минимизировать дополнительные взаимодействия с белками крови? При разработке новой конструкции надо учитывать найденную корреляцию активности 15-ТВА с подвижностью его ТТ-петель. Ещё одно интересное наблюдение – при захвате катиона из раствора может происходить частичная потеря структуры квадруплекса. При этом наблюдается разница в подвижности концевых гуанинов 15-ТВА. 5'-конец подвержен заметным структурным перестройкам, а 3' концевой нуклеотид не проявляет значимой подвиж-

ности. И, действительно, введение модификаций на 5'-конце сильнее влияет на функциональную активность и изменяет динамику структуры всей молекулы.

Было предложено сделать двухквадруплексный вариант аптамера, т.е. две последовательности 15-ТВА, соединённые коротким нуклеотидным мостиком. Предполагаемая структура такой молекулы (в дальнейшем RA-36) будет иметь один квадруплекс на 5'-конце, подвижность которого не меняется, по сравнению с 15-ТВА, а другой квадруплекс на 3'-конце конструкции. Второй будет более подвижен, так как имеет на 5'-конце первый квадруплекс.

В настоящее время в совместных работах есть данные кругового дихроизма о наличии квадруплексной структуры в растворе RA-36. Совместные работы по тромбин-ингибирующей активности RA-36 подтверждают эффективность предложенной конструкции. RA-36 проявил свойства терапевтического олигонуклеотида и в настоящее время мы проводим стадию формальных доклинических испытаний.

Таким образом, моделирование позволяет понять структурные особенности НК, и, на основе полученных данных, становятся возможным проводить рациональный дизайн новых биологически активных НК.

Разработка аптасенсора к тромбину

Понимание структурной динамики аптамера к тромбину 15-ТВА может быть использовано для создания сенсоров для определения концентрации тромбина. Надо признать, что на текущий момент в клинике практически не представлены методы прямого определения тромбина в крови, хотя эта информация может быть очень ценной для понимания статуса гомеостаза пациента.

В качестве основы сенсора нами был выбран элетропроводник на основе углеродных нанотрубок. Ранее было показано, что одноцепочечная ДНК способна сорбироваться на поверхности углеродных нанотрубок, образуя сеть стэкинг-взаимодействий. ДНК обладает высокой плотностью отрицательного заряда и, вероятно, это будет влиять на проводящие свойства углеродной нанотрубки. Предполагается, что аптамер при взаимодействии с нанотрубкой будет частично денатурировать и сорбироваться на поверхности, но при добавлении тромбина равновесие будет смещаться в сторону собранной структуры. Эти переходы должны сопровождаться значимым изменением электростатического окружения нанотрубки и её проводимостью.

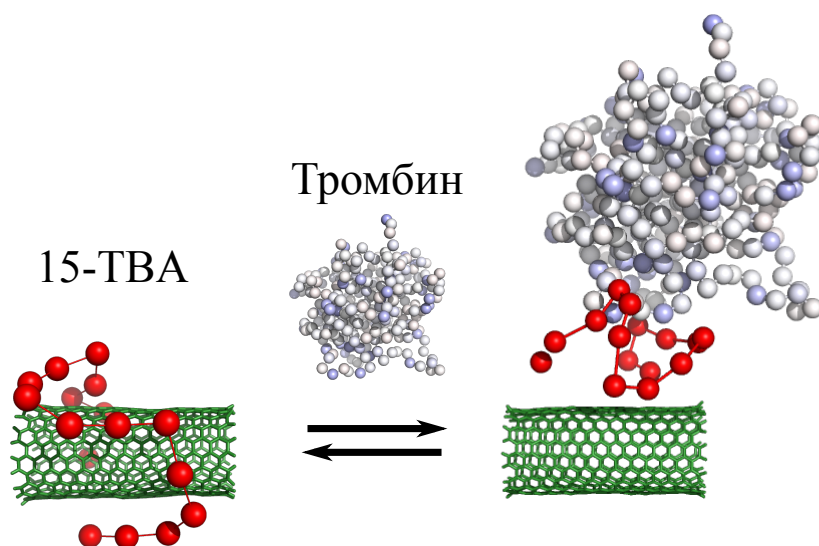


Рис. 17: Изображение механизма работы аптасенсора на основе 5'-модифицированного аптамера к тромбину. Красные сферы - это отрицательно заряженные фосфатные группы. Зелёным отмечена углеродная нанотрубка. Белым и голубым отмечен тромбин.

Нами было изучено изменение структуры аптамера 15-ТВА при различных способах конъюгации с углеродной нанотрубкой в различных условиях. G-квадруплексная конформация может как сохраняться, так и разрушаться, и это зависит от способа модификации аптамера. Так, введение модификации на 5'-конец аптамера приводит к потере структуры квадруплекса при конъюгации с нанотрубкой. Такая же модификация на 3'-конце аптамера не приводит к столь значимым изменениям. Более того, нами в сотрудничестве с Национальным исследовательским университетом «МИЭТ» была проведена успешная сборка тромбинового аптасенсора. Использование карбоксил-функционализированных нанотрубок позволило создать серию сенсоров с идентичными характеристиками. Сенсоры показали достаточную чувствительность и специфичность к тромбину. При сравнении сенсоров с разными модификациями (на 5'- и 3'- концах) было показано, что только модификация на 5'-конце способна регистрировать тромбин. На основании как экспериментальных, так и вычислительных данных, можно предложить механизм работы подобных сенсоров. Проводимость нанотрубки зависит от того, образует ли 15-ТВА многочисленные стэкинг-взаимодействия с поверхностью нанотрубки. В отсутствие тромбина аптамер 15-ТВА не имеет выраженной структуры и распластан на поверхности нанотрубки, но при возможности образо-

вать комплекс с тромбином конформационное равновесие смещается в сторону компактной структуры, которая практически не имеет контактов с нанотрубкой. Именно столь значимое конформационное изменение, вероятнее всего, и приводит к изменению проводимости трубки, предполагаемый механизм представлен на рисунке 17.

Выводы

1. Крупнозернистое моделирование длинных молекул РНК применимо для супрамакромолекулярных комплексов при наличии структурных ограничений, не связанных с собственной структурой РНК. Расположение тмРНК длиной 363 нуклеотида определяется позиционированием псевдоузла рК1 и белка SmpB.
2. Локальное представление функциональных районов супрамакромолекулярных комплексов позволяет достоверно моделировать полноатомные модели. Эффективность взаимодействия тилозина и его производных с 23S рРНК в рибосоме определяется сетью водородных связей.
3. Моделирование без ограничений для коротких молекул ДНК позволяет определить конформационное пространство всех топологических элементов структуры. Из трёх внутренних петель минимального 15-членного G-квадруплекса (15-ТВА) только одна тринуклеотидная петля стабилизирует структуру.
4. Точное моделирование с учётом электронной плотности указывает на сложное поведение катионов металлов при взаимодействии с ДНК. Эффективное хелатирование катионов в центре минимального G-квадруплекса (15-ТВА) определяется уменьшением вероятности диссоциации комплекса за счёт динамики латеральных петель.
5. Раскрытие основ формирования структуры и динамики G-квадруплексных ДНК позволяет целенаправленно оптимизировать их узнающие свойства. Изученный в работе структурно-функциональный профиль аптамера 15-ТВА использован для разработки антитромботического препарата и наноаптасенсоров.

Публикации автора по теме диссертации

1. *Shishkina A., Makarov G., Tereshchenkov A., Korshunova G., Sumbatyan N., Golovin A., Svetlov M., Bogdanov A.* Conjugates of Amino Acids and Peptides with 5-O-Mycaminosyltylonolide and Their Interaction with the Ribosomal Exit Tunnel // *Bioconjugate Chemistry*. — 2013. — Vol. 24, no. 11. — Pp. 1861–1869.
2. *Zavyalova E., Golovin A., Pavlova G., Kopylov A.* Module-Activity Relationship of G-quadruplex Based DNA Aptamers for Human Thrombin // *Current Medicinal Chemistry*. — 2013. — Vol. 20, no. 38. — Pp. 4836–4843.
3. *Ахмадишина К., Бобринецкий И., Комаров И., Маловичко А., Неволин В., Ретухов В., Головин А., Залевский А.* Гибкие биологические сенсоры на основе пленок углеродных нанотрубок // *Российские Нанотехнологии*. — 2013. — Т. 8, № 11–12. — С. 721–726.
4. *Савчик Е., Калинина Т., Дрозд Н., Макаров В., Завьялова Е., Лапшева Е., Мудрик Н., Бабий А., Павлова Г., Головин А., Копылов А.* Ингибирование аптамером RA36 свертывания плазмы человека, кроликов, крыс, активированного тромбином или коагулазами из змеиных ядов // *Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины*. — 2013. — Т. 156, № 7. — С. 54–58.
5. *Zavyalova E., Golovin A., Timoshenko T., Babiy A., Pavlova G., Kopylov A.* DNA Aptamers for Human Thrombin with High Anticoagulant Activity Demonstrate Target-and Species-Specificity // *Current Medicinal Chemistry*. — 2012. — Vol. 19, no. 30. — Pp. 5232–5237.
6. *Reshetnikov R. V., Sponer J., Rassokhina O. I., Kopylov A. M., Tsvetkov P. O., Makarov A. A., Golovin A. V.* Cation binding to 15-TBA quadruplex DNA is a multiple-pathway cation-dependent process // *Nucleic Acids Research*. — 2011. — Vol. 39, no. 22. — Pp. 9789–9802.
7. Anti-Thrombosis Aptamers and Method for Stabilizing the Structure Thereof : Patent WO2011075004 A1 / A. Golovin, A. Kopylov, R. Reshetnikov, E. Zavyalova, G. Pavlova, [et al.]. — 12/2010, PCT/RU2010/000.

8. *Reshetnikov R., Golovin A., Spiridonova V., Kopylov A., Sponer J.* Structural Dynamics of Thrombin-Binding DNA Aptamer d (GGTTGGTGTGGTTGG) Quadruplex DNA Studied by Large-Scale Explicit Solvent Simulations // *Journal of Chemical Theory and Computation*. — 2010. — Vol. 6, no. 10. — Pp. 3003–3014.
9. *Shpanchenko O. V., Golovin A. V., Bugaeva E. Y., Isaksson L. A., Dontsova O. A.* Structural Aspects of trans-Translation // *IUBMB Life*. — 2010. — Vol. 62, no. 2. — Pp. 120–124.
10. *Решетников Р., Головин А., Копылов А.* Сравнение моделей 15-звенного ДНК-аптамера к тромбину с помощью симуляции молекулярной динамики // *Биохимия (Москва)*. — 2010. — Т. 75, № 8. — С. 1017—1024.
11. *Решетников Р., Копылов А., Головин А.* Классификация G-квадруплексных ДНК по углу вращения квадруплекса и планарности G-квартетов // *Acta Naturae*. — 2010. — Т. 2, № 4. — С. 72.
12. *Шпанченко О., Бугаева Е., Головин А., Донцова О.* Транс-трансляция: факты и гипотезы // *Молекулярная Биология*. — 2010. — Т. 44, № 4. — С. 495—502.
13. *Bugaeva E. Y., Surkov S., Golovin A. V., Ofverstedt L.-G., Skoglund U., Isaksson L. A., Bogdanov A. A., Shpanchenko O. V., Dontsova O. A.* Structural Features of the tmRNA–Ribosome Interaction // *RNA*. — 2009. — Vol. 15, no. 12. — Pp. 2312–2320.
14. ДНК-аптамеры, ингибирующие тромбин, и способ стабилизации их структуры : Пат. 2429293 Рос. Федерация / А. Головин, Р. Решетников, Е. Завьялова, А. М. Копылов, Г. Павлова, В. Бабий. — Заявл. 12.2009, №2009146170 (РФ).
15. Модифицированные ДНК аптамеры, ингибирующие активность тромбина : Пат. 2410432 Рос. Федерация / В. Спиридонова, А. Головин, А. Копылов, А. Добровольский, А. Мазуров. — Заявл. 11.2009, №20089142862 (РФ).
16. Аптамерный олигонуклеотид - прямой ингибитор тромбина : Пат. 2401306 Рос. Федерация / В. Спиридонова, А. Головин, А. Копылов, А. Добровольский, А. Мазуров. — Заявл. 12.2008, №2008149583 (РФ).

Тезисы докладов автора по теме диссертации

1. *Golovin A., Zaharov M., Kopylov A., Reshetnikov R.* Molecular dynamics simulations: quadruplex's loop topology reflects structural stability // 38th Congress of the Federation of European Biochemical Societies. — Санкт-Петербург, РФ, 2013.
2. *Kopylov A., Zavyalova E., Golovin A., Reshetnikov R., Lapsheva E., Turchaninov T., Yuminova A., Pavlova G.* Apta-minilego for thrombin inhibitors: new insights into nano-module construction // 5th International Conference on Drug Discovery & Therapy. — Dubai, UAE, 2013.
3. *Makarov G., Golovin A., Bogdanov A., Shishkina A., Korshunova G., Sumbatyan N.* Molecular dynamics study tylosin and its derivatives binding to E. coli ribosome // 38th Congress of the Federation of European Biochemical Societies. — Санкт-Петербург, РФ, 2013.
4. *Zalevsky A., Golovin A., Reshetnikov R.* Thrombin forms: bioinformatic analysis of structural data // 38th Congress of the Federation of European Biochemical Societies. — Санкт-Петербург, РФ, 2013.
5. *Kopylov A., Golovin A., Reshetnikov R., Lapsheva E., Turchaninov T., Yuminova A., Zavyalova E.* Modular construction of aptameric nanostructures: anti-thrombin aptamers // 4th International Conference on Drug Discovery and Therapy. — Dubai, UAE, 2012.
6. *Tereshchenkov AG and Golovin A., Shishkina A., Sumbatyan N., Bogdanov A.* Design and synthesis of the 3'-peptidyl-tRNA analogues – new tools for investigation of the ribosome function // 32nd European Peptide Symposium. — Athens, Greece, 2012.
7. *Zavyalova E., Golovin A., Pavlova G., Kopylov A.* RA-36, novel thrombin binding DNA aptamer exhibits high inhibitory potential and specificity for blood coagulation // 17th Congress of the European Hematology Association. — Amsterdam, Netherlands, 2012.
8. *Golovin A., Kopylov A., Mudrik N.* Rational improvement aptamers to gain therapeutics value. Problems and Solutions // BIT's 9th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology. — Shenzhen, China, 2011.
9. *Kopylov A., Khairulina G., Yuminova A., Reshetnikov R., Zavyalova E., Golovin A.* Nucleic acids – protein recognition: what we have learned from aptamers // The 3rd EMBO Meeting. — Vienna, Austria, 2011.
10. *Reshetnikov R., Sponer J., Rassokhina O., Tsvetkov P., Makarov A., Golovin A.* Multiple-pathway cation binding to 15-TBA quadruplex DNA // The third international meeting on G-quadruplex and G-assembly. — Sorrento, Italy, 2011.
11. *Zavyalova E., Reshetnikov R., Golovin A., Mudrik N., Panteleev D., Pavlova G., Kopylov A.* Novel thrombin binding DNA aptamer exhibits high inhibitory potential for blood coagulation // XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 57th Annual SSC meeting. — Kyoto, Japan, 2011.

12. *Завьялова Е., Решетников Р., Головин А., Копылов А.* Механизм ингибирования протеолиза фибриногена тромбином аптамерными ДНК // XVIII Российский национальный конгресс “Человек и лекарство”. — Москва, РФ, 2011.
13. *Завьялова Е., Решетников Р., Головин А., Пантелеев Д., Павлова Г., Копылов А.* Модульный ДНК-аптамер к тромбину человека обладает высокой антикоагуляционной активностью // Всероссийская конференция “Клиническая гемостазиология и реология в сердечно-сосудистой хирургии”. — Москва, РФ, 2011.
14. *Копылов А., Головин А., Решетников Р., Турчанинов Т., Юминова А., Завьялова Е., Мудрик Н., Пантелеев Д., Павлова Г.* Антикоагуляционная активность тромбин-связывающих аптамерных ДНК // Международная научно-практическая конференция “Фармацевтические и Медицинские Биотехнологии”. — Москва, РФ, 2011.
15. *Сумбатян Н., Терещенков А., Головин А., Шишкина А., Коршунова Г., Богданов А.* Компьютерное моделирование и синтез аналога пептидил-т-РНК – представителя нового класса ингибиторов биосинтеза белка // V Российский Симпозиум “Белки и пептиды”. — г. Петрозаводск, РФ, 2011.
16. *Kopylov A., Golovin A., Reshetnikov R., Turchaninov T., Yuminova A., Zavyalova E., Spiridonova V., Arutyunyan A.* Studying of structure and function of modular thrombin binding aptamers // BIT's 8th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology. — Beijing, China, 2010.
17. *Shishkina A., Bogdanov A., Karpenko V., Golovin A., Korshunova G., Sumbatyan N.* An experimental system for studying interactions of nascent polypeptides with ribosomal tunnel // EMBO Conference Series – Chemical Biology. — Heidelberg, Germany, 2010.
18. *Dontsova O., Shpanchenko O., Bogdanov A., Bugaeva E., Golovin A., Isaksson L.* Structural rearrangements in transfer-messenger RNA in the process of trans-translation - protein synthesis quality control system in bacteria // 34th Congress of the Federation of European Biochemical Societies. — Prague, Czech Republic, 2009.
19. *Kopylov A., Golovin A., Reshetnikov R., Turchaninov T., Yuminova A., Spiridonova V., Arutyunyan A.* Structural studying of conformational interplay within two-module thrombin binding DNA aptamers // 34th Congress of the Federation of European Biochemical Societies. — Prague, Czech Republic, 2009.