

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Бизяева Анастасия Александровна

**Аптамерные неканонические ДНК
к гемагглютнину вируса гриппа А**

Специальность 1.4.9 – Биоорганическая химия (химические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова».

Научные руководители: **Копылов Алексей Михайлович,**
доктор химических наук, профессор

Завьялова Елена Геннадиевна,
кандидат химических наук

Официальные оппоненты: **Тимофеев Эдуард Николаевич,**
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений, ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН)

Коршун Владимир Аркадьевич,
доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярного дизайна и синтеза, ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН)

Гасанова Татьяна Владимировна,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «24» мая 2022 г. в 16 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40, НИИФХБ, ауд. 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/447497639/>.

Автореферат разослан «__» ____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ю.Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Респираторные вирусные инфекции являются одной из важнейших угроз здоровью человека из-за отсутствия ранней детекции и специфических противовирусных препаратов с доказанной эффективностью. Особое место в ряду острых респираторных вирусных инфекций занимает вирус гриппа А, который регулярно вызывает сезонные эпидемии и пандемии. Заболевания гриппом сопровождаются серьёзными осложнениями, при этом варианты вируса уходят от специфического иммунного ответа ввиду высокой вариабельности первичной структуры белков. Первый этап заражения клетки вирусом гриппа – прикрепление к сиаловым кислотам на поверхности клетки – выполняет белок гемагглютинин (ГА), который составляет треть всех белков в составе вирусной частицы. Именно поэтому ГА вируса гриппа является популярной мишенью для поиска противовирусных агентов, например антител или аптамеров.

Аптамер – это олигонуклеотид, обладающий способностью специфически связываться с мишенью за счет своей уникальной третичной структуры. Типичными мишенями для аптамеров являются белки, такие аптамеры впоследствии могут служить как узнающие элементы диагностических аптасенсоров и биомедицинские препараты. Стандартная процедура получения аптамера – селекция из рандомизированной библиотеки олигонуклеотидов, или SELEX (от англ. Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment – систематическая эволюция лиганда путём экспоненциального обогащения). Крайне редко аптамер, полученный при таком первичном отборе, имеет оптимальные характеристики: высокую специфичность к мишени, высокую аффинность, наличие единственной конформации, небольшую длину, устойчивость при физиологических условиях. Изучение свойств аптамера обычно сводится к попыткам минимизации его длины и изучению аффинности и функции.

Необходимым этапом исследования аптамера является поиск функциональной детерминанты, то есть участка структуры, ответственного за узнавание мишени. Лишь единичные работы посвящены установлению ключевых взаимоотношений «структура – аффинность» для известных аптамеров. Так, для тромбин-связывающего аптамера ТВА характерна структура G-квадруплекса (GQ) антипараллельной топологии с двумя узнающими латеральными петлями, в данном случае GQ является только каркасом. Гипотезу о функциональной роли петель аптамера в узнавании белковой мишени предлагается проверить на примере ДНК-аптамеров к ГА.

Степень разработанности проблемы

На настоящий момент известно несколько ДНК- и РНК-аптамеров к ГА вируса гриппа, в их числе ДНК-аптамеры RHA0385 (G7) и RHA006 (G6) к ГА вируса H5N1 (A/Anhui/1/2005) и Bv42 (I5) как результат оптимизации первичного аптамера, полученного SELEX к вирусу H3N2. Известна только первичная структура этих аптамеров и аффинность: для G6 и G7 – к некоторым рекомбинантным ГА (рекГА) и вирусам (вирГА) серотипов H1, H3, H5 (для I5 исследовано только взаимодействие с вирГА серотипов H1 и H3). Аптамеры I5, G7 и G6 использованы в прототипах аптасенсоров. Особый интерес исследователей к аптамерам G7 и G6 связан с их способностью узнавать девять различных штаммов вируса гриппа А. Ранее в нашей лаборатории методом кругового дихроизма определили только тип неканонических структур этих аптамеров: GQ для G7 и G6, i-мотив для I5, а также их термическую стабильность. Роль отдельных элементов структуры: предполагаемого каркаса и петель, как в формировании структуры аптамеров, так и в комплексообразовании с белком исследованы не были.

Цели и задачи работы

Целью данной работы являлся поиск структурно-функциональных взаимоотношений для ДНК-аптамеров к ГА вируса гриппа А, которые обладают предполагаемыми каркасами с неканоническими структурами разного типа: GQ параллельной и гибридной топологии, а также i-мотивом.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Изучение структуры ДНК-аптамеров к ГА: G7, G6 и I5.
2. Определение склонности ДНК-аптамеров к олигомеризации.
3. Исследование комплексообразования аптамеров с различными ГА: рекомбинантными (рекГА) и в составе инактивированных вирусных частиц (вирГА).
4. Изучение роли элементов неканонических структур ДНК: каркаса, петель и фланкирующих последовательностей – в связывании с ГА.

Объект исследования

ДНК-аптамеры к ГА вируса гриппа (G6, G7, I5).

Предмет исследования

Структура ДНК-аптамеров к ГА и их производных; комплексы ДНК-аптамеров с рекомбинантными ГА (рекГА) и с инактивированными вирусными частицами (вирГА).

Научная новизна исследования

Впервые установлены детали неканонической структуры ДНК-аптамеров к ГА вируса гриппа А. Впервые при помощи оригинальной методики эксклюзионной ВЭЖХ, разработанной в нашей лаборатории, установлена степень олигомеризации для ДНК-аптамеров к ГА вируса гриппа А. Впервые при помощи метода интерферометрии биоконплексов получены константы скорости и равновесия для комплексов ДНК-аптамеров и их производных с рекГА и вирГА различных штаммов. Расширена панель штаммов вируса гриппа, которые способны узнавать аптамеры: для G7 показано связывание как с рекГА, так и с вирГА серотипов H7, H9, а также с вирГА H12; для G6 — с рекГА H7, H9 и вирГА H12. I5 связывается как с рекГА, так и с вирГА H5, а также с рекГА H7 и H9.

Теоретическая значимость исследования

Поиск элементов структуры аптамера, ответственных за узнавание мишени, на примере ДНК-аптамеров к ГА вируса гриппа А является новым и актуальным исследованием, выполненным на мировом уровне, и вносит вклад в понимание механизмов взаимодействия аптамеров с белковыми мишенями. В данной работе проверяется функциональная роль каркаса и петель аптамера в узнавании белковой мишени – ГА, на примере ДНК-аптамеров с неканоническими структурами. У GQ аптамеров к ГА сам каркас играет существенную роль в узнавании. Полученные результаты определяют стратегию и тактику моделирования и экспериментальных исследований в разработке аптамеров к ГА вируса гриппа А.

Практическая значимость исследования

Исследовано взаимоотношение между структурными и функциональными характеристиками аптамеров к ГА вируса гриппа А. Аптамерные нуклеиновые кислоты разных неканонических структур могут иметь высокую аффинность к ГА вируса гриппа А. Кроме того, возможно получение коротких аптамерных ДНК (длиной 15 и 19 нуклеотидов), обладающих топологией параллельного или гибридного GQ, узнающих ГА вируса гриппа А. Разработана методика интерферометрии биоконплексов для исследования взаимодействия аптамеров с рекомбинантными ГА и инактивированными вирусными частицами, позволяющая исследовать как равновесные, так и, что более важно, константы скорости ассоциации и диссоциации комплекса (k_{on} и k_{off}). Данная методика исследования параметров аффинности комплексообразования между G-квадруплексами и белками-мишенями разработана при поддержке субсидии Министерства высшего образования и науки от 09.10.2020 г. № 075-15-2020-809. Из исходных аптамеров сконструированы производные с низкими константами скорости диссоциации k_{off} порядка $10^{-5} - 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, которые могут послужить перспективными

молекулярными узнающими элементами для аптасенсоров с широкой специфичностью к различным штаммам вируса гриппа А.

Методология диссертационного исследования

Методология основана на использовании следующих методов. Спектры кругового дихроизма и поглощения ультрафиолетового света для исследования вторичной структуры и стабильности аптамеров в различных условиях получены на спектрометре Chirascan, НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского. Спектры ядерного магнитного резонанса получены на приборах Bruker AVANCE III HD 300 и Bruker AVANCE III 400, ИМБ РАН им. В.А.Энгельгардта. Олигомерный состав образцов аптамеров исследовали при помощи эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent 1200 HPLC с колонкой TSKgel G2000SWXL. Комплексообразование исследовали на приборах ProteOn XPR36 (поверхностный плазмонный резонанс), BLItz, ForteBIO Octet Red96 и Sartorius Octet R2 (интерферометрия биокомплексов). Поглощение продукта пероксидазной реакции в процессе аптаферментного анализа регистрировали на планшетном ридере TECAN Spark 10M. Обработку данных выполняли при помощи программного обеспечения Pro-Data Chirascan, ProteOn Manager Software, BLItz Pro 1.3, Data Acquisition v.10.0, Microsoft Excel 2019 и OriginPro.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Каркасы ДНК-аптамеров G6 и G7 — это мономерные, стабильные при комнатной температуре GQ параллельной и гибридной топологии.
2. Аптамеры способны специфически связываться с ГА разных штаммов вируса гриппа А, в том числе далёких по первичной структуре (рекГА и в составе инактивированных вирусных частиц).
3. Для ДНК-аптамеров G6 и G7 важным является наличие каркасной структуры.
4. Изменение предполагаемых петель и фланкирующих участков аптамера G7 не отменяет связывание с ГА, но модулирует аффинность при изменении констант скорости ассоциации и диссоциации, и селективности относительно родственных ГА.
5. Для связывания аптамера I5 с ГА не обязательна фиксированная конформация i-мотива.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены

на современном научном оборудовании с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на следующих научных мероприятиях и конференциях:

1. Международная зимняя школа «Interaction Wins 2021», Павия, Италия;
2. 45th FEBS Congress, 2021, Любляна, Словения;
3. 6th International Symposium «Aptamers 2019», Оксфорд, Великобритания;
4. Четыре Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», 2017, 2018, 2019, 2020 гг., Москва, Россия;
5. 5th ISIRV AVG Conference, 2017, Шанхай, Китай.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 3 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus. В научных публикациях (**Bizyaeva A.A.**, Bunin D.A., Moiseenko V.L., et al., Int. J. Mol. Sci. 2021) и (**Novoseltseva (Bizyaeva) A.A.**, Ivanov N.M., Novikov R.A., et al. Biomolecules. 2020) автор принимал активное участие в постановке задач, выполнении экспериментов (в том числе в исследовании структуры и функции аптамеров, составлении филогенетического дерева гемагглютининов), анализе данных и подготовке публикаций, включая переписку с редакцией и рецензентами (при поддержке грантов РФФИ 19-315-90100, РФФ 18-74-10019). В публикации (Kukushkin V.I., Ivanov N.M., **Novoseltseva (Bizyaeva) A.A.**, et al., PLoS ONE. 2019) описаны эксперименты по определению аффинности аптамера G7 к рекомбинантным ГА, выполненные автором (при поддержке гранта РФФ 18-74-10019).

Личный вклад автора

Личный вклад автора в диссертационное исследование заключался в сборе и анализе данных литературы, в планировании и проведении экспериментов, в обработке, анализе и оформлении полученных результатов, подготовке материалов к печати, в представлении результатов на научных мероприятиях.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Результаты и обсуждение, Материалы и методы, Заключение, Выводы и Список литературы, состоящий из 142 наименований. Работа содержит 58 рисунков и 16 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. G-квадруплексные аптамеры G6 и G7

Первичная структура аптамеров G7 (TTGGGGTTATTTTGGGAGGGCGGGGGTT, 28 н.) и G6 (GGGTTTGGGTTGGGTTGGGTTTGGGTTGGGTTGGGAAAAA, 48 н.) позволяет предположить следующее. Аптамер G7 может формировать GQ из 3 тетрад; а в аптамере G6 могут присутствовать два одинаковых по первичной структуре GQ-модуля из четырёх G-блоков длиной 3 нуклеотида, соединённых ковалентно линкером T5. Для потенциально двухмодульного G6 возникают вопросы: одинакова ли структура двух модулей, будет ли отдельный модуль узнавать ГА? Поэтому в качестве третьего аптамера был исследован отдельный 5'-концевой модуль аптамера G6, названный G6/2 (GGGTTTGGGTTGGGTTGGG, 19 н.). Всего для G6 исследовано 4 производных. Последующий анализ структуры позволил предположить для аптамеров G7 структуру GQ параллельной топологии и для G6 – GQ с сочетанием параллельной и гибридной топологий (Рис. 1), причём 3'-концевой модуль G6 предположительно имеет структуру параллельного GQ, как и G7, поэтому отдельно был исследован только гибридный 5'-концевой модуль.

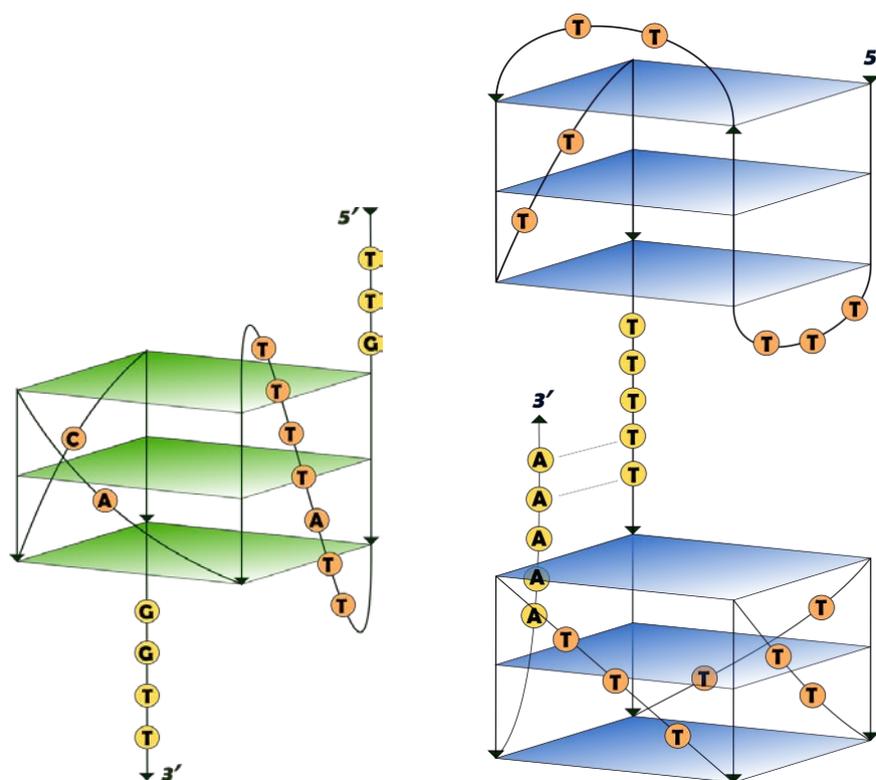


Рисунок 1. Предполагаемые структуры аптамеров G7 (слева) и G6 (справа). Оранжевым отмечены азотистые основания участков петель, желтым – фланкирующих участков. Стрелки позволяют проследить направление цепей ДНК и топологию GQ.

1.1. G-квадруплексная структура G7 и G6.

Анализ структуры методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Наличие GQ в структуре олигонуклеотида можно увидеть на спектрах ¹H-ЯМР по наличию сигналов, характерных для имино-протонов при N7 гуанина, участвующего в хугстиновских связях G-тетрад. Спектры ЯМР, полученные для аптамеров G7, G6 и G6/2 в фосфатном буфере с 10 мМ K⁺, демонстрируют характерные сигналы при 10,5—12 м.д. (Рис. 2).

В отличие от спектров G6 и G6/2, спектр G7 (Рис. 2А) был математически обработан, чтобы разрешить перекрывающиеся сигналы, характерные для сложных смесей конформеров. Интересно, что спектр G6 значительно отличается от спектра G6/2 (Рис. 2Б) присутствием сигналов, характерных для уотсон-криковских пар; возможно, что в бимодульной конструкции между мостиковыми тиминами и 5'-концевыми аденинами образуются АТ-пары (Рис. 1).

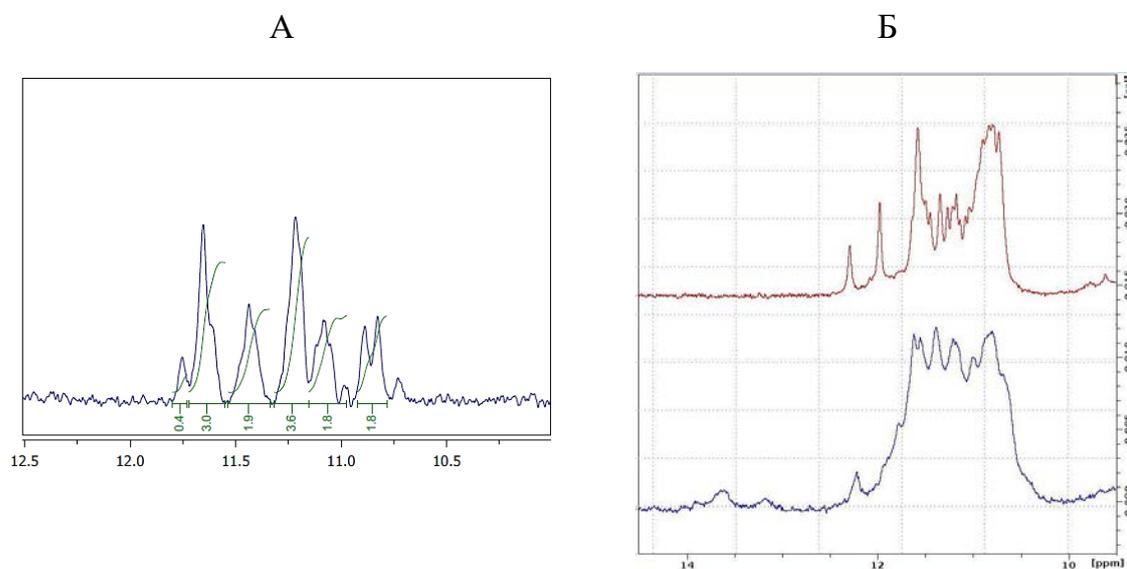


Рисунок 2. Область имино-протонов в спектрах ЯМР аптамеров: (А) G7, (Б) G6/2 (вверху) и G6 (внизу). Концентрации аптамеров 230, 240 и 240 мкМ, соответственно, в стандартном натрий-калий-фосфатном буфере, рН 7, в H₂O + 10% D₂O, добавлен KCl до концентрации ионов K⁺ 10 мМ; 5 °С.

Анализ олигомеризации неканонических структур при помощи эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Оригинальная методика эксклюзионной ВЭЖХ, разработанная в нашей лаборатории, позволяет сопоставить время выхода и кажущуюся молекулярную массу олигонуклеотида, а, следовательно, степень олигомеризации (отношение экспериментальной молекулярной массы к теоретической, вычисленной из

нуклеотидного состава ($M_{\text{эксп}}/M_{\text{теор}}$). В образце G7 с низкой концентрацией (2 мкМ) преобладает мономер со степенью олигомеризации 0,9 (Рис. 3). При повышении концентрации аптамера (в том числе близкой к той, при которой измеряется ЯМР, 200 мкМ), появляется значительное содержание олигомеров, более 70% (Рис. 3).

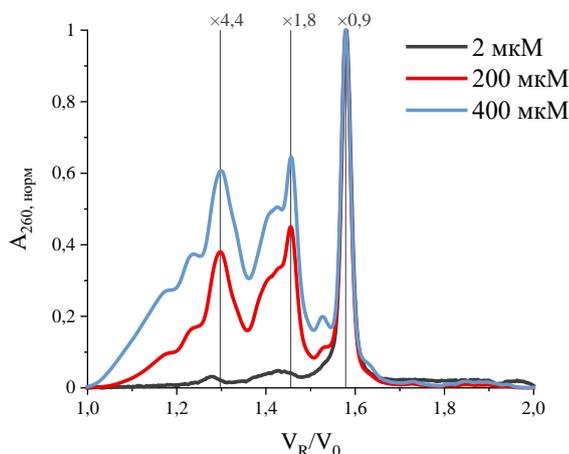


Рисунок 3. Профили гель-фильтрации G7, преформированного в фосфатном буфере с 10 мМ K^+ при концентрации 2, 200 и 400 мкМ. Значения поглощения А при 260 нм нормированы на максимум. Над пиками показана степень олигомеризации, мономеру соответствует пик 0,9, а димеру – 1,8).

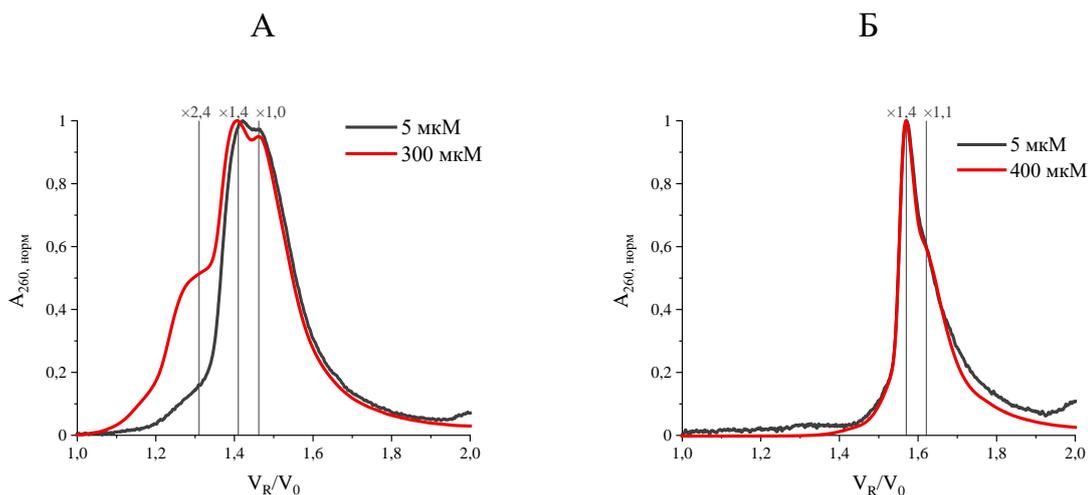


Рисунок 4. Профили гель-фильтрации G6 (А) и G6/2 (Б) в концентрации 5 и 300 мкМ. Значения поглощения А при 260 нм нормированы на максимум. Над пиками показана степень олигомеризации.

Согласно результатам эксклюзионной ВЭЖХ аптамер G6 может иметь три конформации (Рис. 4А). В разбавленных растворах склонность к образованию олигомеров небольшая, присутствуют два перекрывающихся пика со степенями олигомеризации 1,0 и 1,4. Возможно, это отражает наличие двух

мономолекулярных конформаций различной топологии. Аптамер G6/2 как в разбавленных, так и в концентрированных растворах содержит только эти две конформации, $M_{\text{эксп}}/M_{\text{теор}} = 1,1$ и $1,4$, причём доля первой ($M_{\text{эксп}}/M_{\text{теор}} = 1,1$) меньше, чем для G6 (Рис. 4Б). GQ-модуль G6/2 менее склонен к олигомеризации, чем исходный бимодульный аптамер G6.

Определение топологии GQ-аптамеров при помощи спектроскопии кругового дихроизма

Спектр кругового дихроизма (КД) аптамера G7, преформированного в присутствии 10 мМ ионов K^+ (Рис. 5А), с положительным максимумом при 263 нм и отрицательным при 243 нм, характерен для параллельной топологии GQ. В то же время в спектре G7, координированного ионами натрия, эти максимумы менее выражены, что свидетельствует о менее выраженной конформации.

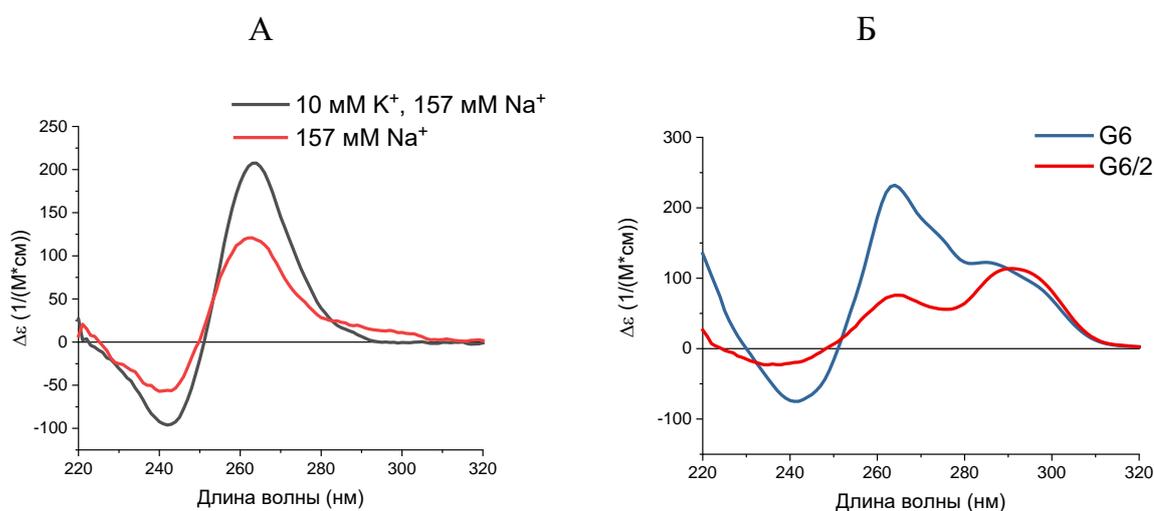


Рисунок 5. Спектры КД при 20 °С: (А) G7 – параллельный GQ, (Б) G6 и G6/2 – параллельная и гибридная топология GQ.

Спектр КД аптамера G6/2 (Рис. 5Б) демонстрирует гибридную топологию GQ, поскольку сочетает в себе положительные максимумы, характерные как для параллельной топологии (около 260 нм), так и для антипараллельной топологии (около 295 нм). Объединение двух модулей в аптамер G6 приводит к значительному увеличению максимума при 260 нм и появлению спектра КД параллельного GQ с небольшой компонентной антипараллельного или гибридного, что приближает этот спектр к таковому для аптамера G7. Следовательно, ковалентное соединение двух GQ-модулей с одинаковой первичной структурой в аптамер G6 приводит к изменению топологии второго, 3'-концевого модуля.

Термическая стабильность GQ-аптамеров

GQ-аптамеры G7, G6 и G6/2 стабильны при комнатной температуре. Температура плавления ($T_{пл}$) G7 составляет $50,1 \pm 0,2$ °C в присутствии K^+ и $34,6 \pm 0,5$ °C в отсутствие K^+ ; то есть координация K^+ G-квадруплексом повышает стабильность аптамера, что согласуется с данными литературы. Для G6 и G6/2 $T_{пл}$ составили $48,3 \pm 0,2$ °C и $58,1 \pm 0,5$ °C, соответственно; то есть одиночный модуль G6/2 стабильнее, чем бимодульный G6, что тоже концептуально объяснимо.

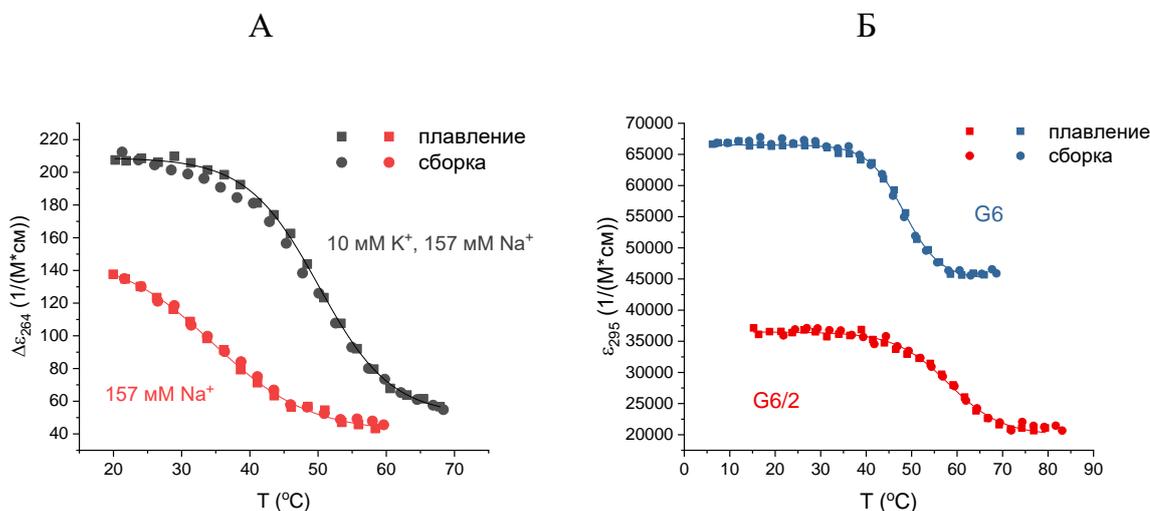


Рисунок 6. Кривые плавления (квадрат) и сборки (кружок): (А) G7, преформированный в присутствии K^+ (чёрный) и в отсутствие K^+ (красный); (Б) G6 (синий) и G6/2 (красный).

Термодинамические параметры сборки структур

Отсутствие гистерезиса у кривых плавления и сборки для G7 (Рис. 6А), а также наличие одной мономолекулярной конформации (Рис. 3), позволяет вычислить термодинамические параметры сборки аптамера (Рис. 7).

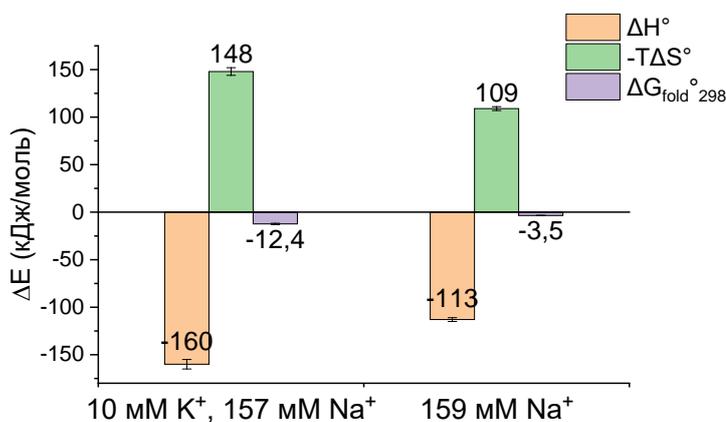


Рисунок 7. Термодинамические параметры G7, преформированного в присутствии ионов K^+ (слева) и в их отсутствие (справа).

Структура G7 термодинамически стабильна (изменение энергии Гиббса при сборке $\Delta G_{\text{fold}}^{\circ 298} < 0$ кДж/моль) независимо от наличия K^+ . Однако замена координируемого иона G7 с K^+ на Na^+ приводит к падению стабильности на порядок, причём наибольшее влияние оказывает уменьшение энтальпийного фактора на 47 кДж/моль, хотя энтропийный тоже снижается по модулю на 39 кДж/моль. Таким образом, изменение природы катиона, координирующего аптамер, с калия на натрий приводит к образованию менее стабильной конформации G-квадруплекса.

1.2. Аффинность аптамеров к рекомбинантному ГА

Узнавание одним аптамером ГА разных штаммов

В работе методом поверхностного плазмонного резонанса показано, что аптамеры G7 и G6 обладают способностью связываться с рекГА различных штаммов (Н1, Н3, Н5, Н7, Н9) с высокой аффинностью порядка единиц–десятков нМ и низкой константой скорости диссоциации k_{off} порядка 10^{-3} c^{-1} (Табл. 1). Для каждого из аптамеров аффинность примерно одинакова ко всем исследованным ГА, кроме Н1. Это наблюдение согласуется с данными литературы о способности аптамеров G6 и G7 связываться с ГА некоторых штаммов и расширяет узнаваемую панель ГА для серотипов Н7 и Н9. Впервые показано, что двухмодульный аптамер G6 обладает более низкими значениями концентрационной константы диссоциации K_d за счёт более низкой скорости диссоциации.

Таблица 1. Константы скорости и равновесия для комплексов аптамеров G7 и G6 (10 мМ K^+) с иммобилизованными рекГА Н1, Н3, Н5, Н7, Н9, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса: k_{on} , $\text{мкМ}^{-1} \times \text{c}^{-1}$, $k_{\text{off}} \times 10^{-3}$, c^{-1} , K_d , нМ.

	Параметр	Значение				
		Н1	Н3	Н5	Н7	Н9
G7	K_d , нМ	7 ± 2	12 ± 3	13 ± 3	12 ± 4	14 ± 4
	k_{on} , $\text{мкМ}^{-1} \times \text{c}^{-1}$	$1,0 \pm 0,2$	$0,51 \pm 0,07$	$0,51 \pm 0,06$	$0,61 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,06$
	$k_{\text{off}} \times 10^{-3}$, c^{-1}	$6,9 \pm 0,9$	$6,1 \pm 0,5$	$6,7 \pm 0,8$	8 ± 2	$6,4 \pm 0,8$
G6	K_d , нМ	6 ± 3	$2,0 \pm 0,8$	$2,1 \pm 0,8$	2 ± 1	$1,3 \pm 0,4$
	k_{on} , $\text{мкМ}^{-1} \times \text{c}^{-1}$	$0,33 \pm 0,09$	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,57 \pm 0,05$
	$k_{\text{off}} \times 10^{-3}$, c^{-1}	$1,8 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,2$

Взаимодействие разных аптамеров с одним ГА

Катион, который координирует гуанины GQ, влияет не только на структуру, но и на аффинность аптамера G7 к рекГА штамма A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Комплекс аптамера с рекГА в присутствии ионов калия на порядок более стабилен: K_d , полученные методом интерферометрии биокомплексов, составляют $0,6 \pm 0,3$ нМ в присутствии K^+ и 4 ± 2 нМ в его отсутствие. Скорость ассоциации одинакова, но отсутствие катионов калия ведёт к быстрой диссоциации комплекса, что заметно не только по величинам констант скорости диссоциации k_{off} , отличающимся на порядок ($(0,16 \pm 0,07) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ для комплекса в присутствии K^+ и $(1,7 \pm 0,7) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ в отсутствие K^+), но и по разнице в убывании сигнала на стадии диссоциации (180–400 с на сенсограммах, Рис. 8).

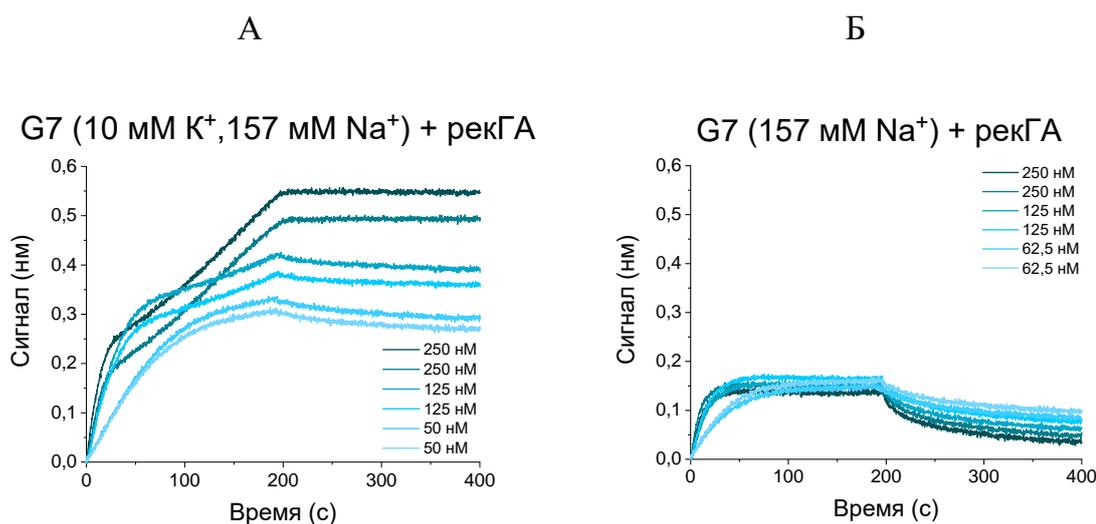


Рисунок 8. Сенсограммы интерферометрии биокомплексов для взаимодействия иммобилизованного рекГА штамма A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) с аптамером G7, преформированным в фосфатном буфере pH 7 в присутствии (А) ионов K^+ (10 мМ) и Na^+ (157 мМ) или (Б) только ионов Na^+ (157 мМ). Указана концентрация аптамера.

Что касается аптамера G6 и его отдельного 5'-концевого модуля G6/2, гибридного GQ (Рис. 9), то отсутствие второго, 3'-концевого модуля, параллельного GQ, приводит к ухудшению связывания с рекГА в 2 раза, но не исключает его полностью ($K_d = 0,35 \pm 0,09$ нМ для G6 и $0,7 \pm 0,3$ нМ для G6/2); для G6/2 значения обеих констант скорости снижены (k_{on} уменьшается в три раза с $(0,48 \pm 0,02) \text{ мкМ}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ для G6 до $(0,12 \pm 0,03) \text{ мкМ}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ для G6/2, а k_{off} с $(1,7 \pm 0,4) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ до $(0,9 \pm 0,2) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, соответственно), что свидетельствует о разной кинетике связывания GQ разной топологии. Также интересно, что для G6/2 k_{off} достигла 10^{-5} с^{-1} , что на порядок лучше средних значений для разных аптамеров ко многим белковым мишеням.

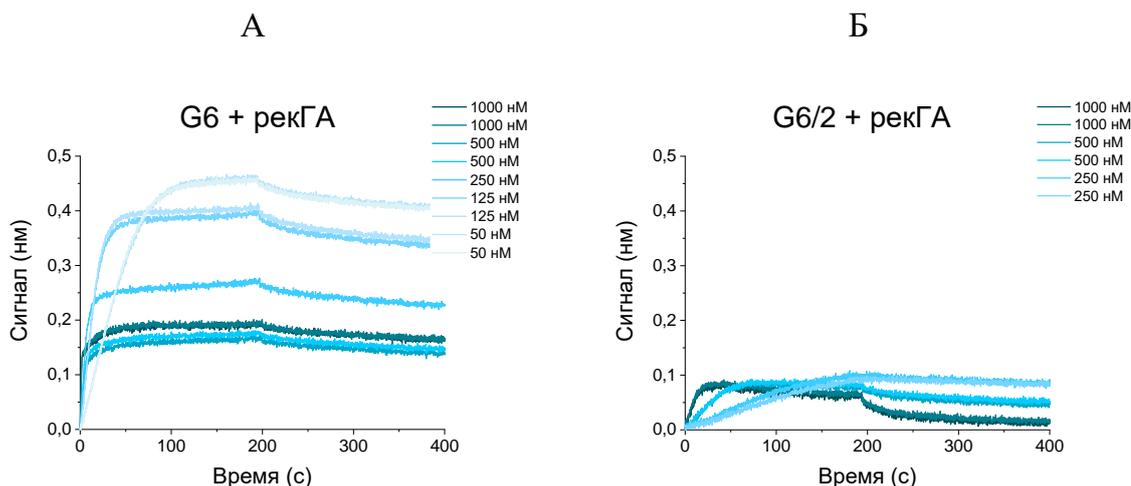


Рисунок 9. Сенсограммы интерферометрии биокомплексов для взаимодействия иммобилизованного рекГА штамма A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) и аптамеров (А) G6 и (Б) G6/2 в присутствии 10 мМ К⁺. Указана концентрация аптамера.

1.3. Взаимодействие аптамеров с ГА в составе инактивированных вирусных частиц

Метод интерферометрии биокомплексов позволяет получать константы скорости ассоциации и диссоциации комплексов аптамеров не только с рекГА, но и с ГА в составе вирусов гриппа, вирГА. Вирусы гриппа А выращены и инактивированы в лаборатории А.С. Гамбарян, ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН. Аптамер G7 показал высокую аффинность к вирГА штамма A/chicken/Kurgan/3654at/2005 (H5N1) (Рис. 10А), K_d в пересчёте на концентрацию белка составила $0,05 \pm 0,02$ нМ.

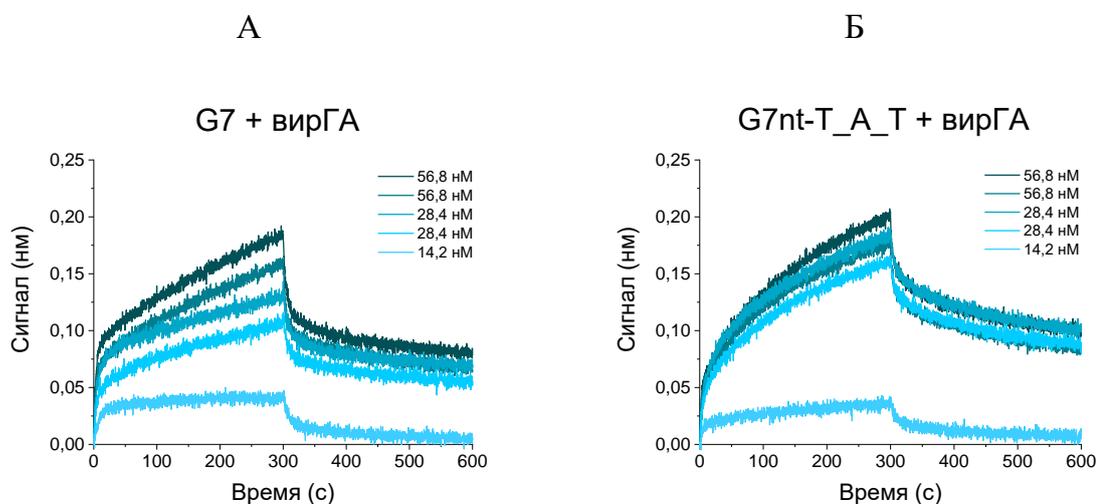


Рисунок 10. Сенсограммы интерферометрии биокомплексов для взаимодействия иммобилизованных аптамеров (А) G7 и (Б) G7nt-T_A_T с вирГА для штамма A/chicken/Kurgan/3654at/2005 (H5N1). Указана концентрация вирГА.

1.4. Производные аптамера G7

Для исследования роли различных элементов структуры аптамера G7 в узнавании ГА получены 13 производных с заменами и делециями в предполагаемых участках петель и фланкирующих участках. Самым интересным вариантом G7 оказался G7nt-T_A_T, в котором удалены оба фланкирующих участка, семинуклеотидная петля TTATTTT сокращена до одного нуклеотида (Т), петля С заменена на петлю Т (GGGTGGGAGGGTGGG, 15 н.).

G7nt-T_A_T сохраняет топологию параллельного GQ (Рис. 11А), но переходит в тетрамолекулярную конформацию (Рис. 11Б) в отличие от исходного аптамера G7. Удивительно, что при этом сохраняется высокая аффинность как к рекГА ($0,6 \pm 0,2$ нМ для A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)), так и к вирусным частицам ($0,07 \pm 0,04$ нМ для A/chicken/Kurgan/3654at/2005 (H5N1), Рис. 10Б). Особенно важно сохранение низкой скорости диссоциации комплекса с вирГА ($(2,6 \pm 0,7) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ по сравнению с $(2,0 \pm 0,6) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ у исходного аптамера). Параллельный G-квадруплекс даже с существенными изменениями в петлях и фланкирующих последовательностях сохраняет способность узнавать ГА.

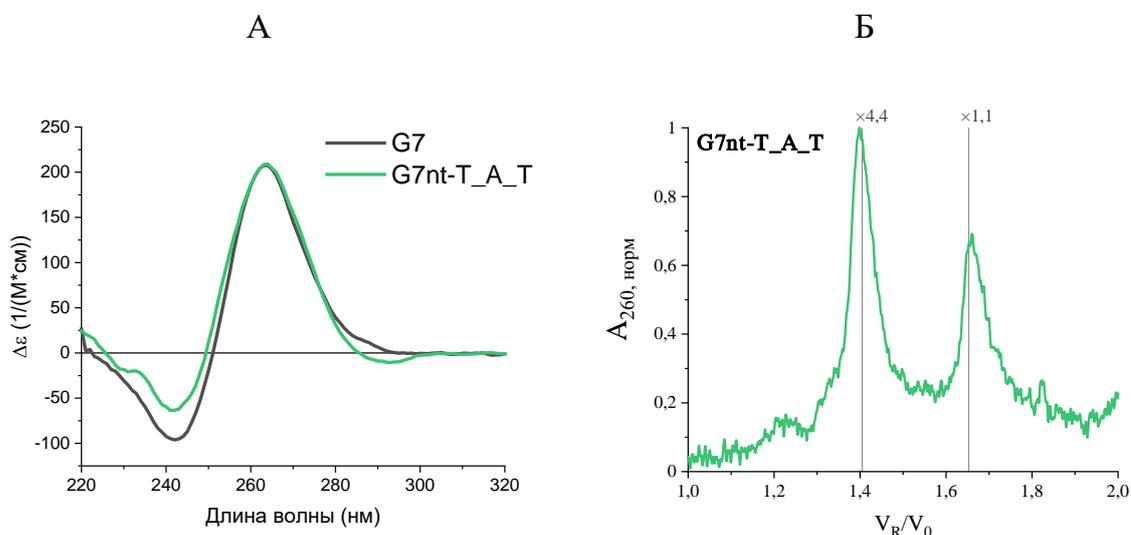
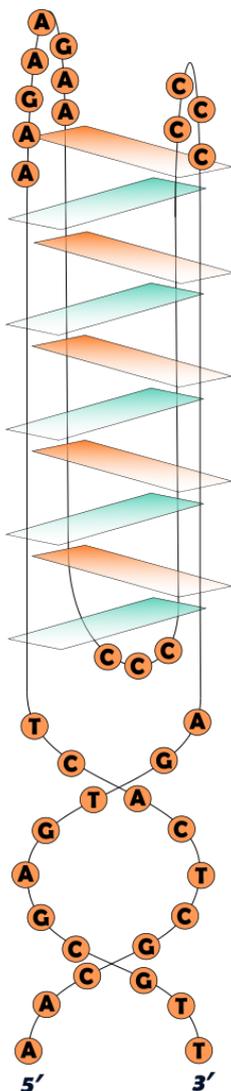


Рисунок 11. Характеристика структуры G7nt-T_A_T. (А) Спектр КД при 20 °С. (Б) Профиль гель-фильтрации 2 мкМ. Значения поглощения А при 260 нм нормированы на максимум. Над пиками показана степень олигомеризации.

Ни фланкирующие участки, ни петли сами по себе не влияют на узнавание аптамером G7 ГА. Изменения были менее значимы, чем вызванные заменой координационного иона в GQ с катиона калия на натрий. По-видимому, узнающим элементом аптамера G7 служит сам GQ. Таким образом, получен минимальный 15-звенный параллельный GQ с тремя G-тетрадами, обладающий аффинностью к ГА вируса гриппа А.

2. ДНК-аптамер к ГА, образующий i-мотив, I5

2.1. Структура I5



Ранее в нашей лаборатории для аптамера I5 (AACGCTCACTCCCCCAAGAAGAACCCCC CCC CCCCC CCCC CCCCC AGTGAGCGTT, 55 н.) из анализа структуры методами ЯМР и КД был предложен каркас аптамера, состоящего из двух модулей: концевой канонического дуплекса с уотсон-криковскими парами и неканонической четырёхтяжевой структуры i-мотива.

Предполагаемый декамерный дуплекс образуется комплементарными 5'- и 3'-концевыми участками. Два блока – C5 и C22 – разделены участком AAGAAGAA. Размеры блока C5 определяют максимальный размер i-мотива в 10 чередующихся полупротонированных пар C-C+ (Рис 12, Табл. 2). Очередность расположения C-петель (сначала C3, затем C4, а не наоборот) выбрана произвольно.

Для анализа роли предполагаемых петель и фланкирующего дуплекса были созданы производные аптамера I5 (всего 9 вариантов, из которых в автореферате рассматриваются 3). Так, у I5-6 отсутствует предполагаемый дуплекс; у I5-1 два G в большой петле AAGAAGAA заменены на два T; у I5-7 все предполагаемые участки петель заменены на олиго(T) (Табл. 2).

Рисунок 12. Предполагаемая структура аптамера I5.

Таблица 2. Участки предполагаемой структуры аптамера I5 и его производных.

Аптамер	5'-концевой комплемент		Большая петля		Малая петля		Малая петля		3'-концевой комплемент
I5	AACGCTCA CT	C5	AAGAA GAA	C5	CCC	C5	CCCC	C5	AGTGAGC GTT
I5-6	—	C5	AAGAA GAA	C5	CCC	C5	CCCC	C5	—
I5-1	AACGCTCA CT	C5	AATAAT AA	C5	CCC	C5	CCCC	C5	AGTGAGC GTT
I5-7	AACGCTCA CT	C5	TTTTTT TT	C5	TTTT	C5	TTTT	C5	AGTGAGC GTT

Анализ олигомеризации I5 при помощи эксклюзионной ВЭЖХ

Согласно результатам эксклюзионной ВЭЖХ аптамер I5 является мономером с отношением $M_{\text{эксп}}/M_{\text{теор}} = 1,0$ (Рис. 13). При изменении pH наблюдается появление дополнительных «плеч», по-видимому, из-за pH-зависимых конформационных перестроек.

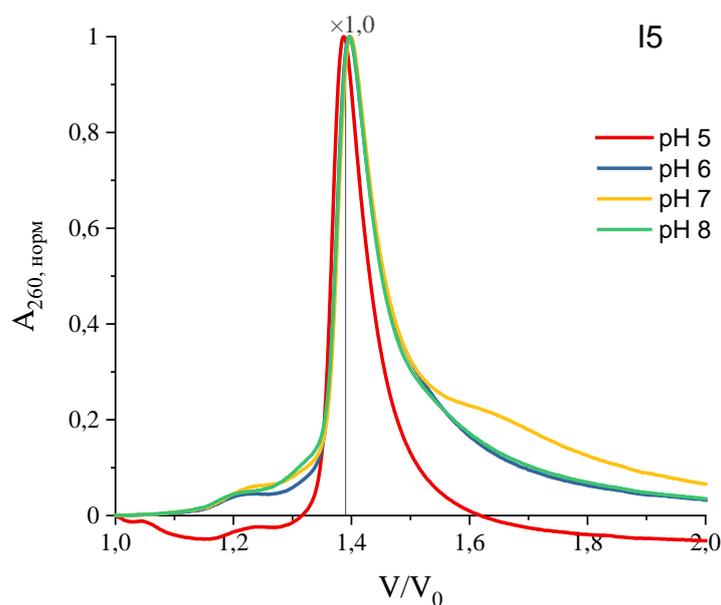


Рисунок 13. Профили эксклюзионной ВЭЖХ 2 мкМ I5 при различных pH.

Определение топологии I5 и его производных при помощи спектроскопии
кругового дихроизма (КД)

Предварительные исследования в нашей лаборатории показали, что аптамер I5 обладает КД спектром i-мотива в слабокислых средах при рН около 5: положительным максимумом около 285 нм и отрицательным – около 265 нм. Даже в нейтральной среде сохраняются молекулы с конформацией i-мотива, возможно благодаря его протяженным размерам (рН полуперехода $7,0 \pm 0,1$; Рис. 14А).

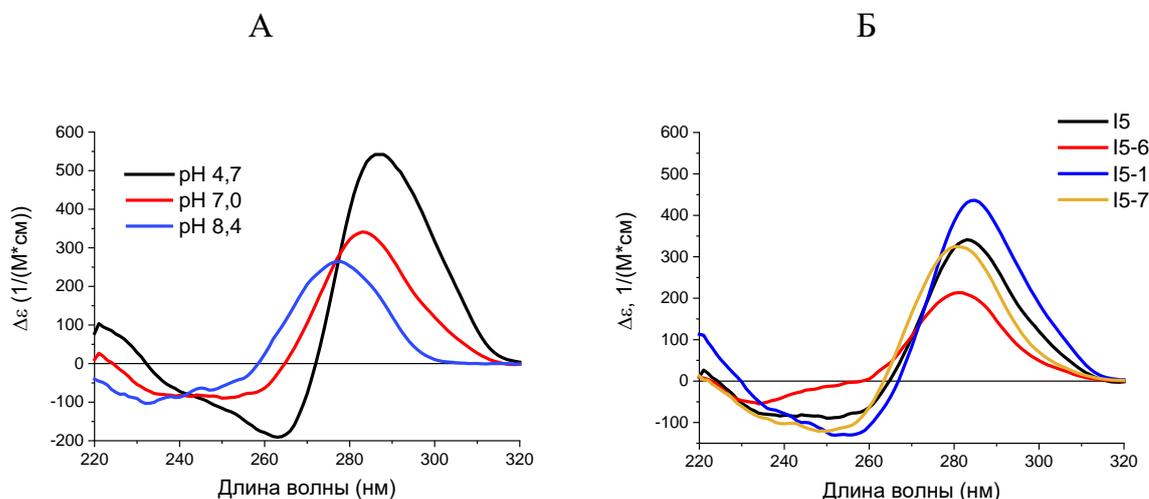


Рисунок 14. Спектры КД в фосфатном буфере, 20 °С: (А) аптамер I5 при разных рН, (Б) аптамер I5 и производные I5-6, I5-1, I5-7, рН 7.

Не все производные I5 сохраняют структуру i-мотива в нейтральной среде, что видно из положения максимума КД (Рис. 14Б). Так, в отсутствие дуплекса у I5-6 структура i-мотива не сохраняется и спектр имеет максимум при 280 нм, характерный для одноцепочечной ДНК (рН полуперехода = $6,8 \pm 0,1$). Аналогичное положение максимума у I5-7, для которого размер петель фиксирован заменой С на Т (фазированное производное). Для большой петли замена G на T может придавать ей гибкость.

2.2. Взаимодействие I5 с ГА в составе инактивированных вирусных частиц

Впервые получены данные по аффинности аптамера I5 к ГА серотипа H5 для вирГА штамма A/chicken/Kurgan/3654at/2005 (H5N1) методом интерферометрии биокomплексов: $K_d = 0,5 \pm 0,2$ нМ; $k_{on} = (0,34 \pm 0,03) \text{ мкМ}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ и $k_{off} = (0,15 \pm 0,05) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ (Рис. 15Б). Аптамер преформирован в натрий-фосфатном буфере, рН 7; аптамер, преформированный при рН 5, не связывается с вирусом (Рис. 15А). Видимо, для узнавания ГА аптамером I5 не обязательна фиксированная структура i-мотива.

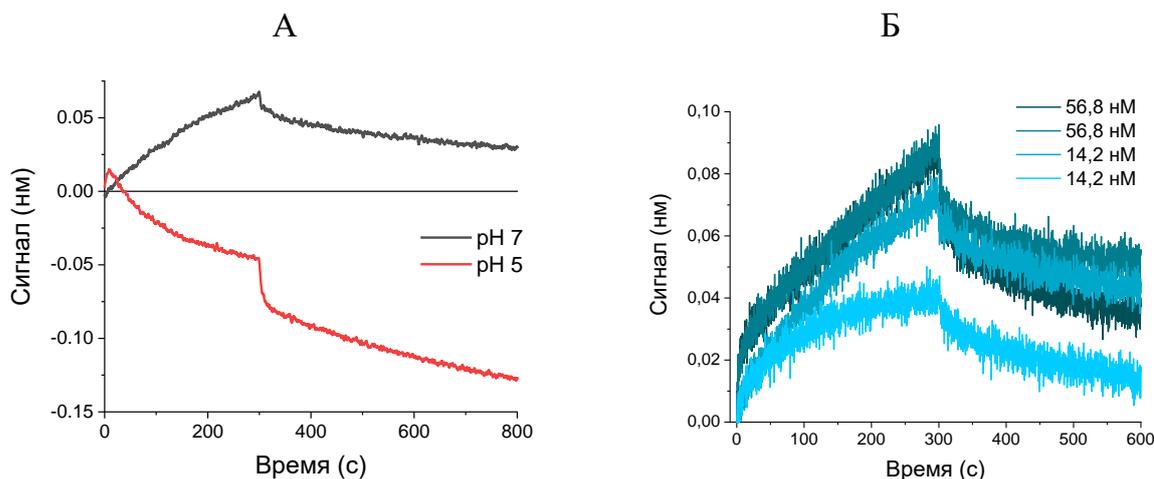


Рисунок 15. Сенсограммы интерферометрии биокомплексов для иммобилизованного аптамера I5: (А) аптамер, преформированный при рН 7 (чёрная линия) и при рН 5 (красная линия), в комплексе с 14 нМ вирГА штамма A/chicken/Kurgan/3654at/2005 (H5N1); (Б) аптамер, преформированный при рН 7, в комплексе с различными концентрациями вирГА.

2.3. Аффинность I5 к рекГА

Аффинность аптамера I5 и его производного I5-1, содержащего замены в большой петле, к иммобилизованным рекГА разных штаммов была исследована на качественном уровне при помощи метода поверхностного плазмонного резонанса (Рис. 16). Во-первых, вариант I5-1 не утратил способности связываться с рекГА; во-вторых, I5 и I5-1 по-разному узнают разные рекГА, по-видимому, на это влияет большая петля. Впервые установлено связывание аптамера I5 с ГА серотипов H7 и H9.

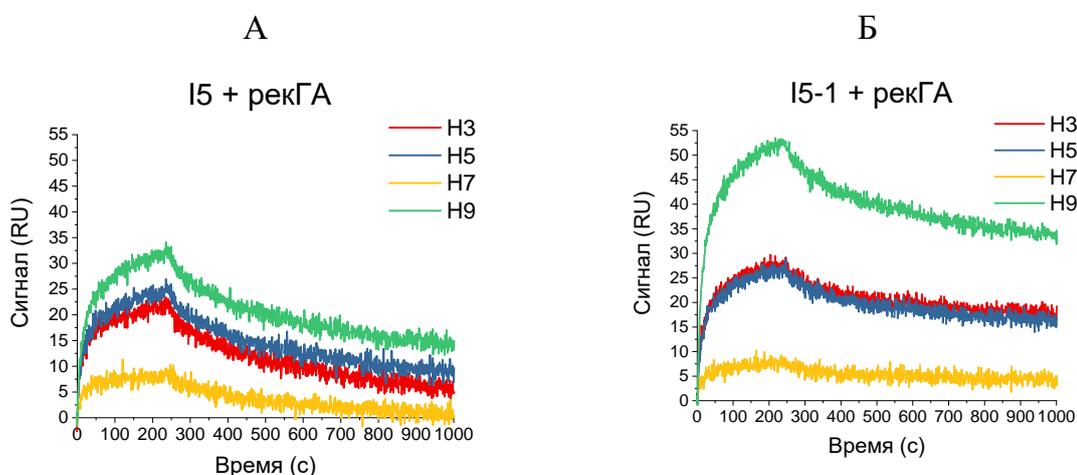


Рисунок 16. Сенсограммы поверхностного плазмонного резонанса для комплексов 100 нМ I5 (А) и I5-1 (Б) с иммобилизованными рекГА штаммов H3, H5, H7, H9.

Количественно связывание аптамеров серии I5 с рекГА изучали методом интерферометрии биоконплексов (Рис. 17, Табл. 3). Все аптамеры имеют высокую аффинность на уровне сотен пМ. Следовательно, ни петли, ни фланкирующие участки не имеют решающей роли в узнавании ГА.

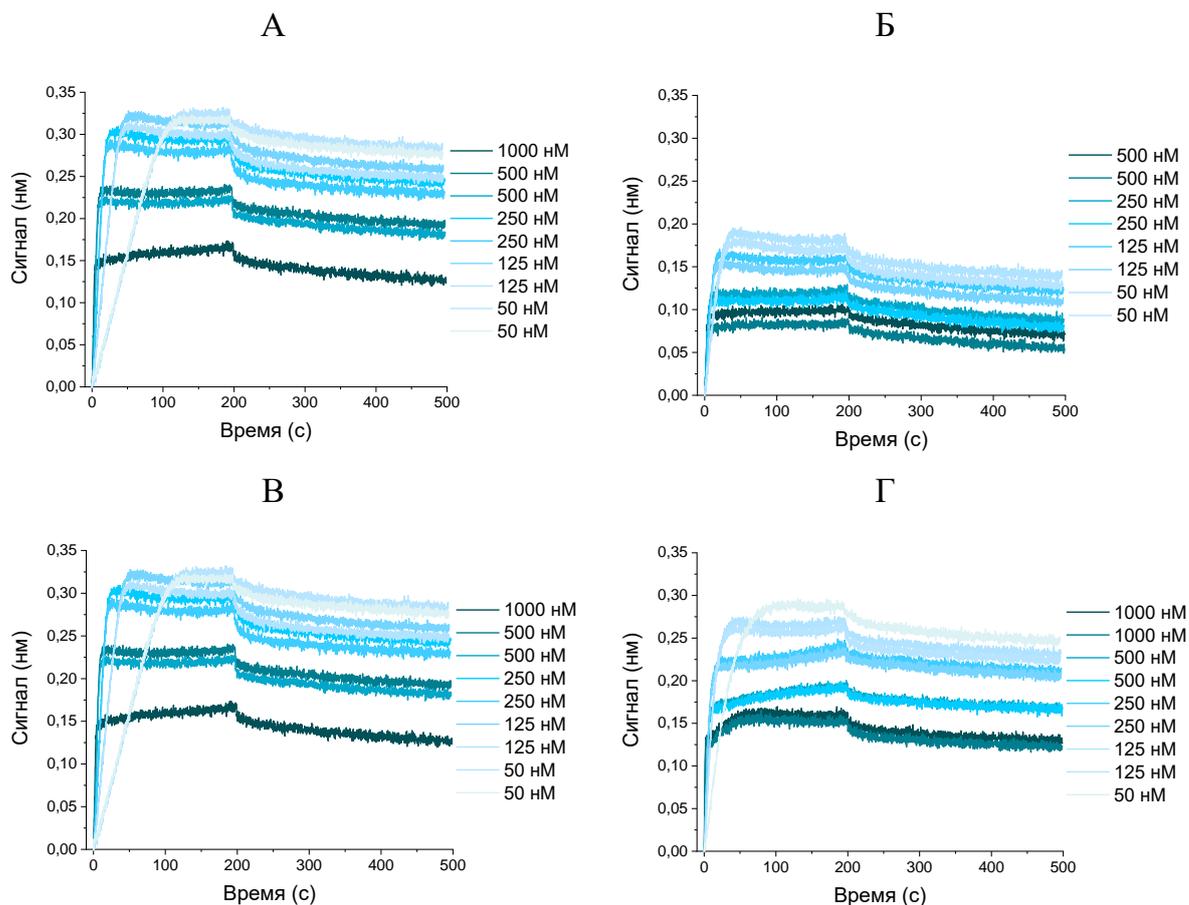


Рисунок 17. Сенсограммы интерферометрии биоконплексов для взаимодействия аптамеров (А) I5, (Б) I5-6, (В) I5-1, (Г) I5-7 с иммобилизованным рекГА штамма A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Указаны концентрации аптамеров.

Таблица 3. Константы скорости и равновесия для комплексов аптамера I5 и его производных (рН 7) с иммобилизованным рекГА штамма A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), полученные методом интерферометрии биоконплексов: k_{on} , $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$, k_{off} , $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ и K_d , нМ.

Аптамер	k_{on} , $\text{мкМ}^{-1} \times \text{c}^{-1}$	$k_{off} 10^{-4}, \text{c}^{-1}$	K_d , нМ
I5	0,34 ± 0,03	1,5 ± 0,5	0,4 ± 0,2
I5-6	0,77 ± 0,07	1,0 ± 0,3	0,13 ± 0,05
I5-1	0,27 ± 0,05	2,1 ± 0,7	0,8 ± 0,4
I5-7	0,52 ± 0,03	0,8 ± 0,3	0,16 ± 0,07

Интересно отметить, что при уменьшении молярного КД при 287 нм, соответствующего *i*-мотиву, k_{on} возрастает: при сравнении I5-1 и I5-6 почти в три раза – $(0,27 \pm 0,05)$ и $(0,77 \pm 0,07)$ [$\mu\text{M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$], соответственно. Следовательно, аптамеры без дуплексного модуля (I5-6) и с фазированными блоками олиго(С) (I5-7), которые имеют более низкие значения рН полуперехода, быстрее и лучше формируют конформацию, которая узнаёт ГА. Однако утверждать, что именно неструктурированная конформация узнает белок, преждевременно. Для более определенных выводов требуется отдельное направленное исследование.

ВЫВОДЫ

- 1 ДНК-аптамеры к гемагглютинуину (ГА) имеют неканонические структуры двух типов: G-квадруплекс (GQ, одно- и двухмодульный, G7 и G6, соответственно) и *i*-мотив (с дуплексным модулем, I5). Отдельные неканонические модули связывают ГА, что позволяет минимизировать исходные аптамеры с 28, 48 и 55 до 15, 19 и 35 нуклеотидов, соответственно.
- 2 Значения концентрационных констант диссоциации (K_d) комплексов находятся в диапазоне пМ–нМ. Однако для изучения взаимоотношений структуры и аффинности более информативными оказались кинетические параметры комплексообразования.
- 3 Аффинность аптамера G7 определяется каркасной структурой GQ, а не структурой петель и фланкирующих участков. Кинетику связывания определяет топология GQ – гибридный GQ (G6 и G6/2) характеризуется меньшими значениями константы скорости диссоциации k_{off} , чем параллельный GQ.
- 4 Топология узнающего параллельного GQ может создаваться как мономолекулярной конформацией аптамера, так и четырехтяжевыми молекулами.
- 5 Аффинность аптамера I5 определяется более сложными параметрами. Константа скорости ассоциации k_{on} возрастает почти в три раза при уменьшении доли фиксированной конформации *i*-мотива: $(0,27 \pm 0,05)$ $\mu\text{M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ для производного I5-1 с гибкой длинной петлей и $(0,77 \pm 0,07)$ $\mu\text{M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ для I5-6 без концевой дуплекса.
- 6 Исходные ДНК-аптамеры стабильны ($T_{пл} > 48^\circ \text{C}$) и не олигомеризуются в условиях комплексообразования с ГА.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.014.2 по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия (химические науки):

1. **Bizyaeva A.A.**, Bunin D.A., Moiseenko V.L., Gambaryan A.S., Balk S., Tashlitsky V.N., Arutyunyan A.M., Kopylov A.M., Zavyalova E.G. The functional role of loops and flanking sequences of G-quadruplex aptamer to the hemagglutinin of influenza A virus // International Journal of Molecular Sciences. 2021. №22. P. 2409. IF = 5,923 (2020, Scopus)
2. **Novoseltseva (Bizyaeva) A.A.**, Ivanov N.M., Novikov R.A., Tkachev Y.V., Bunin D.A., Gambaryan A.S., Tashlitsky V.N., Arutyunyan A.M., Kopylov A.M., Zavyalova E.G. Structural and functional aspects of G-quadruplex aptamers which bind a broad range of influenza A viruses // Biomolecules. 2020. Vol. 10. № 1. P. 119. IF = 4,879 (2020, Scopus)
3. Kukushkin V.I., Ivanov N.M., **Novoseltseva (Bizyaeva) A.A.**, Gambaryan A.S., Yaminsky I.V., Kopylov A.M., Zavyalova E.G. Highly sensitive detection of influenza virus with SERS aptasensor // PLoS ONE. 2019. Vol. 14, № 4. P. e0216247. IF = 3,240 (2020, Scopus)

Иные публикации в рецензируемых научных изданиях:

1. Novoseltseva (Bizyaeva) A., Zavyalova E., Golovin A., Kopylov A. An insight into aptamer–protein complexes. // Aptamers. 2018. Vol. 2. P. 1–19.