



УДК 577.113

## АПТАМЕРНЫЕ ДНК – ИНГИБИТОРЫ ТРОМБИНА НОВОГО ТИПА

© 2003 г. В. А. Спиридонова<sup>##</sup>, Е. В. Рог<sup>\*\*</sup>, Т. Н. Дугина<sup>\*\*\*</sup>,  
С. М. Струкова<sup>\*\*\*</sup>, А. М. Копылов<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, ГСП, Москва, Воробьевы горы;

<sup>\*\*</sup>Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва;

<sup>\*\*\*</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 13.11.2002 г. Принята к печати 21.11.2002 г.

Проведено сравнительное изучение комплексообразования различных препаратов тромбина с 30-звенным ДНК-аптамером. Показана корреляция между фибриногенгидролизующей активностью фермента и его взаимодействием с аптамером. Аптамерная ДНК способна ингибировать образование фибрина из фибриногена.

*Ключевые слова:* ДНК-аптамер; тромбин, ингибитор; фибриногенгидролизующая активность.

### ВВЕДЕНИЕ

Способность однотяжеских нуклеиновых кислот (НК) копироваться, а также формировать сложные третичные структуры определила возникновение новой технологии – SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment). С помощью SELEX получают небольшие молекулы НК – аптамеры, которые по специфичности и аффинности являются функциональными аналогами моноклональных антител [1–6]. Аптамеры способны образовывать стабильные комплексы с различными мишенями: белками, аминокислотами, нуклеотидами, другими низкомолекулярными веществами. В случае ферментов, в частности протеиназ, аптамеры можно использовать в качестве ингибиторов. Цикл отбора аптамеров для РНК включает транскрипцию с матрицы ДНК, связывание с иммобилизованной мишенью, удаление несвязавшейся РНК, элюцию связавшейся обогащенной фракции РНК, синтез кДНК на обогащенной РНК и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для получения необходимого количества материала, чтобы провести следующий цикл отбора. При селекции ДНК транскрипция заменяется несимметричной ПЦР. После 6–10 циклов получают фракцию аптамеров, которые специфически и эффективно связываются с заданным ферментом. В литературе описано получение аптамерных ингибиторов для целого ряда протеиназ: РНК-аптамер для субтилизина [7, 8] и сериновой протеиназы NS3 [9], ДНК-аптамер для эластазы нейтрофилов [10–12].

Тромбин – это многофункциональная сериновая протеиназа, участвующая в регуляции гемостаза. Как фермент, инициирующий тромбообразование, тромбин гидролизует фибриноген, активирует тромбоциты и ряд факторов свертывания плазмы крови с прокоагулянтной активностью. Как антикоагулирующий фермент, тромбин связывается с тромбомодулином, меняя свою субстратную специфичность, и активирует белок С – важнейший антикоагулянт крови. Имеется несколько типов ингибиторов, контролирующих ферментативную активность тромбина, эндогенные: антитромбин III, кофактор гепарина II, протеазный нексин-I,  $\alpha_2$ -макроглобулин,  $\alpha_1$ -антитрипсин [13]; экзогенные: гирудин; синтетические: эфиры арилсульфонил-L-аргинина, производные бензамидина и др. [14].

Несмотря на то что тромбин по своей природе не является белком, способным связывать НК, он был первой протеиназой, для которой методом SELEX были получены ДНК-аптамеры, способные взаимодействовать с различными эпитопами белка [15–18]. Структура аптамеров, взаимодействующих с фибринсвязывающей областью белка (модель третичной структуры комплекса представлена на рис. 1а), обычно организована в виде двух G-квартетов, 5'- и 3'-концевые последовательности которого образуют ДНК-дуплекс [18] (рис. 1б).

В данной работе было исследовано комплексообразование различных препаратов тромбина с ДНК-аптамером (CAGTCCGTGGTAGGGCAGGT-TGGGGTGAAT), последовательность которого содержит мотив, представленный на рис. 1б. Охарактеризована кажущаяся константа диссоциации комплексов, влияние катионов на процесс ком-

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 939-31-49; эл. почта: spiridon@genebee.msu.su)

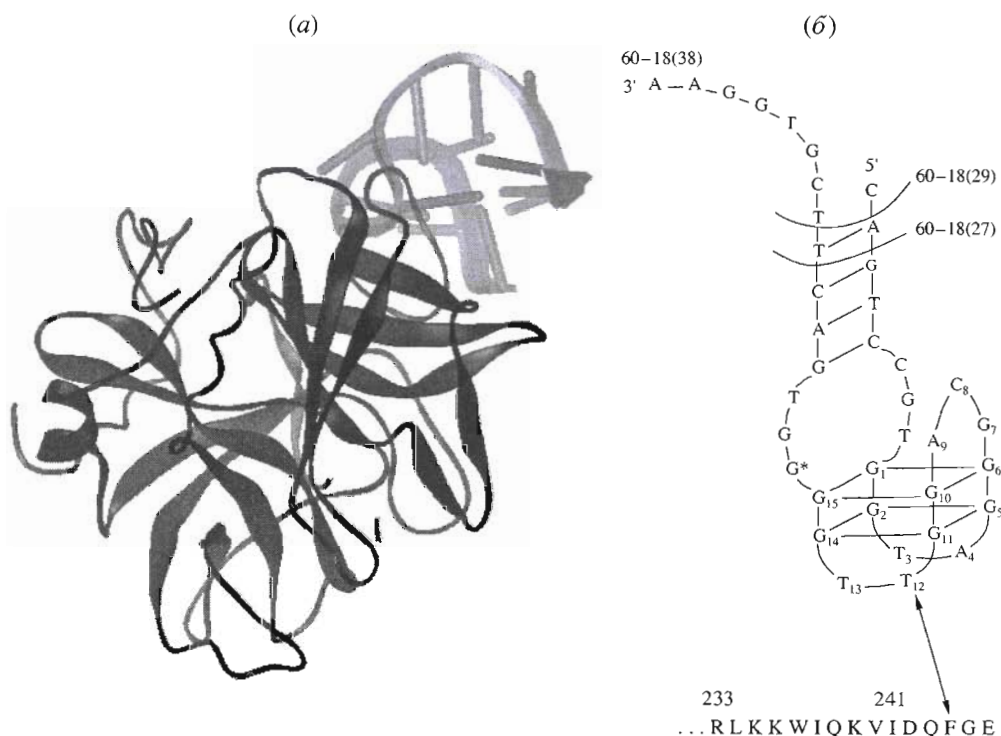


Рис. 1. Модель третичной структуры комплекса тромбин (темная лента)–аптаммерная ДНК (светлая лента) (а) и вторичная структура аптаммерной ДНК (б). Стрелкой показан контакт, установленный методом химического сшивания [18].

плексообразования, а также изучена способность аптаммера ингибировать фибриногенгидролизующую активность тромбина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексообразование препаратов тромбина с аптаммерной ДНК исследовали по стандартной методике на нитроцеллюлозных мембранах. Изо-термы связывания имеют один и тот же характер: в присутствии увеличивающегося количества тромбина доля удерживания аптаммера увеличивается (рис. 2а,б), однако выход на плато зависит как от удельной активности препарата тромбина, так и от состава среды. Например, ионы кальция не влияют на процесс комплексообразования, а в отсутствие ионов магния (обеспечивающих жесткость структуры олигомера) аптаммер плохо взаимодействует с белковыми препаратами (данные не показаны). Отсутствие ионов калия также увеличивает кажущуюся константу диссоциации (рис. 2б). Это, по-видимому, связано с тем, что ион калия стабилизирует G-квартетную структуру аптаммера. В работе [16] с помощью ЯМР были изучены подобные структуры в различных буферах и показано, что ион калия способен встраиваться в G-квартеты и стабилизировать их. Таким образом, жесткость пространственной структуры олигомера (рис. 1б) – определяющий фактор при его взаимодействии с тромбином.

Эффективность комплексообразования ДНК-аптаммера с тромбином сильно зависит и от удельной активности препарата фермента. В оптимальной для поддержания структуры аптаммера среде (рис. 2а) увеличение удельной активности препарата тромбина примерно в четыре раза (с 1200 до 4500 ед. НИН/мг) приводит почти к 30-кратному улучшению связывания ( $K_{d(\text{каж})} = 160 \pm 6.9$  и  $5.6 \pm 1.9$  нМ соответственно). В отсутствие ионов калия эта разница не так велика ( $K_{d(\text{каж})} = 273 \pm 54.3$  и  $135 \pm 27$  нМ соответственно, рис. 2б), однако более активный препарат, по-прежнему, связывается более эффективно.

Образование комплекса тромбина с аптаммерной ДНК приводит к ингибированию фибриногенгидролизующей активности фермента в модельной буферной среде (рис. 3). При этом увеличение концентрации субстрата вызывает примерно пропорциональное увеличение концентрации аптаммера, требующейся для подавления 50% исходной активности препарата фермента.

Предварительные опыты по ингибированию аптаммером свертывания плазмы крови под действием тромбина показали аналогичные результаты: с увеличением доли комплекса аптаммер–тромбин время образования фибрина увеличивалось.

В заключение необходимо подчеркнуть, что различные коммерческие препараты тромбина имели разную способность к образованию ком-

плексов с аптамерной ДНК. Показана четкая корреляция между фибриногенгидролизующей активностью тромбина и его способностью к комплексообразованию с аптамерной ДНК. Этот феномен открывает хорошие перспективы использования аптамеров в качестве ингибиторов нового типа для тромбина в клинической практике.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

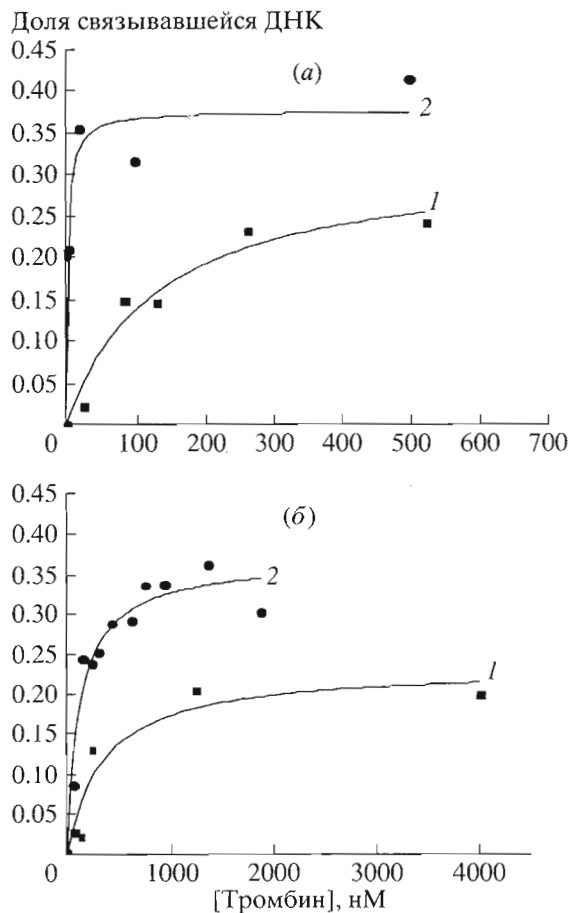
В работе использовали препараты тромбина человека с активностью 1200 ед. НИН/мг (НПО РЕНАМ, Россия) и 4500 ед. НИН/мг (Технология-стандарт, Россия), фибриноген производства фирмы “Бакпрепараты” (Литва), соли и компоненты буферных растворов марки не ниже “х. ч.”. Олигонуклеотид (аптамер) был синтезирован на автоматическом синтезаторе AP-380В. Радиоактивно меченный аптамер получали кинированием с помощью полинуклеотидкиназы с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  и последующей очисткой электрофорезом в 8% ПААГ в присутствии 8 М мочевины (удельная активность около 40 тыс. имп./мин пмоль). Радиоактивность измеряли по Черенкову, оптическое поглощение растворов аптамерной ДНК определяли при  $\lambda = 260$  нм. Растворы готовили в 20 мМ Трис-ацетатном буферном растворе рН 7.4, содержащем 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 140 мМ  $\text{NaCl}$ , 5 мМ  $\text{KCl}$  (буфер А) или 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мМ  $\text{NaCl}$  (буфер Б).

**Комплексообразование ДНК-аптамера с тромбином.** Препарат ДНК стандартно денатурировали при 90°C с последующим быстрым охлаждением во льду. Равные объемы растворов фермента и аптамера инкубировали при 37°C в течение 30 мин (время установления равновесия). Варьировали: концентрацию аптамера от 0 до 700 нМ; концентрацию тромбина от 0 до 3500 нМ; состав среды – буфер А или Б.

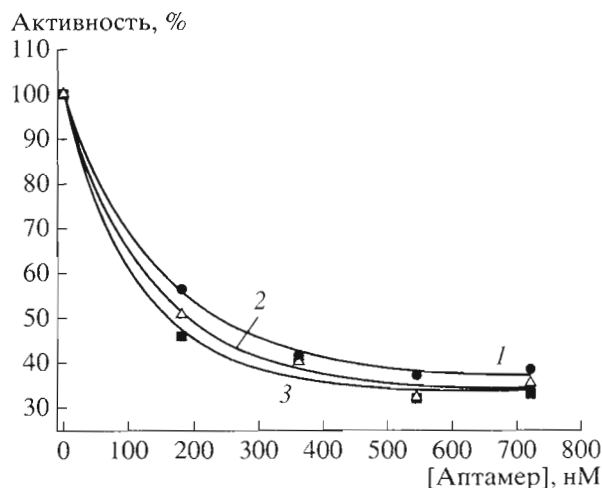
**Эффективность комплексообразования** определяли по стандартной методике фильтрованием через нитроцеллюлозные мембраны Hybond-C, 0.45 микрон (Amersham), радиоактивность мембран определяли по Черенкову.

**Для расчета кажущихся констант диссоциации** строили изотермы связывания тромбина с аптамерной ДНК. Кажущаяся константа диссоциации комплекса рассчитывалась в координатах Скетчарда.

**Активность препаратов тромбина** определяли по гидролизу фибриногена (37°C). За образованием фибрина следили с помощью коагулометра Fibrintimer (Boehring, Германия). Объем реакционной смеси составлял 200 мкл. Реакционная смесь состояла из равных объемов растворов субстрата (19–38 мкМ) и препарата фермента в буфере А.



**Рис. 2.** Изотермы связывания аптамерной ДНК с различными препаратами тромбина (1 – активность 1200 НИН ед./мг, 2 – активность 4500 НИН ед./мг) в буферах А (а) и Б (б). Концентрация аптамерной ДНК – 40.5 (1) и 27.5 нМ (2).



**Рис. 3.** Кривые ингибирования фибриногенгидролизующей активности тромбина ДНК-аптамером. Концентрация препарата тромбина с активностью 4500 НИН ед./мг – 15 нМ, концентрация субстрата – 19 (1), 30 (2) и 38 мкМ (3).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.Л. Берковского за предоставленные препараты, Н.И. Ларионову за обсуждение рукописи и ценные замечания, Т.И. Рассохина и С.И. Бессонова за помощь в оформлении статьи.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 01-04-48603, Университеты России 05.03.007, а также Международного фонда Горбачева.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O., Yarus M. // *Annu. Rev. Biochem.* 1995. V. 64. P. 763–797.
2. Gold L. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 13 581–13 584.
3. Osborne S.E., Matsumura I., Ellington A.D. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1997. V. 1. P. 5–9.
4. Копылов А.М., Спиридонова В.А., Парк К.-Х. // *Российский хим. журн.* 1998. V. 42. P. 89–96.
5. Копылов А.М., Спиридонова В.А. // *Молекулярн. биология.* 2000. V. 34. P. 1097–1113.
6. Tuerk C., Gold L. // *Science.* 1990. V. 249. P. 505–510.
7. Takeno H., Yamamoto S., Tanaka T., Sakano Y., Kikuchi Y. // *J. Biochem. (Tokyo)* 1999. V. 125. P. 1115–1119.
8. Takeno H., Tanaka T., Kikuchi Y. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1997. V. 37. P. 249–250.
9. Fukuda K., Vishnuvardhan D., Sekiya S., Hwang J., Kakiuchi N., Taira K., Shimotohno K., Kumar P.K., Nishikawa S. // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. P. 3685–3694.
10. Bless N.M., Smith D., Charlton J., Czermak B.J., Schmal H., Friedl H.P., Ward P.A. // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. P. 877–880.
11. Charlton J., Sennello J., Smith D. // *Chem. Biol.* 1997. V. 4. P. 809–816.
12. Charlton J., Kirschenheuter G.P., Smith D. // *Biochemistry* 1999. V. 36. P. 3018–3026.
13. Панченко Е.П., Добровольский А.Б. Тромбозы в кардиологии. Механизмы развития и возможности терапии. М.: Спорт и культура, 1999. С. 55–74.
14. Machovich R. *The Thrombin.* Boca Raton: CRP Press Inc., 1984. V. 1. P. 131–160.
15. Bock L.C., Griffin L.C., Latham J.A., Vermaas E.H., Toole J.J. // *Nature.* 1992. V. 355. P. 564–566.
16. Macaya R.F., Waldron J.A., Beutel B.A., Gao H., Joesten M.E., Yang M.M., Patel R., Bertelsen A.H., Cook A.F. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 4478–4492.
17. Tsiang M., Gibbs C.S., Griffin L.C., Dunn K.E., Leung L.L. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 19370–19376.
18. Tasset D.M., Kubik M.F., Steiner W. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 272. P. 688–698.

## Aptamer DNA: A New Type of Thrombin Inhibitors

V. A. Spiridonova<sup>##</sup>, E. V. Rog<sup>\*\*</sup>, T. N. Dugina<sup>\*\*\*</sup>,  
S. M. Strukova<sup>\*\*\*</sup>, and A. M. Kopylov<sup>\*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 339-3149; e-mail: spiridon@genebee.msu.su

\*Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

\*\*Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

\*\*\*Faculty of Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

The formation of complexes between various thrombin preparations and a 30-mer aptamer DNA was comparatively studied, and a correlation between the complex formation and the fibrinogen-hydrolyzing activity of thrombin was found. The aptamer DNA was shown to inhibit the fibrin formation from fibrinogen. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* aptamer DNA, fibrinogen-hydrolyzing activity, inhibitor, thrombin