

УДК 577.11

ТЕРМОДИНАМИКА И КИНЕТИКА РАЗВОРАЧИВАНИЯ АНТИПАРАЛЛЕЛЬНЫХ G-КВАДРУПЛЕКСОВ В АПТАМЕРАХ К ТРОМБИНУ

© 2022 В.А. Спиридонова, Ю.О. Наумова, П.А. Николаева,
Т.М. Новикова, Г.Я. Коломийцева*

*НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: kolom@genebee.msu.ru*

Поступила в редакцию 28.05.2022

После доработки 09.09.2022

Принята к публикации 09.09.2022

Изучен процесс разворачивания G-квадруплекса ДНК-аптамера RE31 и его комплекса с тромбином под действием флуоресцентно-меченных комплементарных олигонуклеотидов разной длины с образованием двуспиральных структур. Предполагается, что разворачивание G-квадруплекса идет через образование промежуточного комплекса с олигонуклеотидом. Кинетические и термодинамические параметры разворачивания свободного аптамера и его комплекса с тромбином различаются. Удлинение комплементарной последовательности G-квадруплекса на два нуклеотида, захватывающее так называемую «шарнирную область», практически не влияло на конформационный переход G-квадруплекса свободного аптамера, тогда как для комплекса аптамера с белком наблюдался отчетливо выраженный эффект. Наиболее вероятной причиной этих различий является индуцируемая тромбином конформационная перестройка аптамера, затрагивающая шарнирную область.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК-аптамеры, тромбин, G-квадруплекс, антидот.

DOI: 10.31857/S0320972522110021, **EDN:** LVCTQU

ВВЕДЕНИЕ

Одним из актуальных направлений молекулярной медицины является создание лекарственных препаратов на основе нуклеиновых кислот. Методом SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) отбирают эффективные синтетические олигонуклеотиды (в том числе модифицированные), обладающие высоким сродством к белковой мишени. Было показано, что полученные олигонуклеотиды, называемые аптамерами, можно использовать не только для ингибирования активности белка, но и для регулирования клеточных процессов. В последние годы данные молекулы привлекают все больше внимания исследователей, ввиду потенциальных возможностей их применения в биотехнологии и медицине, а также при решении ряда фундаментальных научных проблем молекулярной биологии.

Наиболее известны и уже основательно изучены аптамеры к тромбину, которые могут снижать его избыточную активность. Тромбин – сериновая протеиназа семейства химотрипсина, центральный белок системы свертывания крови человека и животных. Его избыточная активность может приводить к внутрисосудистому тромбообразованию, что чревато такими заболеваниями, как инсульт, инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия. Аптамеры к тромбину – это однотяжелые ДНК- или РНК-олигонуклеотиды длиной до нескольких десятков мономерных единиц, специфически связывающие белок. Они представляют собой перспективные соединения для разработки лекарственных препаратов [1, 2]. Одним из наиболее исследуемых ингибиторов тромбина является открытый еще в 1992 г. аптамер 15TVA [3], на основе которого были синтезированы аптамеры второго поколения,

Принятые сокращения: FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; 15TVA – ДНК-аптамер первого поколения; RE31 – ДНК-аптамер второго поколения.

* Адресат для корреспонденции.

включающие в свою структуру различные дополнительные олигонуклеотидные последовательности на 3'- и 5'-концах G-квадруплексов. Их взаимодействие с белками изучалось в сравнении с 15ТВА. Удачно выбранная вторичная структура некоторых из них и комплементарность дополнительных олигонуклеотидных последовательностей обеспечили высокое сродство к тромбину. Если аптамер 15ТВА уже детально исследован, то для аптамеров второго поколения, к которым относится аптамер RE31, полученная информация весьма ограничена [4, 5].

Структура комплекса аптамера RE31 с тромбином была определена методом рентгеноструктурного анализа [6]. G-Квадруплекс, образованный аптамером RE31, содержит одну петлю TGT и две петли TT, причем последние взаимодействуют с экзосайтом I тромбина. За счет этого предотвращается связывание экзосайта I с фибриногеном и рецепторами на поверхности тромбоцитов, что приводит к стимуляции тромбином образования фибрина из фибриногена и агрегации тромбоцитов [5].

Особая роль G-квадруплекса в функционировании ДНК-аптамера связана с тем, что он может как образовываться, так и разрушаться при изменении условий или под действием определенных экзогенных факторов. G-Квадруплексы отличаются высокой термодинамической стабильностью и образуются путем стэкинг-взаимодействий гуаниновых кватетов. Каждый G-кватет скреплен восемью водородными связями, образованными с Уотсон-Криковской стороны одного гуанинового основания с Хугстиновской стороной другого. За образованием и разрушением G-квадруплексов наблюдают по спектрам кругового дихроизма (КД) [7, 8], УФ-спектроскопии [9, 10], дифференциальной сканирующей калориметрии [11, 12], флуоресцентной спектроскопии (FRET) [13–16], ЯМР-спектроскопии [17, 18], рентгеноструктурным анализом (РСА) [19, 20] и др. Аптамер RE31 исследовался только спектрами КД и РСА [4, 6]. Показано, что только аптамеры, образующие G-квадруплекс, могут формировать устойчивый комплекс с тромбином [4]. Однако данных о стабильности

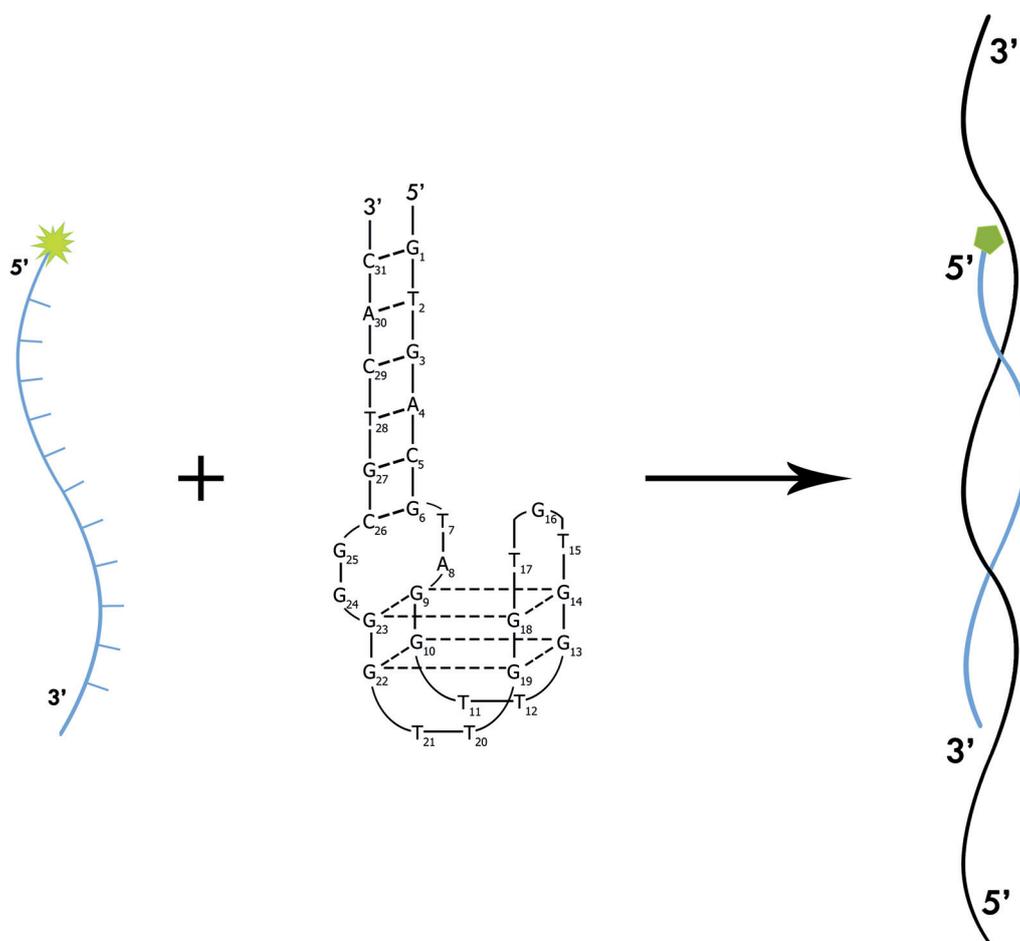


Рис. 1. Схема разворачивания аптамера RE31 несущим FAM-метку олигонуклеотидом FAMcompl15, комплементарным G-квадруплексному мотиву от G9 до G23

G-квадруплекса аптамера RE31 в комплексе с белком не так много [21].

Целью настоящего исследования стало изучение разворачивания G-квадруплексов в составе свободного аптамера RE31 и в аптамер-белковом комплексе под действием различных комплементарных олигонуклеотидов, меченных 6-карбоксивлуоресцеином (FAM) на конце. Для решения этой задачи в нашем исследовании был использован оригинальный кинетический подход, предложенный Mendoza et al. [22]. Авторы обнаружили, что связывание комплементарных олигонуклеотидов с аптамером и вызванное этим разрушение G-квадруплексной структуры приводит к параллельному уменьшению интенсивности флуоресценции FAM-метки. Считается, что тушение флуоресценции происходит из-за спаривания 2'-дезоксцитидина, несущего метку, с концевым 2'-дезоксигуанозином развернутого G-квадруплекса (рис. 1).

В нашу задачу входило определение кинетических и термодинамических параметров (ТП) реакции образования-разворачивания антипараллельного G-квадруплекса в аптамере RE31 и в его комплексе с белком тромбином под действием различных по последовательности комплементарных олигонуклеотидов.

В дальнейшем понятие «комплементарный олигонуклеотид» будет применяться ко всем флуоресцентно-меченым олигомерам, комплементарным не только G-квадруплексному мотиву, но и шарнирной зоне аптамера RE31.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 100 мкМ раствор аптамера RE31 (5'-GTGACGTAGGTTGGTGTG GTTGGGGCGTCAC-3'). В качестве олигонуклеотидов, комплементарных к разным участкам аптамера, использовали меченые 15-звенный FAMcompl15 (5'-FAM-ССААССАСА ССААСС-3') и 17-звенный FAMcompl17 (5'-FAM-ССССААССАСАССААСС-3'). FAMcompl15 полностью комплементарен только G-квадруплексному мотиву, тогда как FAMcompl17 комплементарен как G-квадруплексу, так и начальной области шарнира, соединяющего квадруплексный и дуплексный домены. Олигонуклеотиды синтезированы и предоставлены в лиофилизированном виде фирмой «Синтол», Россия.

Комплекс аптамера с тромбином готовили в объеме 50 мкл, концентрация аптамера в реакционной смеси составляла 20 мкМ. Аптамеры подвергали стандартной предварительной пробоподготовке [23]. Раствор аптамера пред-

варительно прогревали при 90 °С в течение 5 мин, затем резко охлаждали во льду и добавляли 150 мкМ тромбина. Было также показано, что тромбин не влияет на флуоресценцию комплементарного олигонуклеотида. Смесь инкубировали при 5 °С в течение 2 ч. Комплексы аптамера с тромбином были охарактеризованы с помощью электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в неденатурирующих условиях и поверхностного плазмонного резонанса.

Инкубацию проводили в среде, содержащей 20 мМ Hepes-KOH, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, pH 7,4 (буфер А) или 20 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, pH 7,2 (буфер Б). Буферы готовили при комнатной температуре (25 °С). Буфер А использовался при формировании комплексов аптамера RE31 с FAM-содержащим олигонуклеотидом. Буфер Б использовался для получения спектров кругового дихроизма.

Флуоресценция. Флуоресценцию измеряли на приборе CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия). Длины волн возбуждения и испускания флуоресценции составляли 494 и 550 нм соответственно. В ячейки планшета последовательно добавляли 100 мкл буфера А с FAM-олигонуклеотидом, последовательность которого была комплементарна образующей G-квадруплекс последовательности аптамера. Далее вносили 2 мкл раствора аптамера или 5 мкл комплекса аптамера с тромбином так, чтобы конечная концентрация аптамера в реакционной смеси составляла 2 мкМ, а концентрация FAM-олигонуклеотида – в 10 раз меньше (0,2 мкМ).

Круговой дихроизм. В качестве контроля для подтверждения присутствия G-квадруплекса в составе аптамера RE31 в условиях реакции были приготовлены 2,5 мкМ растворы аптамеров или 3 мкМ растворы комплексов аптамеров с тромбином в буфере Б. Спектры КД регистрировали при различных температурах на спектрометре Chirascan («Applied Photophysics Ltd», Англия), оснащенном термоконтроллером. Плавление производили в интервале 10–90 °С со скоростью 1 °С в мин. Спектры регистрировали каждые 5 °С в диапазоне длин волн 220–360 нм. Скорость изменения длины волны составляла 1 нм/с. Спектр буфера, не содержащего олигонуклеотида, был принят в качестве базовой линии. Величину молярного абсорбционного коэффициента в $\text{см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ рассчитывали по уравнению $\Delta\epsilon = \Delta A / (c \cdot l)$, где ΔA – разность поглощений света, регистрируемая прибором, c – концентрация (моль/литр), l – длина оптического пути в см.

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР).

Измерения проводили на оптическом биосенсоре Biosore X («GE Healthcare», США). Тромбин был иммобилизован из 100 нМ раствора через NH₂-группу на поверхности чипа Sensor Chip CM5. Проточную ячейку заполняли буфером А. Для образования белково-нуклеинового комплекса раствор аптамера (0,1–350 нМ) вводили порциями по 30 мкл со скоростью 10 мкл/мин при комнатной температуре. После добавления каждой порции аптамера ячейку промывали 10 мкл 2 М раствора NaCl. Полученные сенсограммы обрабатывали, используя пакет программ BIACOREX.

Обработка результатов. Константу скорости k для реакции первого порядка определяли из наклона графика зависимости логарифма интенсивности флуоресценции от времени. Энергию активации E_a определяли согласно уравнению Аррениуса (1) из наклона графика зависимости натурального логарифма k от обратной абсолютной температуры T . В уравнении (1) A — предэкспоненциальный множитель, R — универсальная газовая постоянная:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1)$$

Термодинамические параметры образования переходного состояния (изменения энтальпии ΔH^\ddagger и энтропии ΔS^\ddagger) были рассчитаны по уравнению Эйринга (2):

$$k = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (2)$$

преобразованного в логарифмическую форму (3):

$$\frac{\ln k}{T} = \frac{\ln k_B}{h} - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

где k_B — постоянная Больцмана, h — постоянная Планка. Значения ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger получали из наклона графика линейной зависимости логарифма k/T от $1/T$ и отсекаемого им на оси ординат отрезка. Линейную регрессию проводили в программе «Microsoft Excel».

Для построения рисунков использовали программу «OriginPro 8.5».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены вторичные структуры наиболее известного аптамера 15ТВА и аптамера второго поколения RE31 к тромбину. Нуклеотидный мотив G9–G23 аптамера RE31 способен складываться в G-квадруплекс, который соединен шарнирной областью из четырех

нуклеотидов T7, A8, G24 и G25 с дуплексным районом из шести пар нуклеотидов.

Методом КД была подтверждена топология G-квадруплексов, образуемых изучаемыми аптамерами. На рис. 3 приведены контрольные эксперименты с использованием КД, которые показали, что в составе ДНК аптамеров присутствует G-квадруплекс. Спектры КД аптамеров представлены в широком диапазоне температур в буфере Б. Два положительных пика при 240 нм и 295 нм и один отрицательный пик при 260 нм свидетельствуют об образовании антипараллельного G-квадруплекса [7]. С повышением температуры интенсивность пика при 295 нм падает, что свидетельствует о термическом разрушении квадруплексной структуры. Температуры плавления ($T_{пл}$) G-квадруплексов составили 35 °С для 15ТВА и 39,5 °С — для RE31. Большая величина $T_{пл}$ для RE31 объясняется наличием дополнительной двутяжевой последовательности, обнаруженной методами рентгеноструктурного анализа [6], УФ-спектроскопии и КД [4]. Наличие изобестической точки при 280 нм в спектре КД при плавлении аптамеров подтверждает, что процесс термической денатурации (по крайней мере в первом приближении) может быть рассмотрен как смещение равновесия между структурированной и развернутой формами аптамера.

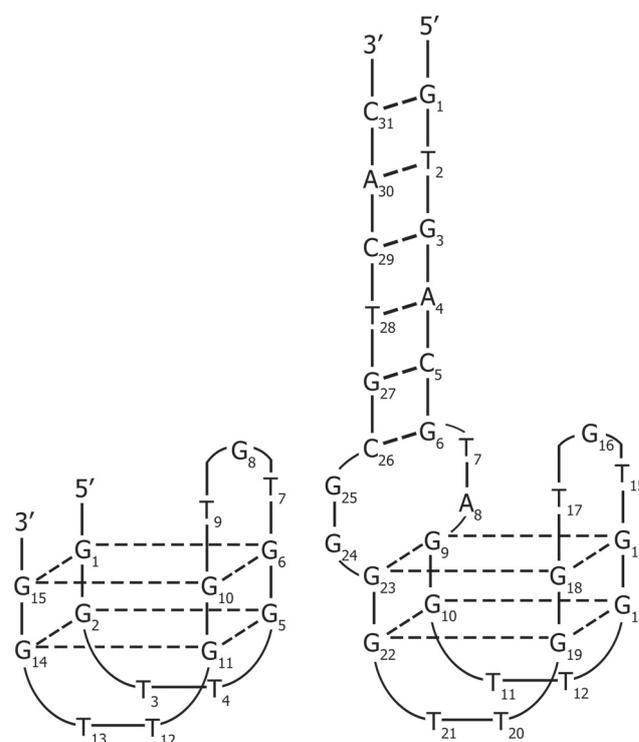


Рис. 2. Вторичная структура аптамеров 15ТВА (слева) и RE31 (справа). G-Квадруплекс 15ТВА: G1–G15; G-квадруплекс RE31: G9–G23

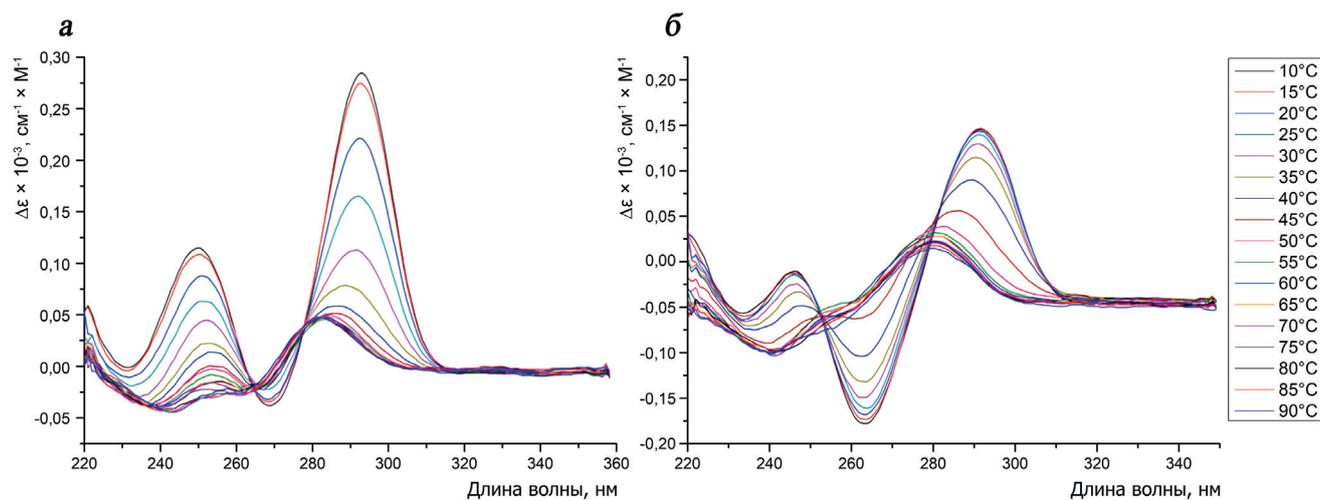


Рис. 3. Спектры КД аптамеров при разных температурах в буфере Б: а – аптамер 15TVA; б – аптамер RE31

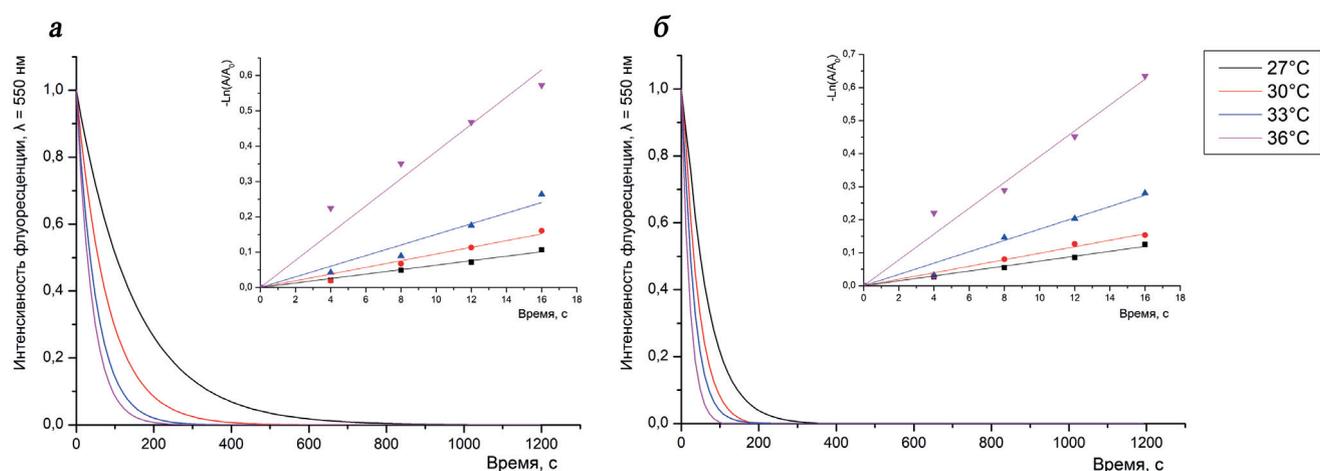


Рис. 4. Кинетика изменения интенсивности флуоресценции комплементарных олигонуклеотидов FAMcomp115 (а) и FAMcomp17 (б) при взаимодействии с аптамером RE31 при четырех температурах. Во врезке представлены данные в полулогарифмических координатах

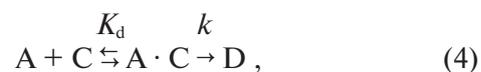
На основании данных КД описанные ниже кинетические измерения проводили при температурах 27, 30, 33 и 36 °С, при которых денатурация не превышала 10%. Это важно, поскольку взаимодействие одностратного олигонуклеотида с денатурированной ДНК происходит мгновенно, что могло сказаться на начальной интенсивности флуоресценции и привести к ошибкам. Кроме того, температура 36 °С является предельной физиологической температурой для теплокровных животных, что приближает наши эксперименты и сделанные на их основании выводы к условиям *in vivo*.

Взаимодействие комплементарных олигонуклеотидов со свободными аптамерами. При инкубации аптамеров с несущими флуоресцентную метку 15-звенным олигонуклеотидом, комплементарным образующему G-квадруплекс мотиву, и 17-звенным олигомером, взаимодействующим также с двумя нуклеотидами шарнирной последовательности аптамера, на-

блюдалось падение интенсивности флуоресценции во времени (рис. 4).

Из рисунка следует, что обе комплементарные последовательности действительно разрушают G-квадруплекс (наблюдается тушение флуоресценции), причем скорость этой реакции для обоих G-квадруплексов возрастает с увеличением температуры.

Экспериментальные кривые рис. 4 были обработаны в соответствии со схемой реакции, предполагающей разворачивание G-квадруплекса через образование промежуточного комплекса:



где А – аптамер, С – комплементарный олигонуклеотид, А · С – промежуточный комплекс, D – дуплекс, K_d – константа равновесия, k – константа скорости реакции превращения промежуточного продукта в дуплекс.

Таблица 1. Значения констант скоростей реакций разрушения G-квадруплекса модифицированными FAM-меткой комплементарными олигонуклеотидами в буфере А

Компоненты реакции	$k \times 10^3, \text{c}^{-1}$			
	27 °C	30 °C	33 °C	36 °C
RE31 + FAMcomp115	6,6 ± 0,2	10,4 ± 0,2	16,5 ± 0,5	34,7 ± 0,5
RE31 + FAMcomp117	7,7 ± 0,2	10,1 ± 0,3	18,3 ± 0,6	37,5 ± 0,3
RE31 + FAMcomp115/тромбин	6,1 ± 0,2	11,5 ± 0,2	15,5 ± 0,5	15,1 ± 0,4
RE31 + FAMcomp117/тромбин	10,7 ± 0,3	17,9 ± 0,2	21,1 ± 0,3	34,0 ± 0,2

Данная схема основана на том, что разворачивание G-квадруплексов в отличие от дуплексов практически всегда происходит с образованием квазиравновесных промежуточных метастабильных структур [24, 25]. В рамках этой схемы зависимость измеряемой константы скорости превращения G-квадруплекса в дуплекс (k_{app}) от концентрации А имеет вид:

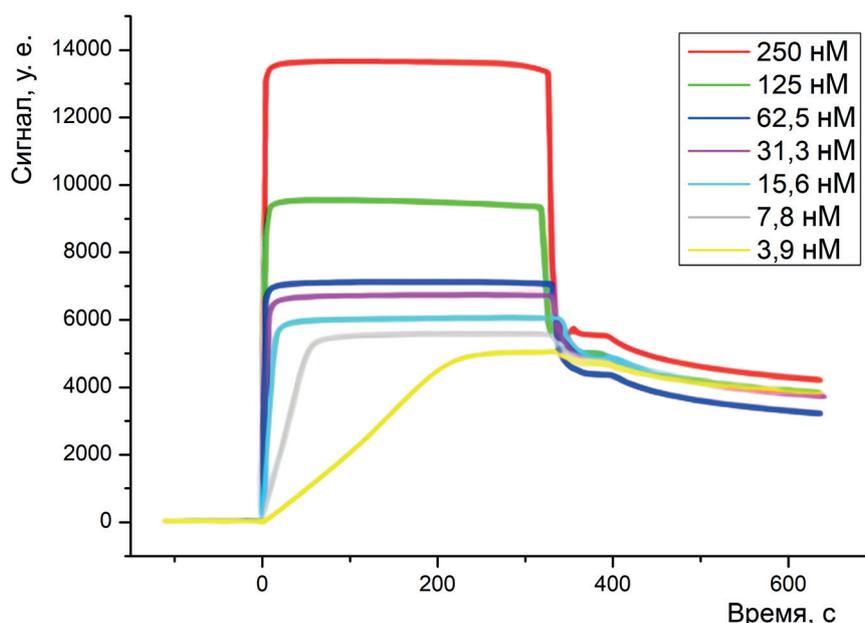
$$k_{\text{app}} = k / (1 + K_d / [A]). \quad (5)$$

Отсутствие зависимости k_{app} от концентрации аптамера при $[A] \geq 2$ мкМ (данные не приведены) означало, что эти концентрации являются насыщающими, то есть существенно превышают K_d , вследствие чего практически весь олигонуклеотид связан с аптамером и измеряемая величина k_{app} в пределах ошибки определения совпадает с величиной k .

В табл. 1 приведены значения констант скоростей реакций двух комплементарных

олигонуклеотидов с аптамером RE31. Все эксперименты проводили при концентрации ионов калия 5 мМ, которая, по литературным данным, является оптимальной для реакций разворачивания G-квадруплекса [22]. Видно, что введение двух дополнительных нуклеотидов в комплементарный олигонуклеотид слабо влияло на константу скорости во всем диапазоне температур.

Взаимодействие комплементарных олигонуклеотидов с комплексами аптамер–тромбин. С помощью контрольных экспериментов, таких как электрофорез в ПААГ [23] и методом поверхностного плазмонного резонанса (рис. 5), было подтверждено образование комплексов аптамер RE31–тромбин в реакционной смеси. Рассчитанная из сенсограмм константа диссоциации (K_d) для комплекса аптамера RE31 с тромбином составила 0,56 нМ [21]. Такое низкое значение K_d позволяет считать, что весь аптамер связан с тромбином в присут-

**Рис. 5.** Сенсограммы образования комплекса тромбин–аптамер RE31 при указанных на рисунке концентрациях тромбина. Температура – 25 °C

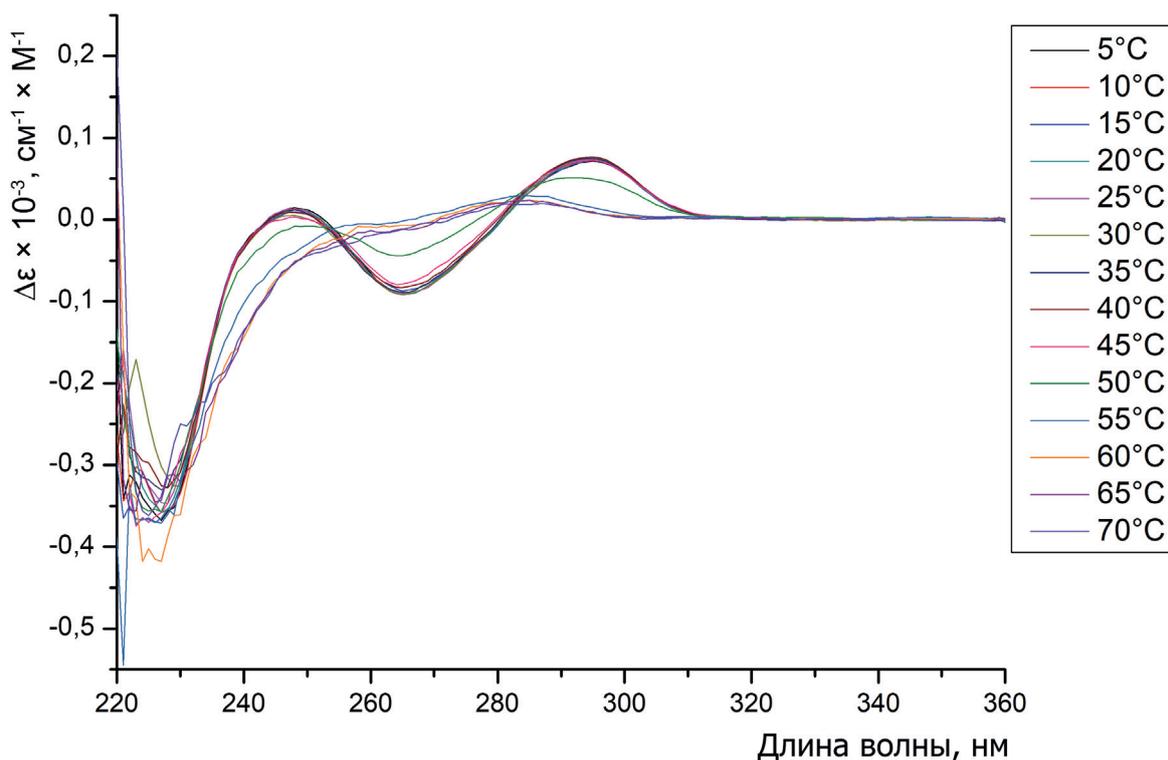


Рис. 6. Спектры КД аптамера RE31 в комплексе с тромбином при разных температурах

ствии избытка белка при получении белкового комплекса, и реакция с комплементарным олигонуклеотидом может идти только с комплексом G-квадруплекса и тромбина.

Использование метода КД дополнительно подтвердило как образование комплекса тромбин–аптамер, так и наличие G-квадруплекса в составе комплексов. На рис. 6 впервые представлены спектры КД аптамера RE31 в комплексе с тромбином при различных температурах. Интенсивность полосы при 295 нм (характерной для антипараллельного G-квадруплекса) резко падает по сравнению с индивидуальным аптамером, что подтверждает влияние тромбина на данную структуру.

Этот вывод подтвердился при анализе кинетики падения флуоресценции в опытах, аналогичных проиллюстрированным на рис. 4: наблюдали существенные, хотя и небольшие

различия в константах скорости для связанного и не связанного с тромбином аптамера (табл. 1). Повышение температуры и в этом случае увеличивало скорость реакций. Сравнение констант скоростей для разных комплементарных олигонуклеотидов однозначно свидетельствовало о том, что реакция аптамера RE31 с FAMcomp17 протекает быстрее, чем с FAMcomp15 при всех температурах.

Контрольные эксперименты показали, что при отсутствии аптамеров флуоресценция FAM-меченного олигонуклеотида не меняется ни от времени наблюдения, ни от температуры, ни от присутствия только белка, ни от концентрации комплементарной последовательности в диапазоне 1–10 мкМ.

Сравнение этих констант скоростей для двух отличающихся комплементарных олигонуклеотидных последовательностей одно-

Таблица 2. Значения термодинамических параметров реакции превращения промежуточных продуктов для свободного аптамера RE31 и в комплексе с тромбином в буфере А

Компоненты реакции	E_a , кДж/моль	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , кДж/(моль·К)
RE31 + FAMcomp15	$139,5 \pm 7,9$	$136,9 \pm 8,1$	$-0,7 \pm 0,2$
RE31 + FAMcomp17	$136,9 \pm 8,2$	$134,4 \pm 8,6$	$-0,7 \pm 0,3$
RE31 + FAMcomp15/тромбин	$78,0 \pm 9,1$	$75,5 \pm 9,3$	$-0,5 \pm 0,4$
RE31 + FAMcomp17/тромбин	$93,2 \pm 9,5$	$90,7 \pm 9,4$	$-0,6 \pm 0,4$

значно свидетельствует о том, что реакция аптамера RE31 с FAMcompl17 протекает с более высокими константами, чем с FAMcompl15 при всех температурах. И при этом существуют явные, хотя и не столь выраженные, отличия от констант для реакций со свободным аптамером.

Константы скорости реакции при разных температурах использовали для расчета энергии активации Аррениуса (E_a) для превращения промежуточного комплекса в энергетически устойчивый дуплекс, а также изменения энтальпии и энтропии активации. Найденные значения приведены в табл. 2.

Рассматривая реакции разворачивания G-квадруплекса через образование метастабильного промежуточного комплекса, отмечаем, что в случае белкового комплекса энергетический барьер, требующийся для достижения переходного состояния реакций разворачивания, выше для FAMcompl17, чем для FAMcompl15. К такому же выводу можно прийти и относительно ΔH^\ddagger промежуточных комплексов. Из сравнения реакции разворачивания свободного аптамера с реакцией разворачивания его комплекса с тромбином значения первых оказались существенно выше для E_a и ΔH^\ddagger (табл. 2).

Как следует из полученных нами результатов, инкубация как свободного аптамера RE31, так и его комплекса с тромбином с флуоресцентно-мечеными комплементарными последовательностями FAMcompl17 и FAMcompl15 сопровождается уменьшением флуоресценции, свидетельствующим о разворачивании G-квадруплексов и превращении их в дуплексы. Удовлетворительное фиттирование экспериментальных кривых для реакции первого порядка для RE31 подтверждает высказанное Mendoza et al. [15] для ряда аптамеров предположение, что реакция разворачивания квадруплекса идет через образование промежуточных продуктов, распад которых и является скоростью-определяющей стадией.

Если для G-квадруплексов с одонитчатым привеском с 5'-конца Mendoza et al. [15] достаточно убедительно доказали, что реакция разворачивания комплементарной олигонуклеотидной последовательности двухстадийная, то для структур без одонитчатой добавки механизм разворачивания менее ясен. Авторы полагают, что образование интермедиата имеет место и в этом случае, то есть сначала происходит локальное взаимодействие комплементарной последовательности, такое, как образование пар через частичное перекрытие G-квадруплекса комплементом. Это и будет первичный

промежуточный продукт в реакции разворачивания. Термодинамическое описание интермедиатов в различных системах позволяет предполагать некоторые их особенности.

В наших экспериментах, в отличие от работы Mendoza et al. [15], менялась длина комплементарной последовательности, используемой для разворачивания G-квадруплекса, без изменений в последовательности самого аптамера. Интересно заметить, что если для свободного аптамера RE31 значения констант и ТП переходных промежуточных продуктов практически совпали для обоих комплементарных олигонуклеотидов, то для комплекса с белком кинетические и термодинамические параметры отличаются как между собой, так и от данных для свободных аптамеров.

Возможно, в свободном аптамере RE31 шарнирная область оказалась недоступной, и расширение области комплементарности на два нуклеотида не сказалось на эффективности реакции, но связывание белка изменило ее положение и сделало возможным и выгодным взаимодействие с более длинной олигонуклеотидной последовательностью. Образовался измененный промежуточный продукт. Что касается свободного аптамера, промежуточный продукт, скорее всего, образуется непосредственно исключительно с G-квадруплексом.

Обращает на себя внимание разница в значениях энергии активации. Энергетический барьер для превращения G-квадруплекса в составе белкового комплекса оказывается ниже, чем для свободного аптамера, хотя определяемые значения констант скоростей находятся выше для случая с FAMcompl17. Это обстоятельство может быть вызвано тем, что общая схема реакции с белковым комплексом гораздо сложнее, чем использованная нами, а определяемая константа скорости является кажущейся, а не истинной.

Таким образом, полученные результаты указывают на важность структурного соответствия во взаимодействии аптамера RE31 с комплементарными олигонуклеотидами FAMcompl15 и FAMcompl17 для последующего разворачивания G-квадруплекса.

Вклад авторов. В.А. Спиридонова – концепция и руководство работой, написание текста; Ю.О. Наумова – проведение экспериментов по измерению флуоресценции, обработка результатов, подготовка текста статьи и рисунков; П.А. Николаева – проведение экспериментов КД и ППР; Т.М. Новикова – подготовка комплексов аптамера, проведение пробоподготовки; Г.Я. Коломийцева – руко-

водство работой, расчет термодинамических параметров и констант, написание текста.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Keefe, A. D., Pai, S., and Ellington, A. (2010) Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 537-550, doi: 10.1038/nrd3141.
- Tan, S. Y., Acquah, C., Sidhu, A., Ongkudon, C. M., Yon, L. S., et al. (2016) SELEX modifications and bioanalytical techniques for aptamer–target binding characterization, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **46**, 521-537, doi: 10.1080/10408347.2016.1157014.
- Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., and Toole, J. J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature*, **355**, 564-566, doi: 10.1038/355564a0.
- Dolinnaya, N. G., Yuminova, A. V., Spiridonova, V. A., Arutyunyan, A. M., and Kopylov, A. M. (2012) Coexistence of G-quadruplex and duplex domains within the secondary structure of 31-mer DNA thrombin-binding aptamer, *J. Biomol. Struct. Dynamics*, **30**, 524-531, doi: 10.1080/07391102.2012.687518.
- Spiridonova, V. A., Novikova, T. M., Sizov, V. A., Shashkovskaya, V. S., Titaeva, E. V., et al. (2019) DNA aptamers to thrombin exosite I. structure-function relationships and antithrombotic effects, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1521-1528, doi: 10.1134/S0006297919120113.
- Russo Krauss, I., Spiridonova, V., Pica, A., Napolitano, V., and Sica, F. (2016) Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 983-991, doi: 10.1093/nar/gkv1384.
- Vorlickova, M., Kejnovska, I., Sagi, J., Renciuik, D., Bednarova, K., et al. (2012) Circular dichroism and guanine quadruplexes, *Methods*, **57**, 64-75, doi: 10.1016/j.jymeth.2012.03.011.
- Olsen, C. M., and Marky, L. A. (2010) Monitoring the temperature unfolding of G-quadruplexes by UV and circular dichroism spectroscopies and calorimetry techniques, *Methods Mol. Biol.*, **608**, 147-158, doi: 10.1007/978-1-59745-363-9_10.
- Karsisiotis, A. I., Hessari, N. M., Novellino, E., Spada, G. P., Randazzo, A., et al. (2011) Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **50**, 10645-10648, doi: 10.1002/anie.201105193.
- Tran, P. L., Mergny, J. L., and Alberti, P. (2011) Stability of telomeric G-quadruplexes, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3282-3294, doi: 10.1093/nar/gkq1292.
- Shek, Y. L., Noudeh, G. D., Nazari, M., Heerklotz, H., Abu-Ghazalah, R. M., et al. (2014) Folding thermo-dynamics of the hybrid-1 type intramolecular human telomeric G-quadruplex, *Biopolymers*, **101**, 216-227, doi: 10.1002/bip.22317.
- Petraccone, L., Spink, C., Trent, J. O., Garbett, N. C., Mekmaysy, C. S., et al. (2011) Structure and stability of higher-order human telomeric quadruplexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 20951-20961, doi: 10.1021/ja209192a.
- De Rache, A., and Mergny, J. L. (2015) Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay, *Biochimie*, **115**, 194-202, doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.002.
- Kwok, C. K., Sherlock, M. E., and Bevilacqua, P. C. (2013) Effect of loop sequence and loop length on the intrinsic fluorescence of G-quadruplexes, *Biochemistry*, **52**, 3019-3021, doi: 10.1021/bi400139e.
- Mendoza, O., Gueddouda, N. M., Boule, J. B., Bourdoncle, A., and Mergny, J. L. (2015) A fluorescence-based helicase assay: application to the screening of G-quadruplex ligands, *Nucleic Acids Res.*, **43**, e71, doi: 10.1093/nar/gkv193.
- Kreig, A., Calvert, J., Sanoica, J., Cullum, E., Tipanna, R., et al. (2015) G-quadruplex formation in double strand DNA probed by NMM and CV fluorescence, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 7961-7970, doi: 10.1093/nar/gkv749.
- Adrian, M., Heddi, B., and Phan, A. T. (2012) NMR spectroscopy of G-quadruplexes, *Methods*, **57**, 11-24, doi: 10.1016/j.jymeth.2012.05.003.
- Lim, K. W., Ng, V. C., Martin-Pintado, N., Heddi, B., and Phan, A. T. (2013) Structure of the human telomere in Na⁺ solution: an antiparallel (2+2) G-quadruplex scaffold reveals additional diversity, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10556-10562, doi: 10.1093/nar/gkt771.
- Russo Krauss, I., Pica, A., Merlino, A., Mazzarella, L., and Sica, F. (2013) Duplex-quadruplex motifs in a peculiar structural organization cooperatively contribute to thrombin binding of a DNA aptamer, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 2403-2411, doi: 10.1107/S0907444913022269.
- Troisi, R., Napolitano, V., Spiridonova, V., Russo Krauss, I., and Sica, F. (2018) Several structural motifs cooperate in determining the highly effective anti-thrombin activity of NU172 aptamer, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 12177-12185, doi: 10.1093/nar/gky990.
- Spiridonova, V. A., Barinova, K. V., Glinkina, K. A., Melnichuk, A. V., Gainutdinov, A. A., et al. (2015) A family of DNA aptamers with varied duplex region length that forms complexes with thrombin and prothrombin, *FEBS Lett.*, **589**, 2043-2049, doi: 10.1016/j.febslet.2015.06.020.

22. Mendoza, O., Elezgaray, J., and Mergny, J. (2015) Kinetics of quadruplex to duplex conversion, *Biochimie*, **118**, 225-233, doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.031.
23. Spiridonova, V. A., Glinkina, K. A., Gainutdinov, A. A., and Arutyunyan, A. M. (2014) Production of thrombin complexes with DNA aptamers containing G-quadruplex and different duplexes, *J. Nephrol. Ther.*, **4**, 149-154, doi: 10.4172/2161-0959.1000149.
24. Hardin, C. C., Perry, A. G., and White, K. (2000) Thermodynamic and kinetic characterization of the dissociation and assembly of quadruplex nucleic acids, *Biopolymers*, **56**, 147-194, doi: 10.1002/1097-0282(2000/2001)56:3<147::AID-BIP10011>3.0.CO;2-N.
25. Bončina, M., Lah, J., Prislan, I., and Vesnaver, G. (2012) Energetic basis of human telomeric DNA folding into G-quadruplex structures, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9657-9663, doi: 10.1021/ja300605n.

THERMODYNAMICS AND UNFOLDING KINETICS OF ANTIPARALLEL G-QUADRUPLEXES IN APTAMERS TO THROMBIN

V. A. Spiridonova, Yu. O. Naumova, P. A. Nikolaeva,
T. M. Novikova, and G. Ya. Kolomijtseva*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: kolom@belozersky.msu.ru*

The process G-quadruplex unfolding of RE31 DNA-aptamer and its complex with thrombin by fluorescently labeled complementary oligonucleotides of varying length and entailing the formation of double-helix structures has been studied. G-quadruplex unfolding has been suggested to involve the formation of an intermediate complex with the oligonucleotide. Kinetic and thermodynamic parameters of the unfolding of the free aptamer and its complex with thrombin differ. Two nucleotide elongation of the complementary G-quadruplex sequence, capturing the so-called "hinge region", had little impact on the conformational transition of G-quadruplex of the free aptamer. However, for the aptamer-protein complex a pronounced effect has been observed. The most probable cause for these differences is thrombin-induced aptamer conformational transition involving the hinge region.

Keywords: DNA-aptamers, thrombin, G-quadruplex, antidote