
САМООРГАНИЗУЮЩИЕСЯ
СТРУКТУРЫ И НАНОСБОРКИ

УДК 541.6+544.1

**РАЦИОНАЛЬНАЯ ОПТИМИЗАЦИЯ АПТАМЕРА, СПЕЦИФИЧНОГО
К ПОВЕРХНОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК ЛЕГКОГО,
С ПОМОЩЬЮ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ
И МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ**

© 2024 г. П. В. Артющенко^{1,3}, И. А. Щугорева^{1,3}, О. С. Коловская^{1,3}, А. В. Рогова^{1,3},
Р. В. Морячков¹, В. Н. Заблуда^{1,2}, Т. Н. Замай^{1,3,*}, А. В. Крат^{3,4}, Р. А. Зуков^{3,4}, Ф. Н. Томилин^{1,2},
А. С. Кичкайло^{1,3}

¹Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук”, Красноярск, Россия

²Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, Красноярск, Россия

³Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого,
Красноярск, Россия

⁴Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского,
Красноярск, Россия

*E-mail: annazamay@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.12.2023 г.

После доработки 02.04.2024 г.

Принята к публикации 09.04.2024 г.

Аптамеры, короткие олигонуклеотиды, способны к высокоаффинному связыванию с мишенями благодаря уникальной структуре. Укорочение аптамера с сохранением активного центра позволит увеличить аффинность и снизить стоимость синтеза. На примере аптамера LC-224 апробирован способ рациональной оптимизации его длины и проверки правомерности разработанного подхода. Применение компьютерного моделирования и метода малоуглового рентгеновского рассеяния показало возможность оптимизации структуры аптамера путем удаления нуклеотидов, не принимающих участия в связывании с мишенью. Показано, что усечение аптамера не снижает аффинность и специфичность ДНК-аптамера. Таким образом, теоретические и экспериментальные исследования продемонстрировали успешный опыт оптимизации структуры ДНК-аптамера путем его укорочения без нарушения его аффинности и специфичности к своей мишени.

DOI: 10.56304/S1992722323601106

ВВЕДЕНИЕ

Аптамеры — это однопепчатые ДНК или РНК, которые способны связываться с высокой аффинностью и специфичностью с различными мишенями благодаря образованию уникальной трехмерной структуры [1]. Обычно они состоят из 15–100 нуклеотидов, хотя не все основания участвуют во взаимодействии с мишенями [2, 3], крайне важно определить и укоротить несущественные участки нуклеотидной последовательности. Сохранение только важных нуклеотидов позволяет значительно повысить аффинность и селективность связывания, а также снизить стоимость синтеза аптамера [4]. Таким образом, усечение аптамеров является очень востребованной процедурой. В большинстве случаев усечение проводится на основе эмпирического метода проб и ошибок, что приводит к длинной цепочке экспе-

риментов. Замена некоторых экспериментальных этапов проектирования аптамеров на совместное применение метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и молекулярного моделирования может повысить эффективность разработки лекарственных препаратов на основе олигонуклеотидов.

МУРР используется для определения пространственной структуры белков и пептидов, коротких ДНК, РНК и других биологических объектов в диапазоне от 2 до 1000 нм в исходном состоянии [5, 6]. Данный метод позволяет получить информацию о линейных размерах, молекулярной массе, объеме и пространственной форме молекул, а в сочетании с молекулярным моделированием определить атомную структуру молекул. Так, совместное применение компьютерного моделирования и МУРР активно применяется для

изучения структуры таких соединений, как аптамеры [7].

Цель данной работы — определение вторичной и третичной структур ДНК-аптамера LC-224 и усечение его нуклеотидной последовательности на основе данных МУРР и компьютерного моделирования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярное моделирование. Аптамер LC-224, аффинный и специфичный биомаркером аденокарциномы легкого к послеоперационным тканям, был получен авторами данной работы с помощью технологии cell-SELEX и описан в [8]. Как для полноразмерного аптамера LC-224, так и для его укороченной версии LC-224t на основе данных о нуклеотидной последовательности проводили построение вторичных структур не только в программе mFold, но и в программе OligoAnalyzer [9]. Обе программы выдавали одинаковые модели возможных вторичных структур. Третичные структуры аптамеров смоделированы с помощью программ SimRNA [10] и VMD [11]. Расчеты молекулярной динамики (МД) выполнены в программном пакете GROMACS 2018.8 [12] с силовым полем Amber14sb [13] и моделью воды TIP3P [14]. Аптамеры сольватированы в кубическом боксе. В полученные ячейки вводили ионы Na^+ для нейтрализации отрицательного заряда аптамеров, а также дополнительные ионы Na^+ и Cl^- в качестве фонового электролита до концентрации 0.15 М. Расчеты МД продолжительностью 200 нс были выполнены с NPT-ансамблем (при постоянном числе частиц N , давлении P и температуре T) при температуре 310 К и давлении 1 атм с использованием термостата Берендсена и баростата Паринелло—Рамана. Для полученных МД-траекторий выполнен кластерный анализ в программе VMD. Расчеты МД проведены на суперкомпьютере Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН (МСЦ РАН).

Малоугловое рентгеновское рассеяние. Данные МУРР были получены на специализированной станции P12 BioSAXS Европейской лаборатории молекулярного моделирования (EMBL) на накопительном кольце Petra III синхротрона DESY, Гамбург, Германия.

Образец ДНК-аптамера LC-224t в растворе PBS приготовили в объеме 100 мкл с концентрацией 10 мг/мл, нагрели раствор до температуры 90°C и охладили до 5°C для приведения конформации молекулы аптамера в наиболее энергетически выгодную форму. Далее раствор поместили в систему эксклюзионной жидкостной хроматографии, совмещенной с установкой МУРР в режиме SEC-SAXS (Size-Exclusion Chromatography and Small-Angle X-ray Scattering) для того, чтобы

исключить влияние образовавшихся в растворе олигомеров и агрегатов. Для хроматографии использовали прибор Agilent 1260 Infinity с хроматографической колонкой GE Superdex 75 Increase 10/300. После прохождения колонки раствор с образцом помещали непосредственно под рентгеновский пучок синхротронного излучения с длиной волны 0.124 нм, что соответствует энергии излучения 10 кэВ. Каждую экспозицию проводили с одnoseкундными выдержками при температуре 20°C в проточном режиме. Было собрано 3600 кадров с детектора Dectris Pilatus 6M в диапазоне углов рассеяния $s = 0.2\text{--}6.0 \text{ nm}^{-1}$ за 1 ч эксперимента.

Для обработки и анализа данных использовали программы из пакета ATSAS. В программе CHROMIXS был проведен анализ хроматограммы и получен график МУРР, используемый при дальнейшей обработке. В программе PRIMUS [16] проведены расчеты размера и объема молекулы, радиуса инерции R_g , построена парная функция распределения по расстояниям $p(r)$. В программе DAMMIN построена форма общей электронной плотности молекулы в виде шариковой модели. В программе CRYSol провели сравнение теоретически рассчитанного сигнала МУРР от молекулярной модели аптамера с экспериментальными данными.

Анализ аффинности и специфичности с помощью проточной цитометрии. Работу с человеческими образцами проводили с разрешения Локального этического комитета КГБУЗ “Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского (Выписка № 6 из протокола заседания № 55 от 28 декабря 2022 г.). Послеоперационные материалы помещали в питательную среду с антибиотиком и в течение 2 ч с момента взятия тканей проводили исследование. Послеоперационные ткани рака легкого и относительно здоровой прилегающей ткани измельчали, пропускали через фильтры с размером ячейки 80 мкм. Исследование аффинности и специфичности аптамеров к послеоперационным тканям рака легких проводили на проточном цитометре Beckman Coulter Cytomics FC 500. Для анализа брали меченые FAM аптамеры LC-224 и LC-224t в концентрации 100 нМ, для контроля использовали аптамер, неспецифичный к ткани рака легкого. Оценку степени флуоресценции аптамеров, связавшихся с мишенью, проводили относительно собственной базовой флуоресценции интактных клеток без аптамеров. Пробы готовили следующим образом: клетки инкубировали с 1 мг/мл маскирующей РНК из пекарских дрожжей (Yeast RNA, Sigma-Aldrich, USA) в течение 20 мин, после чего их отмывали с помощью цен-

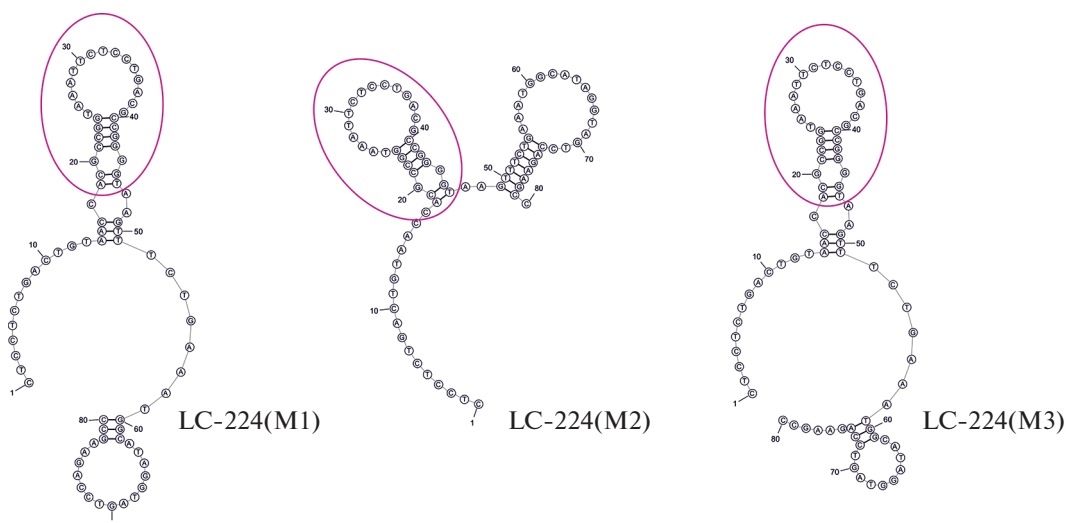


Рис. 1. Варианты вторичной структуры аптамера LC-224, полученные с помощью программы mFold.

трифугирования. Далее клетки инкубировали с аптамерами в течение 30 мин на шейкере при комнатной температуре, затем отмывали от не-связавшихся олигонуклеотидов.

Долю мишеней, связавшихся с аптамерами, определяли по флуоресценции аптамеров в зеленой области спектра на проточном цитометре. Флуоресценцию интактных клеток принимали за нулевой уровень. Истинной флуоресценцией аптамеров, связанных с клетками, считали события выше нулевого уровня флуоресценции. Анализ данных осуществляли с помощью стандартной коммерческой программы для обработки данных проточной цитометрии программы Kaluza 2.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Вторичную структуру аптамера LC-224 получили с помощью веб-сервера mFold. Три возможных варианта сворачивания последовательности LC-224 представлены на рис. 1.

Как можно видеть, во всех вариантах вторичной структуры аптамера имеется повторяющийся мотив, образованный нуклеотидами с 14-го по 46-й. Остальная часть нуклеотидной последовательности, с 47-го по 80-й нуклеотид, может образовывать разные структурные мотивы. Укорачивание последовательности аптамера LC-224 было сделано таким образом, чтобы структура укороченного аптамера совпадала с соответствующим фрагментом полноразмерного аптамера. Новый укороченный аптамер LC-224t включал в себя участок с 11-го по 50-й нуклеотид исходного аптамера LC-224. Для аптамера LC-224t с помощью программы mFold смоделировали три возможные

вторичные структуры, в целом повторяющие структуру соответствующей части аптамера LC-224 (рис. 2).

Аптамер LC-224t синтезировали, а его структуру исследовали в растворе методом МУРР. С помощью режима SEC-SAXS получен мономерный раствор, с которым провели измерения МУРР. В результате получили следующие структурные характеристики молекулы: радиус инерции $R_g = 2.3$ нм, максимальный размер молекулы $D_{max} = 8.5$ нм, объем молекулы $V_p = 18.4$ нм³, что соответствует молекулярной массе $M_w = 12.5$ – 14.2 кДа (исходя из разных оценок). Так как ожидаемая молекулярная масса молекулы составляет 12.3 кДа, считаем, что в растворе образец находился в мономерном состоянии. На основе полученных данных построили шариковую структуру (рис. 3).

С помощью методов молекулярного моделирования установили, какая из возможных моделей вторичной структуры соответствует структуре аптамера LC-224t в растворе. Для трех возможных вторичных структур аптамера LC-224t были построены соответствующие трехмерные модели, для которых далее выполнены расчеты МД продолжительностью 200 нс. Третичные структуры аптамера LC-224t, полученные в результате кластерного анализа МД-траекторий, представлены на рис. 3. Путем сопоставления моделей аптамера LC-224t с данными МУРР установлено, что модель LC-224t(M2) имеет лучшее соответствие с формой аптамера в растворе. Значение невязки между экспериментальными данными МУРР и теоретически рассчитанным сигналом от данной модели оказалось минимальным, $\chi^2 = 2.176$. Вторичная структура, на основе которой была построена модель LC-224t(M2), полностью повто-

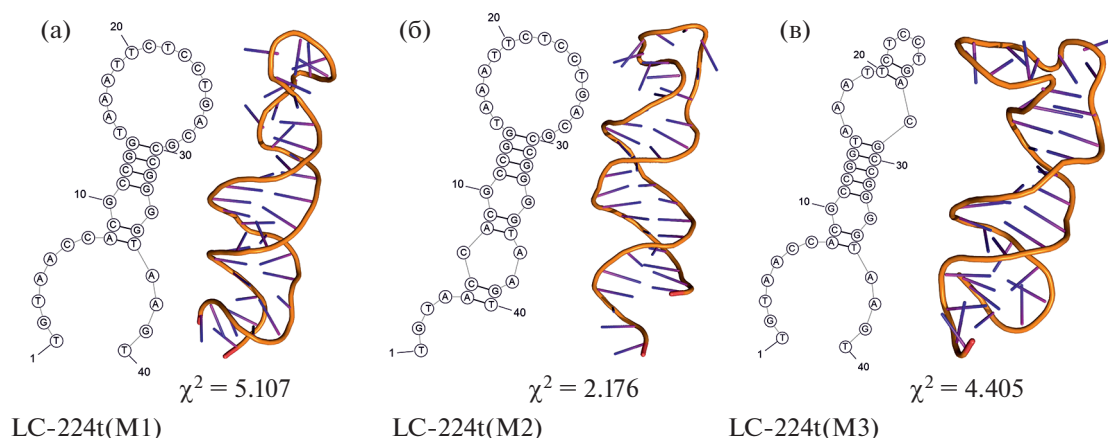


Рис. 2. Варианты вторичной и третичной структуры аптамера LC-224t.

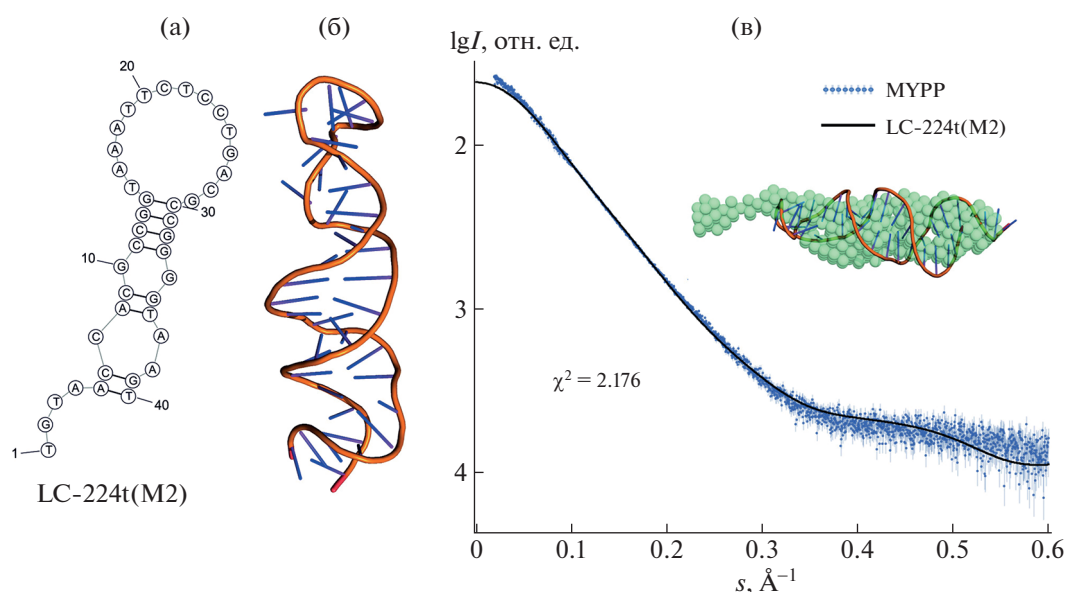


Рис. 3. Сопоставление модели LC-224t(M2) с данными МУРР: а – вторичная и третичная модель аптамера LC-224t (M2), наиболее совпадающая с экспериментальными данными МУРР; б – экспериментальный график МУРР, изображенный точками с разбросом ошибок, на который наложена теоретическая кривая МУРР от трехмерной модели аптамера, дающая наименьшее значение невязки $\chi^2 = 2.176$; в – совмещение шариковой структуры общей электронной плотности молекулы аптамера по данным эксперимента МУРР с трехмерной моделью молекулы в схематичном виде отображения.

ряет вторичную структуру соответствующего фрагмента в моделях LC-224(M1) и LC-224(M3).

Аффинность и специфичность оптимизированного аптамера была проверена экспериментально на послеоперационных тканях рака легкого. Показано, что укорочение не повлияло на способность аптамера аффинно связываться с клетками рака легкого (рис. 4а), в экспериментах со здоровыми тканями также не повлияло на его специфичность взаимодействия (рис. 4а).

В последнее время большое внимание уделяется адресной терапии на основе различных наноконструкций, в состав которых могут входить как молекулы, выполняющие транспортную функцию, так и различные функциональные группы. Необходимо создавать такие комплексы с минимальными возможными размерами для того, чтобы они свободно проникали в патологический очаг и внутрь клеток. Кроме того, уменьшение размеров молекул увеличивает их специфичность и уменьшает стоимость синтеза. Совместное при-

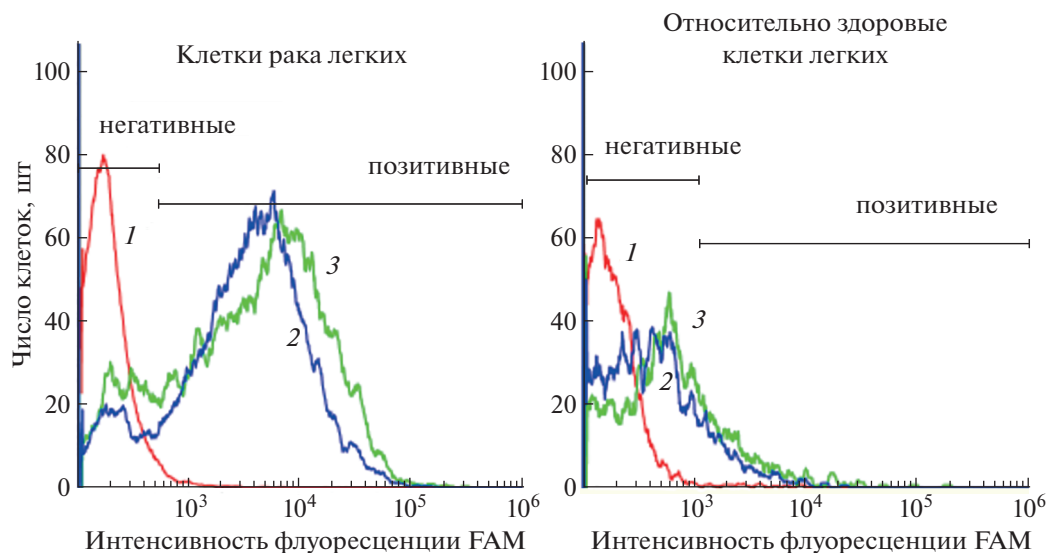


Рис. 4. Укорочение аптамера LC-224 не повлияло на его аффинность и специфичность: а — связывание аптамеров LC-224 и LC-224t с клетками, выделенными из послеоперационных тканей рака легких, б — связывание аптамеров LC-224 и LC-224t с клетками, выделенными из послеоперационных тканей условно здоровых тканей легких, прилегающих к раковым; 1 — неокрашенные клетки, 2 — LC-224, 3 — LC-224t.

менение компьютерного моделирования и МУРР позволяет оптимизировать структуру ДНК аптамеров путем удаления нуклеотидов, не принимающих участия в связывании. Метод МУРР хорошо зарекомендовал себя для исследования пространственных структур белков, пептидов, ДНК, РНК и их комплексов в растворе в квазифизиологических условиях. Его основные преимущества по сравнению с другими методами структурного анализа — простота пробоподготовки, возможность проведения измерений в жидкости, малые количества и невысокая концентрация образца, высокая скорость получения и обработки экспериментальных данных. Компьютерное моделирование позволяет ускорить процесс оптимизации и снизить его стоимость, поскольку исследователю нет необходимости синтезировать и проверять разные варианты укороченных аптамеров. Предложенный подход был апробирован на аптамере к раку легкого.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совместное применение компьютерного моделирования и МУРР позволяет оптимизировать структуру ДНК-аптамеров путем удаления нуклеотидов, не принимающих участия в связывании. Анализ методом проточной цитометрии показал, что процедуру оптимизации можно применить в отношении ДНК-аптамеров, поскольку параметры их связывания с клетками рака легкого и условно здоровыми клетками после оптимизации не изменились.

Авторы выражают благодарность сотрудникам НИЦ “Курчатовский институт” за научное сопровождение проекта, ЦКП “Молекулярные и клеточные технологии” КрасГМУ им. В.Ф. Войно-Ясенецкого и Межведомственному суперкомпьютерному центру Российской академии наук (МСЦ РАН).

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-73-20240).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ni X., Castanaris M., Lupold S.E. // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. P. 4206. <https://doi.org/10.2174/092986711797189600>
2. Jia M., Sha J., Li Z. et al. // *Food Chem.* 2020. V. 317. P. 126459. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126459>
3. Zheng X., Hu B., Gao S.X. et al. // *Toxicon.* 2015. V. 101. P. 41. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.04.017>
4. Dhiman A., Anand A., Malhotra A. et al. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 17795. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35985-1>
5. Hammel M. // *Eur. Biophys.* 2012. V. 41. P. 789. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0820-x>
6. Rambo R.P., Tainer J.A. // *Annu. Rev. Biophys.* 2013. V. 42. P. 415. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130301>

7. *Morozov D., Mironov V., Moryachkov R.V. et al.* // Mol. Ther. Nucleic. Acids. 2021. V. 25. P. 316.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.07.015>
8. *Zamay G.S., Ivanchenko T.I., Zamay T.N. et al.* // Mol. Ther. Nucleic. Acids. 2017. V. 6. P. 150.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2016.12.004>
9. *Zuker M.* // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. № 13. P. 3406.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>
10. *Magnus M., Boniecki M., Dawson W., Bujnicki J.M.* // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. W315.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw279>
11. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* // J. Mol. Graph. 1996. V. 14. P. 33.
[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
12. *Abraham M.J., Murtola T., Roland S. et al.* // SoftwareX. 2015. V. 1. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
13. *Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K. et al.* // J. Chem. Theory Comput. 2015. V. 11. P. 3696.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
14. *Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. et al.* // J. Chem. Phys. 1983. V. 79. P. 926.
<https://doi.org/10.1063/1.445869>