

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АПТАМЕРА С ЭКЗОСАЙТАМИ ТРОМБИНА.

¹Щербинин Д.С., ¹Веселовский А.В.

1УРАМН Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН, г.Москва

amid_dima@list.ru

Изучению тромбиновых аптамеров, как возможных лекарственных средств, уделяется большое внимание, но до сих пор механизм их взаимодействия с белком не до конца выяснен. В данной работе было проведено исследование методами молекулярной динамики взаимодействий аптамеров с двумя экзосайтами тромбина. Было показано, что посадка аптамера на определенный экзосайт зависит от его пространственной структуры. Для аптамеров из разных rdb-структур комплексов было выбрано лучшее положение.

Альфа-тромбин (КФ 3.4.21.5) относится к классу сериновых протеаз и является важнейшим компонентом системы свёртывания крови. Он катализирует превращение фибриногена в фибрин, осуществляет активацию различных факторов свертывания крови, стимулирует активацию тромбоцитов и др., приводящее в конечном итоге к образованию сгустка крови [1,2]. Ведущая роль тромбина в процессе свертываемости крови определила большой интерес к разработке лекарственных препаратов, действующим на этот белок [3].

В структуре тромбина, кроме активного сайта, так же имеются два анион-связывающих центра, один из которых (экзосайт 1), расположенный вблизи каталитического участка активного центра, ответственен за связывание фибриногена и отвечает за высокую протеолитическую специфичность тромбина. Со вторым участком (экзосайт 2), находящимся на противоположной стороне белковой глобулы от экзосайта 1, связываются гепарин и другие полисахариды.

Аптамеры представляют собой короткие одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, способные с высокой селективностью и аффинностью взаимодействовать с белками [4]. Ранее при скрининге библиотеки синтетических молекул ДНК был обнаружен аптамер, способный взаимодействовать с молекулой тромбина [5]. Этот антитромбиновый аптамер (АТА) представляет собой 15-членную нуклеотидную последовательность GGTTGGTGTGGTTGG, и взаимодействует с тромбином, увеличивая время агрегации сгустка. Пространственная структура этого аптамера, определенная методами ЯМР и РСА, в свободном состоянии и в комплексе с тромбином показала, что он представляет собой 2 G-квартета, соединенные центральной петлей (TGT) и двумя боковыми петлями (TT) (рис. 1).

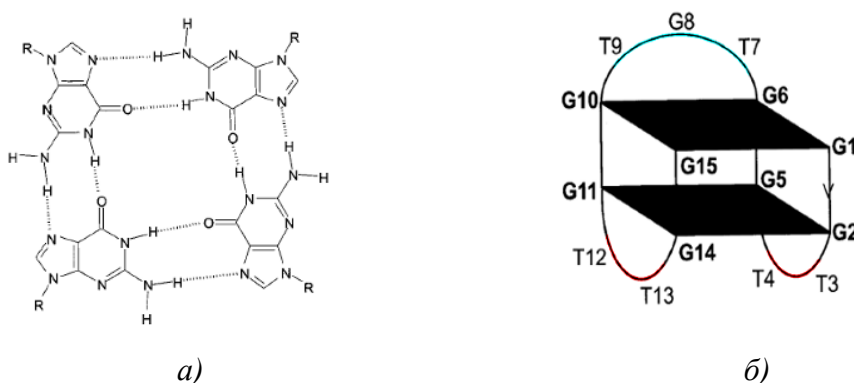


Рис. 1. Структура аптамера тромбина. а) Структура G-квартета; б) Пространственная структура аптамера. Цветом выделены TGT- и TT-петли

Комплекс тромбина с АТА представляет собой сандвич, в котором две молекулы тромбина соединены одним аптамером [6,7]. При этом первая молекула белка

взаимодействует с тромбином своим фибриноген-узнающим сайтом (экзосайт 1), а вторая – гепарин-связывающим сайтом (экзосайт 2). Т.е. данный аптамер способен связываться с обоими экзосайтами тромбина (Рис.2).

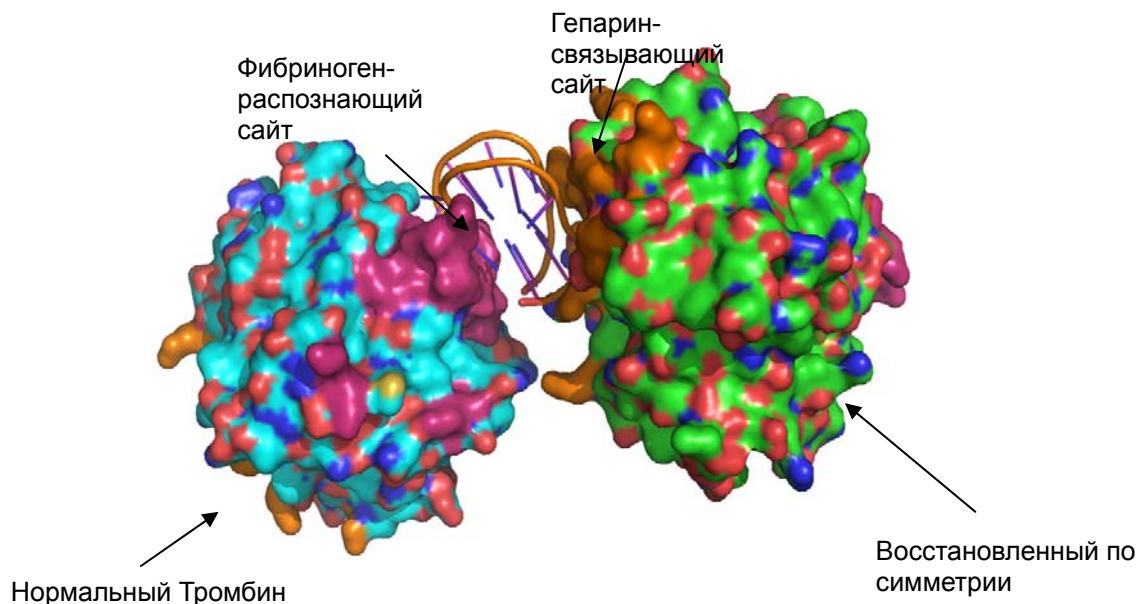


Рис. 2. Взаимодействие аптамера 1-го кристалла (1HUT) с экзосайтами тромбина

В тоже время изучение взаимодействия тромбина с этим аптамером методами химической модификации, направленного мутагенеза [8, 9] показало, что в растворе он связывается с фибриноген-узнающим сайтом. Кроме того, было показано, что гамма-тромбин (продукт протеолиза альфа-тромбина в области экзосайта 1) не взаимодействует с этим АТА [10]. Однако, в этих работах место связывания оценивалось по биологическому эффекту, который опосредуется взаимодействием с экзосайтом 1. С другой стороны, в ряде работ было показано, что создание димерных конструкций (два аптамера, соединенных линкером) приводит в резкому неаддитивному увеличению эффективности связывания такой конструкции с белком [11, 12]. Это в свою очередь указывает, что и в растворе АТА способен связываться с обоими экзосайтами тромбина.

В настоящее время известны две пространственные структуры комплекса тромбина с АТА [PDBid: 1HUT, 1HAO]. Но удивительно, что в этих пространственных структурах аптамер совершенно по-разному взаимодействует с сайтами тромбина. Если в первом кристалле аптамер связывается с фибриноген-узнающим сайтом посредством боковых ТТ петель, а с гепарин-связывающим сайтом через центральную ТGT петлю, то во втором кристалле – все наоборот. Кроме того, эти аптамеры представляют собой зеркальные структуры (Рис. 3), т.е. в растворе аптамер должен присутствовать в виде «рацематной» смеси.

Структуры аптамеров

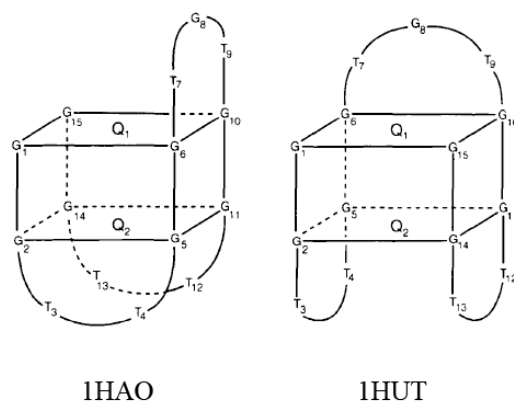


Рис. 3. Структура аптамеров кристаллов

Таким образом, в настоящее время отсутствует детальная информация о том, в каком состоянии аптамер связывается с тромбином, и чем обусловлено его предпочтение во взаимодействии с тем или иным экзосайтом. В данной работе методами молекулярного моделирования было проанализировано динамическое поведение АТА, связанного с различными сайтами тромбина.

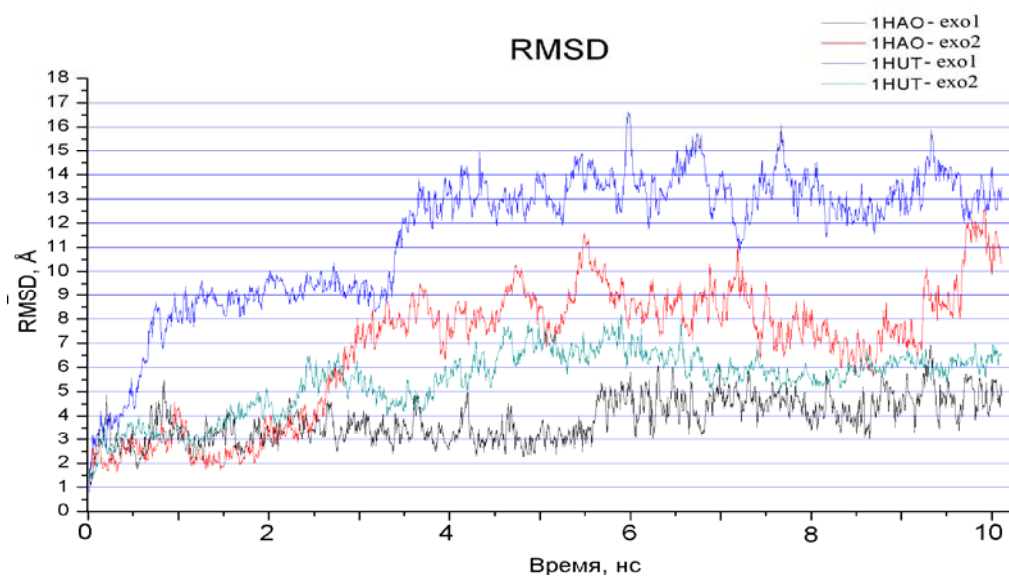
Объекты и методы. Симуляция молекулярной динамики проводилась при помощи программ пакета Amber9 на траектории 10 нс при 300К с использованием периодических условий. Для каждого комплекса использовали ячейки с отступом в 10 ангстрем, заполненные водой tip3p и ионами Na^+ для нейтрализации системы. Помимо этого, в центр квадрокомплекса аптамера был добавлен ион K^+ .

Результата динамики были проанализированы программами VMD и ptraj. Также был произведен расчет энергий взаимодействия комплексов белок-аптамер методом ММ-РBSA.

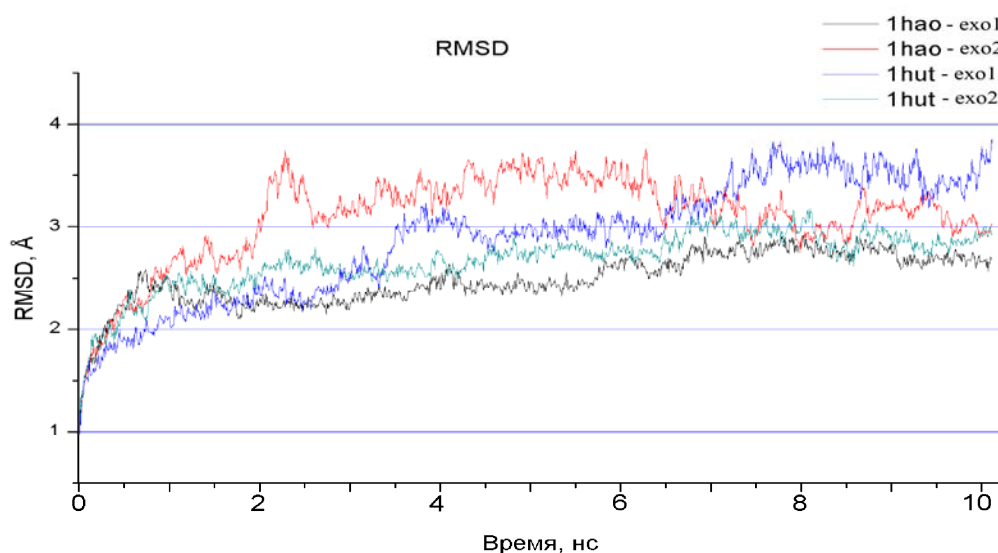
Результаты и обсуждение. Для четырех комплексов обоих кристаллов (два для тромбина и аптамера из первого кристалла на гепарин- связывающем и фибриноген- распознающем сайтах и два - для второго кристалла) были проведены симуляции молекулярной динамики.

Анализ молекулярной динамики комплексов тромбин-аптамер показал, что в зависимости от пространственной структуры аптамера, он лучше взаимодействует либо с одним, либо с другим сайтом тромбина. Для аптамера первого кристалла (1HUT) более предпочтительно взаимодействие со вторым экзосайтом (гепарин-связывающим), тогда как второй аптамер (из кристалла 1HАО) лучше взаимодействует с первым экзосайтом (фибриноген-распознающим).

Данный вывод был сделан на основании анализа среднеквадратичных отклонений (RMSD) нуклеотидов лигандов и аминокислотных остатков тромбина и анализа их контактов в комплексах. Результаты приведены ниже.



(A)



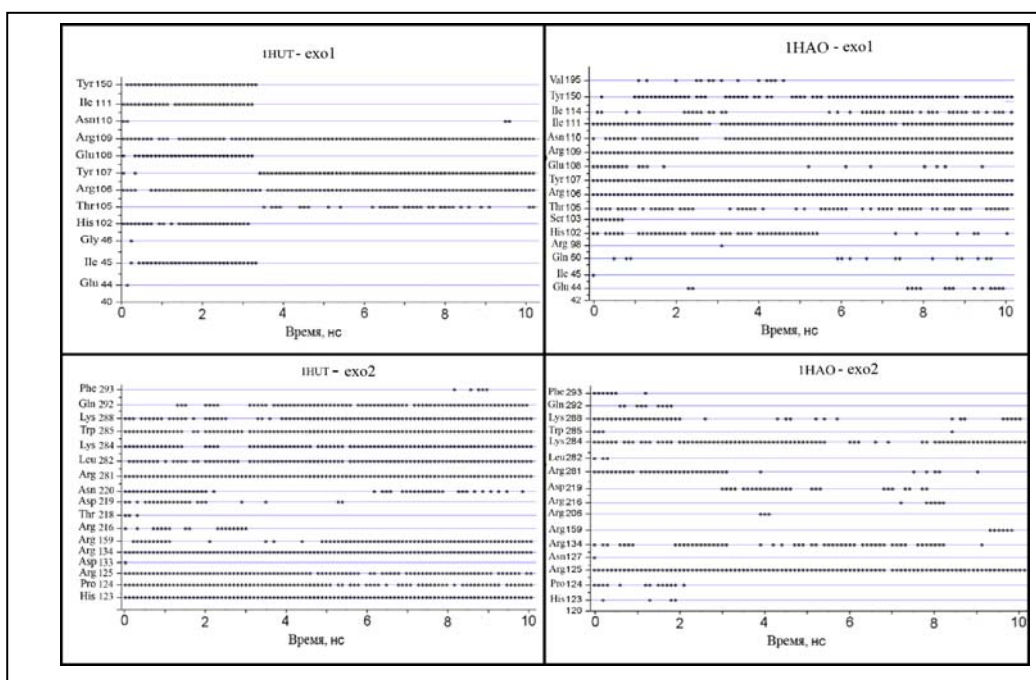
(B)

Рис. 4. Среднеквадратичные отклонения нуклеотидов аптамеров (A) и полипептидной цепи тромбина (B) в разных комплексах в процессе молекулярной динамики. Индекс у кода PDB означает экзосайт.

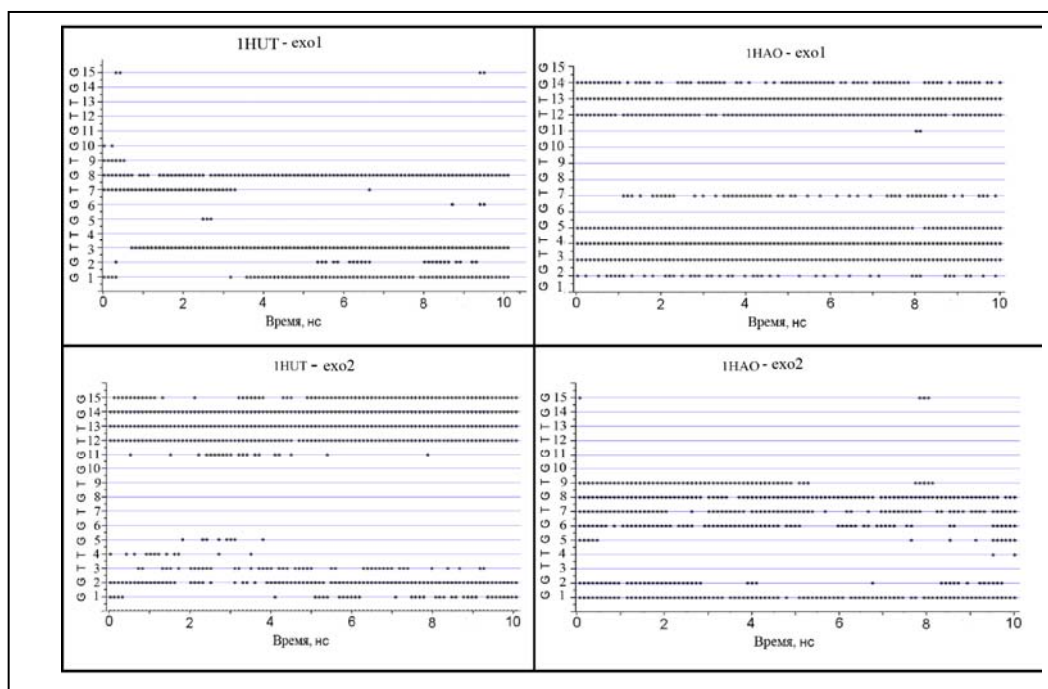
На рисунке 4 видно, что более стабильно себя ведут части комплексов, в которых аптамер из первого кристалла (1HUT) садится на второй, гепарин-связывающий сайт тромбина, а аптамер второго кристалла (1HAO) взаимодействует с 1-экзосайтом (фибриноген-распознающий)

Анализ аминокислотных остатков тромбина и нуклеотидов аптамеров, непосредственно взаимодействующих друг с другом (были выбраны аминокислотные остатки и нуклеотиды, находящиеся на расстоянии 3Å друг от друга) показал, что более стабильные контакты образуются в комплексах, где аптамер из кристалла 1HUT взаимодействует со вторым

экзосайтом, а из IHAO - с первым, фибриноген-распознающим сайтом тромбина. В двух оставшихся случаях взаимодействия остатков были более непостоянны (Рис.5).



(A)



(B)

Рис.5 Изменение плотных контактов в процессе молекулярной динамики. А - Аминокислотные остатки тромбина, участвующие во взаимодействии с аптамерами; Б - Нуклеотидов аптамеров, образующие контакты с аминокислотными остатками.

Это же подтверждало и количество водородных связей, образующихся при взаимодействии аптамеров с анион-связывающими сайтами тромбина, рассчитанное на всей траектории симуляции комплексов (Рис. 6).

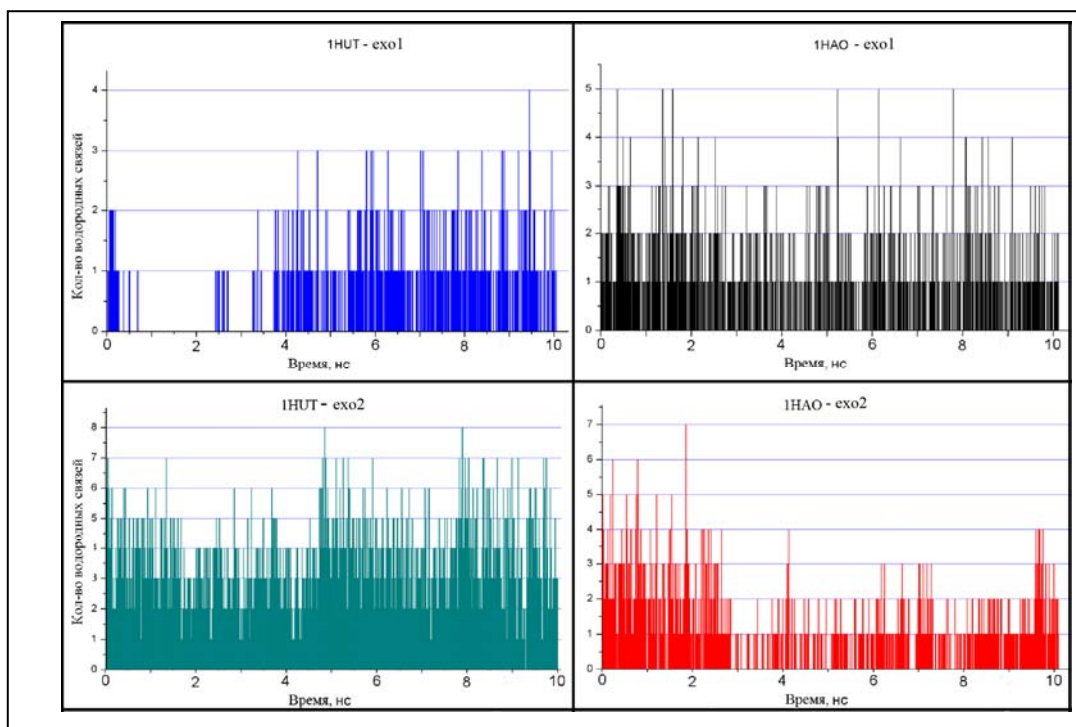


Рис.6 Количество водородных связей между нуклеотидами аптамеров и аминокислотными остатками тромбина в ходе динамики комплексов.

Так для аптамера из кристалла 1HUT в ходе молекулярной динамики его комплекса с вторым экзосайтом образовывалось, в среднем, 3-4 водородные связи, в то время, как в другом комплексе с первым экзосайтом их было значительно меньше. Для аптамера из кристалла 1HAO различия в количестве водородных связей было менее четко выражено, хотя можно отметить, что в комплексе с фибриноген-связывающим сайтом, оно было более стабильным на всем протяжении динамики, тогда как для комплекса с гепарин-связывающим сайтом, количество водородных связей имело тенденцию к снижению.

Дополнительно были рассчитаны энергии взаимодействия белок-аптамер в исследуемых комплексах (Таблица 1). Видно, что взаимодействия аптамеров первого и второго кристаллов энергитически выгоднее с гепарин-связывающим и фибриноген-распознающим сайтами соответственно. Причем в обоих случаях основной движущей силой являлась энтальпийная составляющая энергии связывания, что представляется логичным, так как экзосайты тромбина положительно заряжены. В «плохих» случаях движущей силой связывания была энтропия (1HAO_SIM) или вклад энтропии и энтальпии был эквивалентен.\

Таблица 1. Энергии взаимодействия комплексов тромбин-аптамер (ккал/моль).

Комплекс	Gbtot	Tstot	ΔG
1HUT	-22,82	-24,76	-47,58
1HUT_SIM	-59,03	-27,4	-86,43
1HAO	-59,43	-32,48	-91,91
1HAO_SIM	-15,63	-43,39	-59,02

Примечание:

Gbtot – энтальпийный вклад в энергию взаимодействия (рассчитанный методом ММ-РBSA); Tstot – вклад конформационной энтропии в связывание (рассчитанный методом NMA).

В то же время анализ конформационной подвижности боковых радикалов аминокислотных остатков, образующих экзосайты показал (Рис. 7), что связывание аптамера из кристалла 1HUT с гепарин-связывающим сайтом приводит к увеличению подвижности боковых радикалов не только на самом сайте, но и на экзосайте 1 по сравнению со свободным тромбином. Тогда как взаимодействие с экзосайтом 1 не сказывается на подвижности обоих сайтов. Противоположная картина наблюдалась для аптамера из кристалла 1HAO. Его связывание с экзосайтом 1 приводила к увеличению подвижности боковых групп аминокислот обоих сайтов, и практически не сказывалось в случае посадки аптамера на экзосайт 2. Т.е. в комплексах аптамеров с экзосайтами, которые показывают наиболее эффективное связывание, наблюдается увеличение подвижности боковых радикалов аминокислотных остатков не только на сайтах, с которыми взаимодействует аптамер, но и на противоположных. Такая аллостерическая регуляция ранее была отмечена, однако механизм ее остается невыясненным [13]. Возможно, это воздействие опосредуется через Na-связывающий сайт тромбина, для которого было показано влияние на оба экзосайта тромбина [14].

1hut a.o.	сайт занят 1hut_exo1	аптамер на другом 1hut_exo2	Свободный-занятый	без аптамера thrombin
Glu 44	1.924789	4.381699	2.45691	2.380153
Ile 45	2.045669	4.061864	2.016195	1.577183
Gly 46	1.554747	3.999285	2.444538	1.560213
His 102	1.834591	3.297694	1.463103	1.385689
Thr 105	2.590252	3.193541	0.603289	2.395976
Arg 106	2.768335	4.078149	1.309814	2.47904
Tyr 107	2.650092	3.500917	0.850825	2.350259
Glu 108	2.148562	3.297122	1.14856	1.622918
Arg 109	2.968867	4.143519	1.174652	2.947703
Asn 110	2.922037	4.179886	1.257849	2.554706
Ile 111	2.396632	3.68879	1.292158	1.856838
Tyr 150	2.263537	3.980048	1.716511	1.860283

1hut_sim a.o.	сайт занят 1hut_exo2	аптамер на другом 1hut_exo1	Свободный-занятый	без аптамера thrombin
His 123	3.523442	1.810277	-1.713165	1.877326
Pro 124	4.091604	2.099616	-1.991988	2.429975
Arg 125	4.230568	2.722699	-1.507869	2.661743
Asp 133	2.932491	1.918785	-1.013706	1.666037
Arg 134	3.295526	1.96639	-1.329136	1.664933
Arg 159	5.948438	2.644152	-3.304286	3.676427
Arg 216	3.173242	2.668019	-0.505223	3.15333
Thr 218	2.706712	2.125209	-0.581503	1.61271
Asp 219	3.413575	2.568342	-0.845233	1.822944
Asn 220	2.807773	1.927441	-0.880332	1.363071
Arg 281	3.678344	2.519299	-1.159045	1.711992
Leu 282	3.303721	1.666736	-1.636985	1.542652
Lys 284	4.745052	2.741729	-2.003323	2.715062
Trp 285	3.690025	1.775947	-1.914078	2.062062
Lys 288	4.766261	2.695079	-2.071182	3.041502
Gln 292	4.917722	3.156785	-1.760935	3.71045
Phe 293	4.412523	2.877016	-1.535507	3.513911

1hao a.o.	сайт занят 1hao_exo1	аптамер на другом 1hao_exo2	Свободный-занятый	без аптамера thrombin
Glu 44	3.515838	2.534521	-0.981317	2.380153
Ile 45	2.517068	2.377976	-0.139092	1.577183
Gln 60	3.481402	2.609432	-0.87197	3.240154
Arg 98	2.588191	1.654482	-0.933709	1.940717
His102	2.869169	2.166828	-0.702341	1.385689
Ser 103	3.461441	2.265659	-1.195782	1.623704
Thr 105	3.752963	3.133861	-0.619102	2.395976
Arg 106	4.064682	3.042551	-1.022131	2.47904
Tyr 107	3.595638	2.355107	-1.240531	2.350259
Glu 108	3.124474	2.168518	-0.955956	1.622918
Arg 109	4.384142	3.176041	-1.208101	2.947703
Asn 110	4.083669	2.810618	-1.273051	2.554706
Ile 111	3.189956	2.328733	-0.861223	1.856838
Ile 114	2.682828	1.7132	-0.969628	2.713705
Tyr 150	3.257604	2.46103	-0.796574	1.860283
Val 195	3.074336	2.324723	-0.749613	1.682789

1hao_sim a.o.	сайт занят 1hao_exo2	аптамер на другом 1hao_exo1	Свободный-занятый	без аптамера thrombin
His 123	2.666937	3.017452	0.350515	1.877326
Pro 124	3.260529	3.66717	0.406641	2.429975
Arg 125	3.792759	4.546115	0.753356	2.661743
Asn 127	3.033763	3.547716	0.513953	2.169307
Arg 134	2.77649	3.169364	0.392874	1.664933
Arg 206	2.17687	3.004725	0.827855	2.286382
Asp 219	2.083752	3.072031	0.988279	1.822944
Arg 281	2.368779	3.19967	0.830891	1.711992
Leu 282	2.148502	2.479662	0.33116	1.542652
Lys 284	3.610838	4.025968	0.41513	2.715062
Trp 285	2.570711	2.708278	0.137567	2.062062
Lys 288	4.127035	3.545356	-0.581679	3.041502
Gln 292	3.988394	3.67598	-0.312414	3.71045
Phe 293	3.510943	3.157314	-0.353629	3.513911

Рис.7 Значения среднеквадратичной флуктуации (RMSF) аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с аптамерами.

Примечание: В первом столбце приведены значения в случае, когда аминокислоты непосредственно связываются с нуклеотидами аптамера, во втором- когда аптамер взаимодействует с противоположным сайтом. В третьем рассчитана разность значений колебаний аминокислот свободного и занятого сайтов. В последнем столбце приведены значения RMSF для свободного тромбина

Таким образом, анализ молекулярной динамики комплексов аптамеров из разных кристаллов (которые отличаются пространственной укладкой нуклеотидной цепи) с экзосайтами тромбина показал, что в зависимости от пространственной укладки, аптамеры преимущественно будут взаимодействовать с разными экзосайтами этого белка.

Литература

1. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия, М. 1987, с. 233-34
2. *Fenton J. W.* Seminars of Thrombosis and Hemostasis. 1988, № 14, p. 234-40;
3. *Kenneth A. Bauer,* New Anticoagulants // Hematology 2006 p.450-456
4. *Missailidis S, Hardy A.* Aptamers as inhibitors of target proteins // Expert Opin Ther Pat. 2009 Aug;19(8):1073-82.
5. *Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ.* Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin // Nature. 1992 Feb 6;355(6360) p.564-6.
6. *Padmanabhan K, Tulinsky A.* Ambiguous structure of a DNA 15-mer thrombin complex // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1996 Mar 1;52(Pt 2):272-82.
7. *Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE, Tulinsky A.* The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. // The Journal of Biological Chemistry. 1993, 268, 17651-17654.
8. *Manuel Tsiang, Anant K. Jain, Kyla E. Dunn, Maria E. Rojas, Lawrence L. K. Leung and Craig S. Gibbs* Functional Mapping of the Surface Residues of Human Thrombin // The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270, 16854-16863.
9. *Qingyu Wu, Manuel Tsiang, and J. Evan Sadler* Localization of the Single-stranded DNA Binding Site in the Thrombin Anion-binding Exosite // The Journal of Biological Chemistry, 1992, Vol. 267, No. 34, Issue of December 5, pp. 24408-24412
10. *Lisa R. Paborsky, Sarah N. McCurdy, Linda G. Criffin, John J. Toole, and Lawrence LK. Leung* The Single-stranded DNA Aptamer-binding Site of Human Thrombin // The Journal of Biological Chemistry, 1993 Vol. 268, No. 28, Issue of October 6. pp. 20808-20811
11. *Kim Y, Cao Z, Tan W.* Molecular assembly for high-performance bivalent nucleic acid inhibitor. // PNAS, 2008 Apr 15;105(15):5664-9.
12. *J. Muller, D. Freitag, G. Mayer and B. Potzch* Anticoagulant characteristics of HD1-22, a bivalent aptamer that specifically inhibits thrombin and prothrombinase // Journal of Thrombosis and Haemostasis, 6: 2105–2112
13. *NS, Stafford AR, Leslie BA, Kretz CA, Fredenburgh JC, Weitz JI.* Long range communication between exosites 1 and 2 modulates thrombin function. J Biol Chem. 2009 Sep 18;284(38):25620-9. Epub 2009 Jul 9.
14. *Di Cera E.* Thrombin. // Mol Aspects Med. 2008 Aug;29(4):203-54.