

УДК: 577

## Молекулярно-динамическое исследование комплексов ДНК-аптамера с АМФ и ГМФ

Р. Р. Рамазанов<sup>1,а</sup>, П. А. Соколов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Севастопольский государственный университет,  
Россия, 299053, г. Севастополь, ул. Университетская, 33

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет,  
Россия, 198504, г. Санкт-Петербург, Петергоф, ул. Ульяновская, 1

E-mail: <sup>а</sup> kubastyi@gmail.com

*Получено 05.05.2021, после доработки — 05.09.2021.*

*Принято к публикации 18.10.2021.*

В данной работе при помощи метода молекулярной динамики проводится сравнительное исследование конформационной стабильности ДНК-аптамера к аденозиновым производным в свободном состоянии и в комплексе с молекулами АМФ и ГМФ. Показано, что в свободном состоянии структура внутренней петли шпильки ДНК-аптамера за счет особой упаковки гуанинов закрывает полость сайта связывания от внешних лигандов, при этом возникает условие специфичного отбора молекул аденозинового производного в сравнении с гуанином. В дополнение к имеющимся в литературе выявлены новые факторы стабилизации комплекса АМФ и аптамера — водородные связи между О3' атома рибозы лигандов с кислородом ближайшей фосфатной группы. Также показано, что гуанины, которые образуют водородные связи с АМФ внутри сайта связывания, дополнительно стабилизируются водородными связями с противоположными по цепи фосфатными группами. Предложенная схема качественно соответствует экспериментальным данным, согласно которым аптамер в растворе обретает конформацию шпильки с формированием сайта связывания, при этом образованный сайт проявляет высокую специфичность при взаимодействии только с аденозиновыми производными.

Ключевые слова: молекулярная динамика, ДНК-аптамер, АМФ, молекулярное узнавание

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 19-73-00113.

UDC: 577

## Molecular dynamics study of complexes of a DNA aptamer with AMP and GMP

R. R. Ramazanov<sup>1,a</sup>, P. A. Sokolov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sevastopol State University,  
33 Universitetskaya st., Sevastopol, 299053, Russia  
<sup>2</sup>Department of Physics, St. Petersburg State University,  
1 Ulyanovskaya st., St. Petersburg, 198504, Russia

E-mail: <sup>a</sup> kubastyi@gmail.com

*Received 05.05.2021, after completion — 05.09.2021.  
Accepted for publication 18.10.2021.*

This study is devoted to a comparative study of the conformational stability of the DNA aptamer to adenosine derivatives in a free state and in a complex with AMP and HMP molecules by use of molecular dynamics. It was shown that, in the free state, the structure of the inner loop of the DNA aptamer hairpin, due to the special packing of guanines, closes the cavity of the binding site from external ligands, and the condition for the specific selection of adenosine derivatives in comparison with guanine arises. New stabilization factors of the AMP and aptamer complex have been revealed — hydrogen bonds between the O3' of the ribose atom of the ligands with the oxygen of the nearest phosphate group. It was also shown that guanines, which form hydrogen bonds with AMP within the binding site, are additionally stabilized by hydrogen bonds with phosphate groups opposing along the chain. The proposed scheme is in qualitative agreement with the experimental data, according to which the aptamer in solution acquires a hairpin conformation with the formation of a binding site, while the formed site exhibits high specificity when interacting only with adenosine derivatives.

Keywords: molecular dynamics, DNA aptamer, AMP, molecular recognition

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2021, vol. 13, no. 6, pp. 1191–1203 (Russian).

The work was supported by RSF grant No. 19-73-00113.

## Введение

Синтетические одноцепочечные олигонуклеотиды (ДНК-аптамеры), содержащие гуанин (Г), цитозин (Ц), аденин (А) и тимин (Т), обладают реакционными свойствами, которые в последнее десятилетие привлекают пристальное внимание в области разработки новых био-сенсорных приложений [Chatterjee et al., 2020; Kim, Thoa, Gu, 2019; McConnell, Nguyen, Li, 2020; Munzar et al., 2017; Ren et al., 2020; Wang et al., 2020]. Способность ДНК-аптамеров к избирательному нековалентному связыванию низкомолекулярных мишеней, надмолекулярных структур и даже целых клеток стимулирует интерес к детальному исследованию механизмов их исключительной специфичности к этим мишеням [Cai et al., 2018; Gotrik et al., 2016; Hermann, Patel, 2000]. Несмотря на богатый накопленный экспериментальный опыт в синтезе и анализе сотен ДНК-аптамеров к различным мишеням, для многих из них вопросы о механизме селективности остаются открытыми. Так, для ДНК-аптамера к аденозину не существует устоявшейся модели механизма комплексообразования, о чем свидетельствуют периодически появляющиеся публикации, рассматривающие механизм комплексообразования с использованием различных экспериментальных и теоретических методов (рис. 1, а).

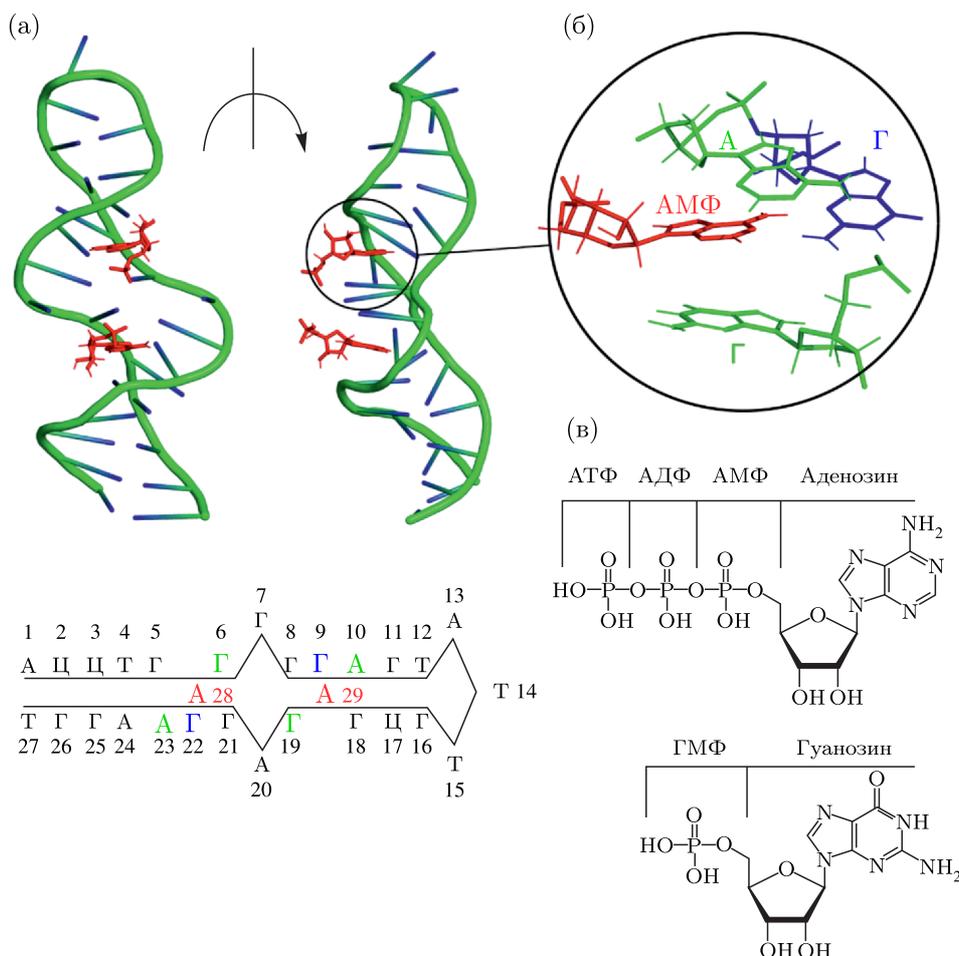


Рис. 1. а) Структура комплекса ДНК-аптамера с двумя молекулами АМФ, полученная методом ЯМР [Lin, Patel, 1997]; б) структура сайта связывания, в котором АМФ (красный) образует две водородные связи с гуанином (синий) и стабилизирован стэкинг-взаимодействием с двумя пуриновыми нуклеотидами (зеленый); в) химические структуры аденозиновых и гуанозиновых производных

Специфичный молекуле аденозина ДНК-аптамер — один из наиболее изученных аптамеров со времени его первого упоминания в 1995 году [Huizenga, Szostak, 1995]. Авторы предложили модель, учитывающую образование G-квадруплекса в качестве консервативного сайта связывания. Однако позднее, в 1997 году [Lin, Patel, 1997], методами структурного двумерного ЯМР показали, что аптамер содержит два несимметричных сайта связывания, каждый из которых включает один гуанин, образующий с молекулой аденозина две водородные связи, и два пуриновых нуклеотида, образующих с молекулой аденозина стэкинг-взаимодействие (рис. 1, б).

Структурные изменения, которые могут происходить с ДНК-аптамером при связывании с аденозином, могут быть описаны в рамках двух моделей комплексообразования: модель конформационного узнавания (КУ) и модель индуцированной подгонки (ИП) [Munzar et al., 2017; Paul, Weikl, 2016]. С точки зрения модели КУ олигомер ДНК обретает в растворе преимущественную конформацию со свойственной ей пространственной организацией атомной структуры, при которой может спонтанно образовываться сайт связывания специфичный молекулярной мишени. С точки зрения модели ИП специфичный сайт образуется в процессе взаимодействия с молекулярной мишенью, чем обусловлена высокая избирательность связывания.

В работе [Lin, Patel, 1997] изучили структуру комплекса и выявили стабилизирующие факторы — две водородные связи и стэкинг-взаимодействие, однако авторы не рассмотрели в деталях процесс формирования комплекса и факторы, обуславливающие специфичность к аденозину. В 2013 году в работе [Xia, Yuan, Fang, 2013] с использованием спектроскопии с резонансным переносом энергии Фёрстера было показано, что в свободном состоянии аптамер к аденозину имеет сформированную структуру, которой соответствует конформация шпильки. Авторы утверждали, что, находясь в данной конформации, аптамер образует комплекс с двумя молекулами АТФ по механизму конформационного узнавания. В одном из последних теоретических исследований [Xie, Eriksson, Zhang, 2020] методом молекулярной динамики с использованием силового поля CHARMM36 авторы также показали, что образование комплекса происходит по механизму КУ. Другие выводы сделаны в работе 2017 года [Zhang, Oni, Liu, 2017], в которой методами микрокалориметрии для разных модифицированных форм ДНК-аптамеров к аденозину была выявлена кооперативность связывания. В недавней работе [Slavkovic et al., 2020] было показано методами изотермической титрационной калориметрии, что связывание двух молекул аденозина аптамером носит кооперативный характер с положительным эффектом — первая связавшаяся молекула АТФ увеличивает сродство для связывания второй АТФ. Лин и Пател в своих ЯМР-исследованиях имино протонов аптамера в свободном и связанном состоянии [Lin, Patel, 1997] показали, что никаких конформационных изменений в отсутствие молекул АТФ с аптамером не происходит, что в совокупности с данными калориметрии может быть косвенным свидетельством индуцированного механизма образования сайта связывания. Также было показано, что этот аптамер имеет сродство к производным аденозина — АМФ, АДФ и АТФ, однако с другими нуклеотидами (цитозин, гуанин, тимин) не связывается (рис. 1, в).

Отнесение того или иного механизма к модели комплексообразования является важным аспектом в выборе рационального подхода при конструировании биосенсора. Противоречивые выводы по результатам исследований прошлых лет не дают возможности сформировать однозначное представление о механизмах связывания ДНК-аптамера с производными аденозина. В настоящей работе мы провели теоретическое исследование конформационной стабильности ДНК-аптамера к АМФ методом молекулярной динамики (МД) на 150-нс временной шкале с использованием специальной модификации силового поля семейства AMBER для нуклеиновых кислот — parmbsc1 [Ivani et al., 2015]. Сравнительные МД-расчеты для свободной формы аптамера, а также в комплексе с аденозинмонофосфатом (АМФ) и гуанозинмонофосфатом (ГМФ) выявили новые детали стабилизации структуры комплекса.

## Модели и методы

Расчеты молекулярной динамики (МД) были проведены при помощи пакета GROMACS [Abraham et al., 2015] в сочетании с силовым полем parmbsc1 [Ivani et al., 2015]. В качестве базовой структуры комплекса ДНК-аптамера и молекул аденозинового лиганда была рассмотрена структура комплекса с двумя молекулами аденозинмонофосфата (АМФ) (PDB ID: 1AW4), полученная методом двумерного ЯМР [Lin, Patel, 1997]. Для МД-расчета были подготовлены три стартовые конфигурации: без молекул АМФ, с двумя молекулами АМФ, с двумя молекулами ГМФ. Комплекс с молекулами ГМФ был получен с помощью замещения азотистого основания аденина на азотистое основание гуанина в программе PYMOL [The PyMOL Molecular Graphics System] с использованием модуля mutagenesis. Полученные структуры растворялись в воде с описанием в рамках модели ТРЗР и помещались в параллелепипедную ячейку с периодическими граничными условиями размером  $5,65 \times 5,31 \times 7,55$  нм. В полученные водные ячейки добавлялись 28 ионов  $\text{Na}^+$  для соблюдения электронейтральности и дополнительные пары ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в качестве фонового электролита, соответствующего концентрации 0,15M NaCl. В результате модельная система насчитывала порядка 16 600 молекул воды, 51 ион  $\text{Na}^+$  и 23 иона  $\text{Cl}^-$ . Рассмотренные концентрации ионов фонового электролита соответствуют условиям проведения экспериментов титрования ДНК-аптамера к АТФ [Slavkovic et al., 2020]. Парциальные заряды на молекулах АМФ и ГМФ соответствовали аналогичным зарядам нуклеотидов в силовом поле parmbsc1.

Протокол моделирования включал: первоначальное повышение температуры системы от 0 до 300 К за 500 пс в NVT-ансамбле с наложением ограничений на комплекс «ДНК-аптамер-лиганд» для уравнивания молекул воды с использованием модифицированного термостата Берендсена (V-rescale), затем 5 нс уравнивания системы в целом без наложения ограничений в NVT-ансамбле при 300 К, затем следовало накопление траектории в NPT-ансамбле при давлении в 1 бар и температуре 300 К на протяжении 150 нс с использованием изотропного баростата Паринелло – Рамана. При проведении МД-расчетов использовался шаг интегрирования 1 фс на этапе уравнивания систем и 2 фс на этапе накопления траектории. При использовании шага интегрирования 2 фс применялся алгоритм LINCS [Hess et al., 1997] для ограничений колебаний водородных связей. Радиусы обрезания в 1,0 нм для дисперсионных и близкодествующих электростатических взаимодействий использовались согласно рекомендации авторов силового поля parmbsc1 [Ivani et al., 2015]. Дальнедействующие электростатические взаимодействия учитывались с использованием суммирования методом «частица-сетка» Эвальда. Для каждой структуры свободного аптамера и в комплексе с АМФ и ГМФ проводился расчет трех траекторий с небольшим смещением молекул АТФ и ГМФ в полости сайта в стартовой конфигурации, а также с использованием рандомизированной генерации максвелловского распределения по скоростям. Расчет среднеквадратичного отклонения положения атомов вдоль траектории молекулярной динамики усреднялся по трем траекториям для неводородных атомов относительно первого кадра траектории. Расчет заселенности водородных связей проводился в программе VMD 1.8 с усреднением значений по трем траекториям.

## Результаты

Согласно имеющимся представлениям о структуре комплекса «аптамер-АМФ», полученным методом двумерного ЯМР [Lin, Patel, 1997], олигонуклеотидная последовательность, состоящая из 27 нуклеотидов, сворачивается в шпильку таким образом, чтобы в середине шпильки образовалась внутренняя петля, формирующая два одинаковых сайта связывания молекул аденозина. Внутренняя петля содержит 6 пуриновых нуклеотидов (5 гуанинов и 1 аденин), которые попарно (Г7 | Г8, Г6 | Г19, А20 | Г21) образуют два разделенных сайта связывания в виде карманов (рис. 2, а). Оба кармана с внешних сторон закрыты аденинами А10 и А23, которые могут

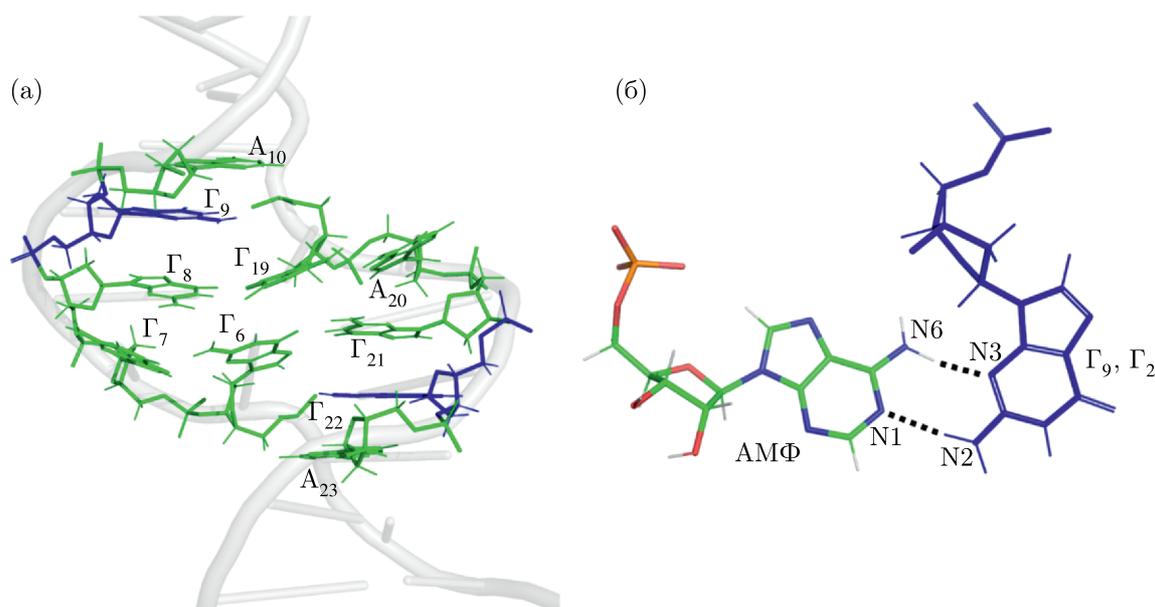


Рис. 2. а) Структура внутренней петли ДНК аптамера; б) иллюстрация образования двух водородных связей между молекулой АМФ и гуанинов в полости сайта связывания

стабилизировать связанные молекулы АМФ стэкинг-взаимодействием. Внутри карманов находятся гуанины Г22 и Г9, которые образуют по две водородные связи с каждой молекулой АМФ (рис. 2, б) и являются ключевым стабилизирующим фактором комплексообразования [Biniuri, Albada, Willner, 2018]. Такое предположение сделано на основе наблюдений, что замещение этих гуанинов на аденин, цитозин или тимин приводит к исчезновению связывания [Huizenga, Szostak, 1995; Lin, Patel, 1997; Xie, Eriksson, Zhang, 2020]. Также авторы в работе [Xie, Eriksson, Zhang, 2020] выделяют существенный вклад стэкинг-взаимодействия в стабилизацию АМФ в сайте связывания аптамера.

Детальный анализ комплекса аптамера с аденозинами выделяет основные факторы стабилизации, однако не раскрывает механизм селективности и этапы комплексообразования. В других работах также показано [Xia, Yuan, Fang, 2013; Zhang, Oni, Liu, 2017], что ДНК-аптамер в водном растворе при физиологических условиях обретает конформацию шпильки. Далее аптамер в такой конформации вступает в комплексообразование с производными аденина, при этом с производными гуанина, тимина и цитозина комплексы не образуются.

Для выявления дополнительных деталей механизма связывания мы провели сравнительное исследование конформационной стабильности комплексов аптамера с АМФ и ГМФ, а также стабильность сайта связывания без связанного лиганда. В качестве молекулы сравнения был выбран гуанозинмонофосфат (ГМФ), поскольку гуанин также является пуриновым основанием, как и аденин, со схожими стерическими характеристиками.

В результате МД-расчета аптамера в свободном состоянии за первые 15 нс наблюдается разрушение полости сайтов связывания, а из парных пуринов во внутренней петле образуются три пары вдоль оси спирали с неканоническим спариванием (рис. 3). С другой стороны, комплекс с двумя молекулами АМФ существует 150 нс с незначительным отклонением от первоначальной структуры, полученной в ЯМР. Комплекс двух молекул АМФ с аптамером формируется за счет образования каждой молекулой АМФ двух водородных связей с гуанинами Г9 и Г22, а также стэкинг-взаимодействием с образованием стопки из 6 нуклеотидов (A10 | АМФ1 | Г19 | Г6 |

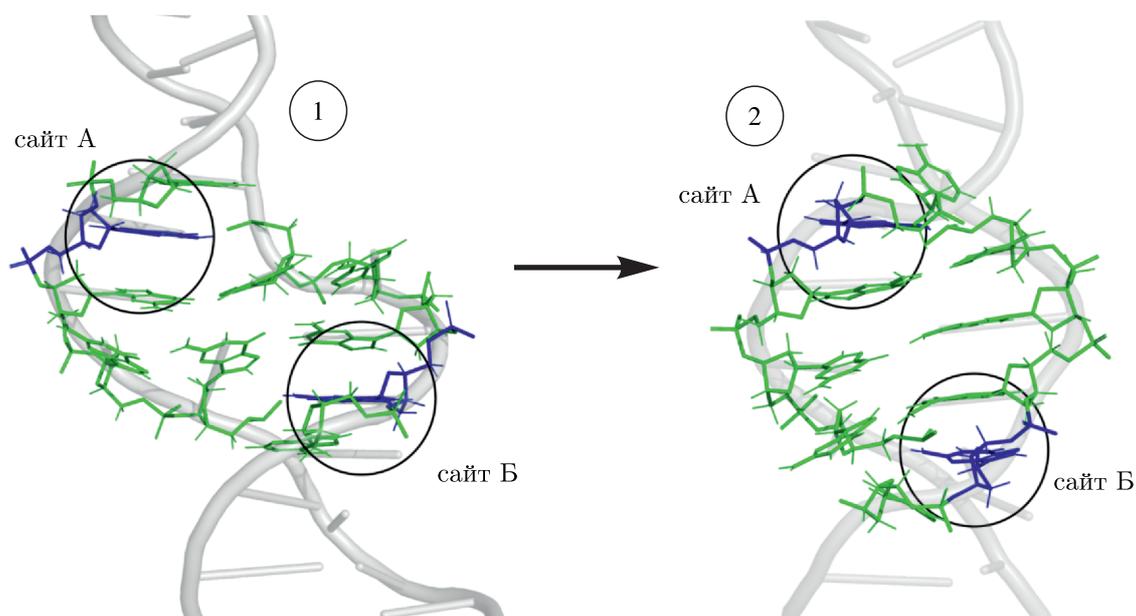


Рис. 3. Структуры внутренней петли аптамера в комплексе с двумя АМФ (слева) и в свободном состоянии (справа)

АМФ2 | А23), что соответствует предыдущим результатам исследований [Biniuri, Albada, Willner, 2018; Lin, Patel, 1997; Xie, Eriksson, Zhang, 2020].

Сравнение среднеквадратичных отклонений (СКО) структур вдоль траектории молекулярной динамики показывает, что небольшое изменение в структуре сайтов связывания наблюдается для свободного аптамера в первые 15 наносекунд и связано с разрушением полости сайта, а затем структура внутренней петли обретает равновесие (рис. 4). С другой стороны, структура сайтов в комплексе с АМФ практически не меняется во времени на протяжении 150 нс, что свидетельствует о стабильности комплекса (рис. 4). Для свободного и связанного с АМФ аптамера наблюдаются значительные флуктуации в СКО для движений части олигомера, не включающей сайты связывания. Такая динамика ДНК не противоречит имеющимся представлениям о подвижности концевых и петлевых нуклеотидов при тепловой динамике при комнатной температуре в шпильке ДНК [Banavali, Roux, 2005].

Замещение АМФ на ГМФ приводит к разрушению архитектуры сайтов связывания к 30 нс, однако молекулы ГМФ в разных повторениях МД-расчетов некоторое время удерживаются в комплексе одной водородной связью с гуанинами Г9 и Г22 (рис. 4, 5). Разрушение архитектуры сайтов происходит вследствие нарушения стэкинг-взаимодействия между Г19 и Г6, поскольку молекулы ГМФ, удерживаясь лишь одной водородной связью, разворачиваются в полости сайтов на угол около 40 градусов (рис. 5). Нахождение молекул ГМФ в полости сайта связывания аптамера обусловлено схожими факторами стабильности, как и в случае с АМФ, однако для такого связывания может существовать энергетический барьер, который можно выявить при исследовании энергетического профиля реакции. Разрушение архитектуры сайта относительно ЯМР-структуры может быть косвенным свидетельством термодинамической невыгодности связывания гуанозиновых производных с данным аптамером.

Для анализа стабильности комплексов и свободного аптамера, формируемых посредством образования водородных связей, мы провели расчеты кинетики заселенности характерных водородных связей вдоль траектории молекулярной динамики (таблица 1). В качестве эталона сравнения можно рассматривать заселенность центральной водородной связи с донором N1 и акцептором N3 в канонических парах «гуанин–цитозин» и «аденин–тимин», которые равны 54,53 %

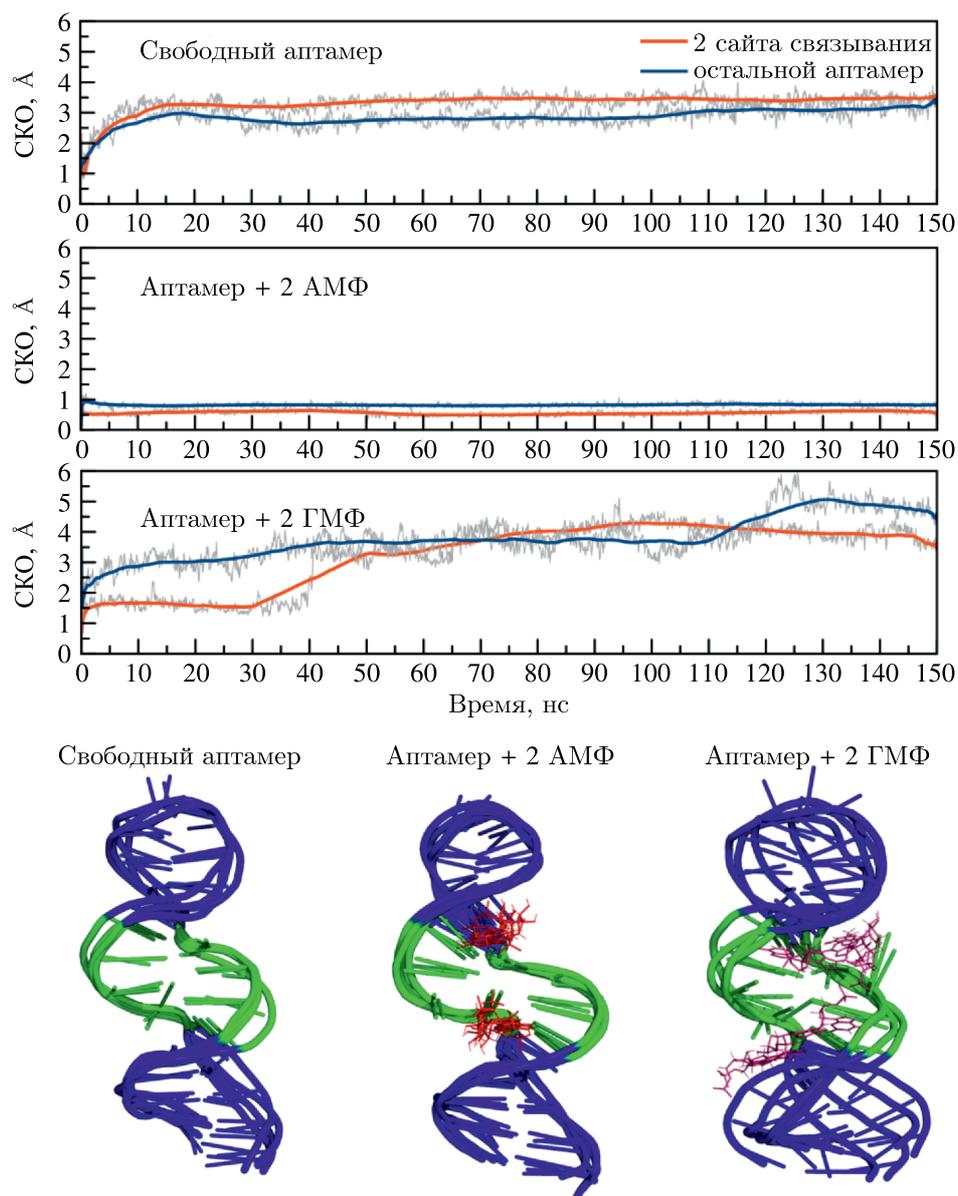


Рис. 4. Среднеквадратичное отклонение (СКО) аптамера в комплексе с двумя АМФ, двумя ГМФ и в свободном состоянии на протяжении 150 нс молекулярной динамики. Изображены наложения четырех конфигураций вдоль траектории динамики для 3 случаев, при этом все структуры выровнены относительно нуклеотидов сайтов связывания

и 56,13 % соответственно. Заселенности двух Н-связей, образующих комплекс АМФ с гуанинами в полости сайтов связывания (маркировка h1 и h2 на рис. 6), имеют значения для двух молекул АМФ h1 = 41,62 %; 51,26 % и h2 = 39,83 %; 42,27 %, сравнимые со значениями для канонических пар. Такие величины свидетельствуют о прочности образования комплекса на протяжении всей траектории длительностью 150 нс. В отличие от АМФ молекулы ГМФ образуют слабые водородные связи с гуанинами Г9 и Г19, которые характеризуются заселенностями для связи (N2-H...N3) 8,32 % и 12,32 %, а также для связи (N1-H...N3) 0,33 % и 2,2 % соответственно. Такие заселенности связей с ГМФ свидетельствуют о быстром разрушении комплекса в сайте связывания.

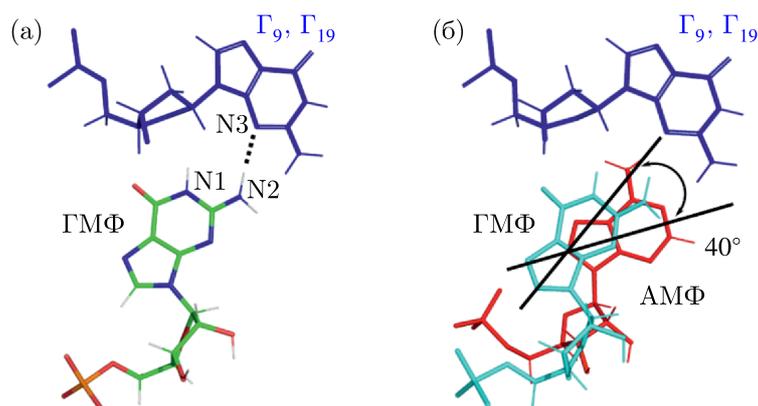


Рис. 5. а) Комплекс ГМФ с гуанином в сайте связывания аптамера; б) наложение молекул ГМФ и АМФ, иллюстрирующее поворот молекулы ГМФ на 40 градусов в полости сайта связывания

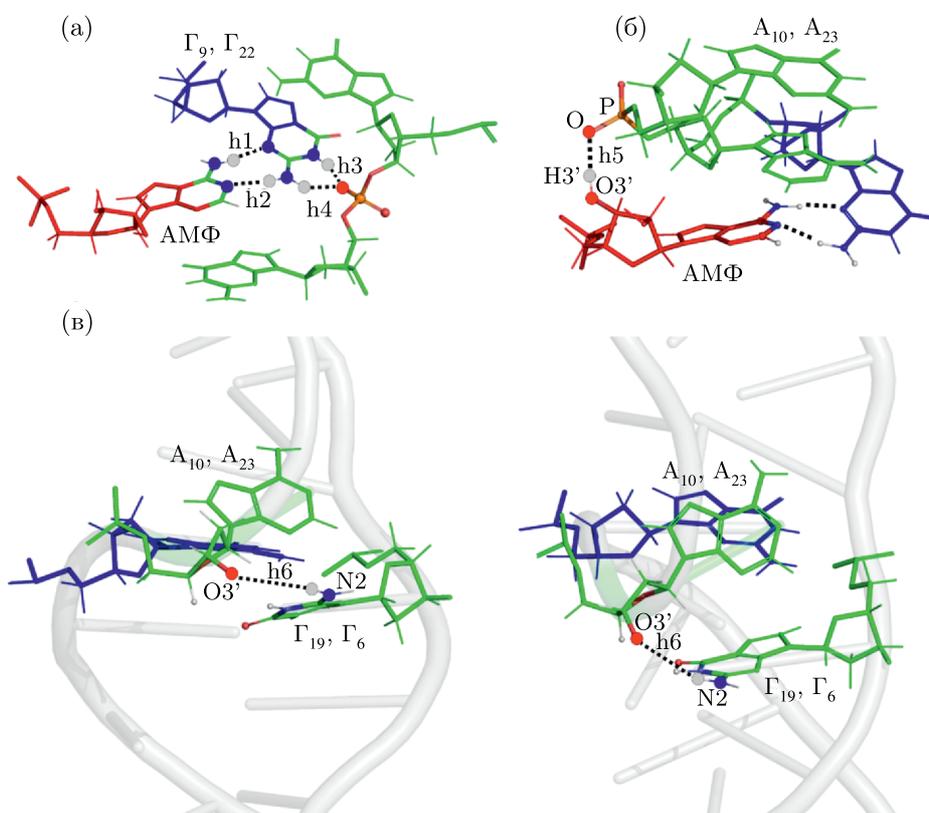


Рис. 6. а) Образование водородных связей между гуанином в сайте связывания и противоположным атомом кислорода фосфата; б) образование связи водорода О3' атома рибозы лигандов с кислородом ближайшей фосфатной группы; в) образование характерного изгиба сахарно-фосфатного остова в районе аденинов А10 и А23, который позволяет установить слабые водородные связи атомов О3' рибозы с атомами N2 противоположных Г19 и Г6 соответственно

Более детальное сравнение уравновешенных структур свободного аптамера и в комплексе с АМФ и ГМФ выявило дополнительные общие факторы стабилизации пуриновых нуклеотидов внутренней петли, а также исключительные для свободного аптамера. В обоих случаях обнаружена стабилизация гуанинов Г9 и Г22 за счет дополнительных водородных связей с фосфатной

группой противоположной цепи (рис. 6, *a*). В случае комплекса с АМФ Н-связи h3 и h4 (маркировка на рис. 6, *a*) имеют заселенность для молекулы гуанина, ближайшего к петле шпильки, 20,01 % и 7,97 %, а для другого гуанина во втором сайте – 23,35 % и 1,40 % соответственно (таблица 1). В случае свободного аптамера Н-связи h3 и h4 имеют заселенность для молекулы гуанина, ближайшего к петле шпильки, 37,37 % и 1,62 %, а для другого гуанина – 28,51 % и 3,21 % соответственно. По-видимому, это структурная особенность ДНК-аптамера, обеспечивающая стабильность гуанинов Г9 и Г19 в сайте связывания, а при образовании комплекса с АМФ формируется 4 Н-связи h1, h2, h3 и h4, удерживающие прочно молекулы АМФ. Такой стабилизации с молекулами ГМФ не наблюдается.

Таблица 1. Заселенность водородных связей в структурах комплексов аптамера с АМФ и ГМФ

Тип комплекса	Донор – Акцептор		Заселенность (СКО), %
Комплекс аптамера с АМФ	Г11–Ц17	N1–N3	54,53 (0,81)
	A24–T4	N1–N3	56,13 (0,78)
	(h1) Г9–АМФ	N2–N1	41,62 (0,92)
	(h2) Г9–АМФ	N3–N6	39,83 (0,89)
	(h1) Г22–АМФ	N2–N1	51,26 (0,87)
	(h2) Г22–АМФ	N3–N6	42,27 (0,92)
	(h3) Г9–Г19	N1–O2P	20,01 (1,12)
	(h4) Г9–Г19	N2–O2P	7,97 (0,15)
	(h3) Г22–Г6	N1–O2P	23,35 (1,05)
	(h4) Г22–Г6	N2–O2P	1,40 (0,19)
	(h5) АМФ–Г11	O3'–O1P	47,42 (0,81)
(h5) АМФ–A24	O3'–O1P	53,63 (0,82)	
Свободный аптамер	(h6) Г19–Г11	N2–O1P	15,58 (1,43)
	(h6) Г6–Г24	N2–O1P	15,66 (1,31)
	(h3) Г9–Г19	N1–O2P	37,37 (1,43)
	(h4) Г9–Г19	N2–O2P	1,62 (0,25)
	(h3) Г22–Г6	N1–O2P	28,51 (1,52)
	(h4) Г22–Г6	N2–O2P	3,21 (0,88)
Комплекс аптамера с ГМФ	ГМФ–Г9	N2–N3	8,32 (2,43)
	ГМФ–Г9	N1–N3	0,33 (0,11)
	ГМФ–Г22	N2–N3	12,32 (2,78)
	ГМФ–Г22	N1–N3	2,2 (1,32)
	(h5) ГМФ–Г11	O3'–O1P	27,36 (3,09)
	(h5) ГМФ–Г24	O3'–O1P	17,11 (1,19)

В случае уравновешенного комплекса аптамера с АМФ и ГМФ наблюдается дополнительная стабилизация за счет Н-связи водорода O3' атома рибозы лигандов с кислородом ближайшей фосфатной группы (маркировка h5 на рис. 6, *b*). Такая стабилизация возможна при стерическом соответствии пуриновых нуклеотидов характерному размеру сайта связывания, при этом относительно небольшие пиримидиновые нуклеотиды цитозин и тимин, вероятнее всего, не смогли бы образовать такие водородные связи одновременно с водородными связями с гуанинами Г9 и Г22 аптамера. Заселенности Н-связей h5 для молекул АМФ в разных сайтах равны 47,42 % и 53,63 %, а для молекулы ГМФ – 27,36 % и 17,11 % соответственно (таблица 1).

Дополнительный структурный эффект, не описанный ранее в литературе, был выявлен при расчете молекулярной динамики свободного аптамера, когда разрушается архитектура сайтов связывания молекул АМФ. В структуре аптамера наблюдается появление характерного изгиба сахарно-фосфатного остова в районе аденинов A10 и A23, который позволяет установить слабые водородные связи атома кислорода O3' рибозы A10 и A23 с атомами N2 противоположных

Г19 и Г6, соответственно (маркировка h6 на рис. 6, в). Заселенность этих связей равна 15,58 % и 15,66 % соответственно. В такой конфигурации возникает динамическая структура водородных связей между хугстиновскими спариваниями (Г8 | Г19) и (Г6 | Г21), с одной стороны, и водородными связями (А10 | Г19) и (А23 | Г6), с другой стороны, которые в совокупности закрывают гуанины Г9 и Г22 и полость сайта связывания от внешних лигандов (рис. 7). Связывание лигандов с гуанинами в полости сайтов должно испытывать некоторый стерический барьер, начальным этапом преодоления которого является конкуренция за водородные связи с кислородами О3' А10 и А23. Для анализа различий в конкуренции за водородные связи с кислородами О3' А10 и А23 между АМФ и ГМФ можно сравнить свободные энергии связывания в этих комплексах. Недавние теоретические исследования неоднозначных спариваний азотистых оснований (wobble base pairs) [Das, Lyngdoh, 2012] в третьем положении кодона в кодон-антикодонных дуплексах показали, что наиболее выгодные комплексы в сравнении изменения свободной энергии образуются между гаунином и аденином. Расчеты в этой работе проводились в газовой фазе с использованием функционала В3LYP и валентно-расщепленного базисного набора 6-31(d,p). Чтобы исключить влияние парциального заряда фосфатных групп нуклеотидов на величину свободной энергии, в качестве структур рассматривались азотистые основания нуклеотидов с замещением на метильную группу по позиции азота, соединяющего с рибозой.

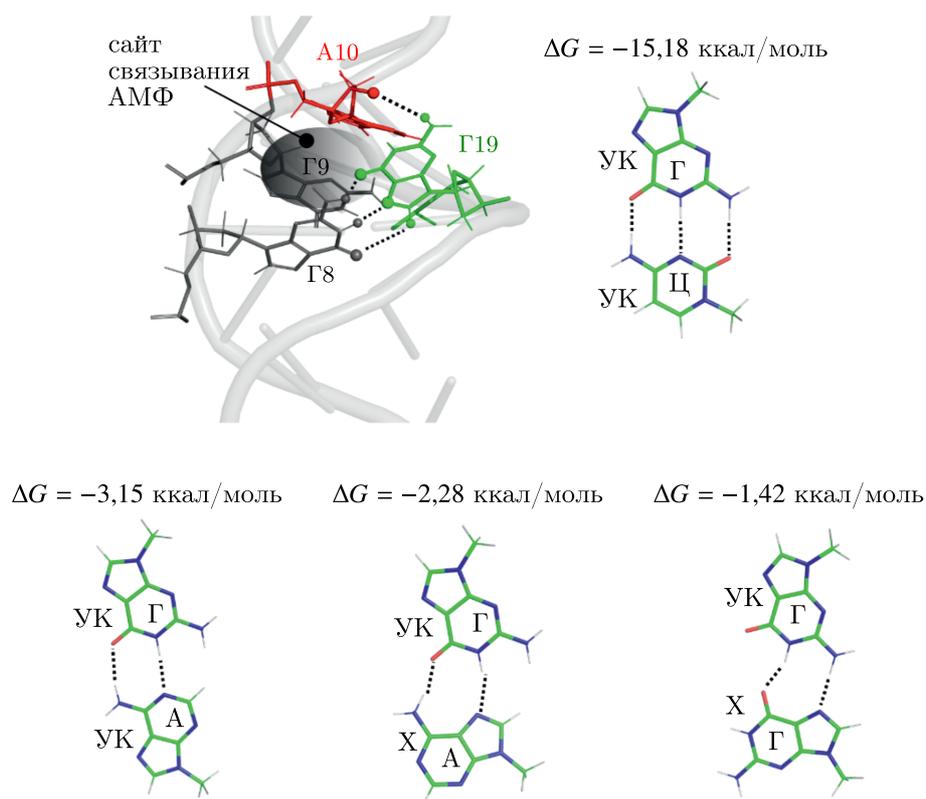


Рис. 7. Структура сайта связывания АМФ свободного аптамера, закрытая тремя нуклеотидами — А10, Г19 и Г8. Ориентации пар аденина и гуанина, образующие наиболее энергетически выгодные комплексы в расчетах с использованием теории функционала плотности [Das, Lyngdoh, 2012]

Расчеты с использованием теории функционала плотности показали, что наибольший выигрыш в свободной энергии наблюдается, когда оба нуклеотида в конфигурации Уотсона–Крика (УК | УК) с  $\Delta G = -3,15$  ккал/моль и смешанной, когда гуанин в конфигурации УК, а аденин — в хугстиновской (Х) (конфигурация (УК | Х)) с  $\Delta G = -2,28$  ккал/моль (рис. 7). При

этом наилучшей конфигурации комплекса двух гуанинов соответствует конфигурация (X | УК) с  $\Delta G = -1,42$  ккал/моль. Выигрыш в свободной энергии таких пар незначителен в сравнении со свободной энергией образования канонической пары «гуанин–цитозин» (рис. 7), однако в сравнении с другими неканоническими парами полученные изменения свободной энергии значительны. Различие между гуанином и аденином в связывании с другим гуанином свидетельствует о том, что аденозин с большей эффективностью, чем гуанозин, способен нарушить динамическую структуру водородных связей между кислородами O3' A10 и A23 и гуанинов Г19 и Г6. Затем аденозин может встроиться за счет стэкинг-взаимодействия между основаниями внутрь сайта и образовать водородные связи с Г9 и Г22. Такое различие в свободной энергии может оказывать существенное влияние на полный процесс связывания лиганда с аптамером, обуславливая сродство ДНК-аптамера к аденозиновым производным.

## Заключение

В настоящем молекулярно-динамическом сравнительном исследовании комплексов аптамера к аденозиновым производным с молекулами АМФ и ГМФ, а также аптамера в свободном состоянии выявлены новые факторы стабилизации молекул АМФ в полости сайта связывания в дополнение к описанным ранее в литературе [Lin, Patel, 1997; Xie, Eriksson, Zhang, 2020]. Также предложена схема изолирования сайта связывания от внешних лигандов в свободном состоянии аптамера за счет особой внутренней упаковки гуанинов во внутренней петле шпильки. Такая упаковка может являться ключевым фактором специфичного отбора молекул аденозинового производного в сравнении с остальными нуклеотидами. Предложенная схема качественно соответствует экспериментальным данным, согласно которым аптамер в растворе обретает конформацию шпильки с формированием сайта связывания, при этом образованный сайт проявляет высокую специфичность при взаимодействии только с аденозиновыми производными. Более детальная картина процесса образования комплекса с оценкой энергетических барьеров может быть получена в рамках исследования профиля свободной энергии диссоциации, что будет проведено в дальнейшем. На данном этапе исследований предложенная схема выделяет основные позиции нуклеотидов в последовательности аптамера, которые играют ключевую роль по стабилизации сайтов связывания, образованию особой внутренней упаковки гуанинов в несвязанном состоянии аптамера и изолировании этих сайтов от внешних лигандов. В перспективе дальнейших исследований можно рассматривать варьирование этих нуклеотидов путем точечных мутаций, что может позволить регулирование аффинности данного аптамера к производным аденозина в сторону улучшения или ухудшения сродства. С другой стороны, замена некоторых гуанинов в структуре сайтов, отвечающих за молекулярное узнавание аденинов, может позволить реконструирование аптамера под специфичность к производным гуанозина, а также других молекулярных мишеней, имеющих схожую с пуриновыми основаниями стерическую структуру.

## Список литературы (References)

- Abraham M.J. et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. — 2015. — Vol. 1–2. — P. 19–25.
- Banavali N.K., Roux B.* Free energy landscape of A-DNA to B-DNA conversion in aqueous solution // *J. Am. Chem. Soc.* — 2005. — Vol. 127, no. 18. — P. 6866–6876.
- Biniuri Y., Albada B., Willner I.* Probing ATP/ATP-Aptamer or ATP-Aptamer Mutant Complexes by Microscale Thermophoresis and Molecular Dynamics Simulations: Discovery of an ATP-Aptamer Sequence of Superior Binding Properties // *J. Phys. Chem. B*. — 2018. — Vol. 122, no. 39. — P. 9102–9109.

- Cai S. et al.* Investigations on the interface of nucleic acid aptamers and binding targets // *Analyst.* — 2018. — Vol. 143, no. 22. — P. 5317–5338.
- Chatterjee B. et al.* Nanozymes and aptamer-based biosensing // *Mater. Sci. Energy Technol.* — 2020. — Vol. 3. — P. 127–135.
- Das G., Lyngdoh R. H.* Role of wobble base pair geometry for codon degeneracy: Purine-type bases at the anticodon wobble position // *J. Mol. Model.* — 2012. — Vol. 18, no. 8. — P. 3805–3820.
- Gotrik M. R. et al.* Advancements in Aptamer Discovery Technologies // *Acc. Chem. Res.* — 2016. — Vol. 49, no. 9. — P. 1903–1910.
- Hermann T., Patel D. J.* Adaptive recognition by nucleic acid aptamers // *Science.* — 2000. — Vol. 287, no. 5454. — P. 820–825.
- Hess B. et al.* LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations // *J. Comput. Chem.* — 1997. — Vol. 18, no. 12. — P. 1463–1472.
- Huizenga D. E., Szostak J. W.* A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP // *Biochemistry.* — 1995. — Vol. 34, no. 2. — P. 656–665.
- Ivani I. et al.* Parmbsc1: A refined force field for DNA simulations // *Nat. Methods.* — 2015. — Vol. 13, no. 1. — P. 55–58.
- Kim S. H., Thoa T. T. T., Gu M. B.* Aptasensors for environmental monitoring of contaminants in water and soil // *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* — 2019. — Vol. 10. — P. 9–21.
- Lin C. H., Patel D. J.* Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-DNA aptamer complex: Distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamers complexed to AMP // *Chem. Biol.* — 1997. — Vol. 4, no. 11. — P. 817–832.
- McConnell E. M., Nguyen J., Li Y.* Aptamer-Based Biosensors for Environmental Monitoring // *Front. Chem.* — 2020. — Vol. 8.
- Munzar J. D. et al.* Complementary oligonucleotides regulate induced fit ligand binding in duplexed aptamers // *Chem. Sci.* — 2017. — Vol. 8, no. 3. — P. 2251–2256.
- Paul F., Weikl T. R.* How to Distinguish Conformational Selection and Induced Fit Based on Chemical Relaxation Rates // *PLoS Comput. Biol.* — 2016. — Vol. 12, no. 9.
- Ren Q. et al.* Aptamer-functionalized nanomaterials for biological applications // *Mater. Chem. Front.* — 2020.
- Slavkovic S. et al.* Thermodynamic analysis of cooperative ligand binding by the ATP-binding DNA aptamer indicates a population-shift binding mechanism // *Sci. Rep.* — 2020. — Vol. 10, no. 1.
- Wang Y. et al.* Metal-organic frameworks for virus detection // *Biosens. Bioelectron.* — 2020. — Vol. 169.
- Xia T., Yuan J., Fang X.* Conformational dynamics of an ATP-binding DNA aptamer: A single-molecule study // *J. Phys. Chem. B.* — 2013. — Vol. 117, no. 48. — P. 14 994–15 003.
- Xie Y. C., Eriksson L. A., Zhang R. B.* Molecular dynamics study of the recognition of ATP by nucleic acid aptamers // *Nucleic Acids Res.* — 2020. — Vol. 48, no. 12.
- Zhang Z., Oni O., Liu J.* New insights into a classic aptamer: Binding sites, cooperativity and more sensitive adenosine detection // *Nucleic Acids Res.* — 2017. — Vol. 45, no. 13. — P. 7593–7601.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC.*