

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ МИШЕНЕЙ НА БИОЧИПАХ ПРИ БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Головкин М. В., Матвеева О. В., Нечипуренко Ю. Д.

Гибридизация олигонуклеотидных зондов с мишенями на поверхности биочипов описана в рамках модели равновесной адсорбции. Рассмотрена энергетическая изотерма гибридизации (ЭИГ) — зависимость интенсивности флуоресценции ячейки биочипа от энергии гибридизации соответствующего зонда и мишени. Показано, что варьирование отношения концентраций зондов и мишеней сдвигает точку перегиба S-образного графика ЭИГ как вдоль оси энергий гибридизации, так и вдоль оси интенсивности флуоресценции ячейки. Это позволяет объяснить особенности поведения кривых ЭИГ, наблюдаемые в экспериментах на биочипах.

Введение. В настоящее время гибридизация на олигонуклеотидных биочипах приобретает все большую популярность в биологических исследованиях и начинает находить применение в медицине. Биочипы применяются в исследованиях геномов методом однонуклеотидного полиморфизма (SNP), при анализе экспрессии генов (Schna and Shalon, 1995), при детекции и характеристизации болезнетворных микроорганизмов (Kozal et al., 1996; Mikhailovich et al., 2008) и т.д.

Олигонуклеотидные зонды, иммобилизованные на подложках биочипов, обычно представляют собой однонитевые ДНК длиной 20–70 нуклеотидов. Зонды способны образовывать комплексы с комплементарными молекулами ДНК и РНК, находящимися в анализируемом растворе. Молекулы мишеней метятся при помощи флуоресцирующей (или радиоактивной) метки, что позволяет по уровню интенсивности излучения от участка биочипа, содержащего комплементарные мишеням зонды, определять параметры гибридизации зондов с мишенями. Если последовательность нуклеотидов в мишени полностью комплементарна последовательности зонда, то эти молекулы гибридизуются с образованием стабильного «совершенного дуплекса» (perfect-match duplex). Присутствие же в дуплексе даже одной некомплементарной пары при-

водит к образованию гораздо менее стабильного, т.н. «несовершенного дуплекса» (mismatch duplex). Всего на одном чипе может находиться от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч ячеек, каждая из которых может содержать зонды как с различной нуклеотидной последовательностью, так и различной плотностью их расположения на поверхности чипа (различной концентрацией). После проведения одного-единственного измерения возможно получение данных о содержании в мишенях участков, комплементарных зондам.

В данной работе рассмотрена физическая модель, описывающая связывание на чипах как процесс равновесной адсорбции. Это позволяет приблизиться к решению задачи количественного анализа данных, получаемых в экспериментах с биочипами. Известно, что изотерма Ленгмюра, которой пользуются для описания адсорбции ДНК и РНК мишеней на биочипах, связана с уравнениями химического равновесия в растворе (эта изотерма может быть выведена из условий равновесия). Здесь мы проследим эту связь, чтобы далее воспользоваться параметрами изотермы Ленгмюра для проведения анализа гибридизации мишеней на биочипах при различных соотношениях концентраций молекул мишеней и зондов. Мы рассмотрим простейший случай: во-первых, набор ячеек с зондами, синтезированными для одной и той же молекулы мишени, во-вторых, будем пренебрегать кросс-гибридизацией (неспецифическим связыванием и связыванием с неполной комплементарностью между зондом и мишенью).

Мы исследуем здесь поведение так называемой «энергетической изотермы гибридизации» (ЭИГ) — кривой зависимости интенсивности флуоресценции данной ячейки биочипа от энергии гибридизации мишени и зонда, рассчитанной в предположении полной комплементарности. На основе сравнения результатов компьютерного моделирования ЭИГ с данными, полученными в результате экспериментов на биочипах, в ряде случаев можно количественно оценить параметры гибридизации (например, исходную концентрацию мишеней в эксперименте).

Термодинамическая модель адсорбции.

1. Равновесная система в растворе. Рассмотрим систему, в которой при постоянной температуре и постоянном давлении в растворе находятся молекулы олигонуклеотидов-«мишеней». Эти мишени могут образовывать комплексы с молекулами «зондов» (олигонуклеотидами с определенной последовательностью, химически пришитыми на под-

ложке чипа). Пусть эта система находится в равновесии: число образовавшихся за единицу времени комплексов зондов и мишеней равно числу распавшихся комплексов. Предположим также, что с каждым зондом может связаться только одна молекула мишени.

Пусть $[A]$ — концентрация не связанных (свободных) зондов в растворе, $[B]$ — концентрация не связанных молекул-мишеней, $[AB]$ — концентрация мишеней, связанных с зондами (то есть, концентрация комплексов), C_a — общая концентрация зондов, C_b — общая концентрация мишеней.

В растворе происходит реакция: $[A] + [B] \xrightleftharpoons{K} [AB]$. Константа равновесия в этой реакции определяется как:

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]}. \quad (1)$$

Поскольку

$$\begin{aligned} [A] &= C_a - [AB], \\ [B] &= C_b - [AB], \end{aligned} \quad (2)$$

то

$$K = \frac{[AB]}{(C_a - [AB])(C_b - [AB])}.$$

Обозначим посредством R долю занятых зондов:

$$R = \frac{[AB]}{C_a}. \quad (3)$$

Тогда из (1) – (3) получаем:

$$K = \frac{R \cdot C_a}{(C_a - R \cdot C_a)(C_b - R \cdot C_a)} = \frac{R}{(1 - R)(C_b - R \cdot C_a)}.$$

Отсюда:

$$R = \frac{K(C_b - R \cdot C_a)}{1 + K(C_b - R \cdot C_a)} \quad (4)$$

или, подставляя в (4) уравнения (2) и (3), получаем:

$$R = \frac{K \cdot [B]}{1 + K \cdot [B]}. \quad (5)$$

Уравнение (5) соответствует изотерме адсорбции Ленгмюра, которую используют для описания адсорбции мишеней на биочипах (Mei

et al., 2003; Hekstra et al., 2003; Burden et al., 2004; Halperin et al., 2004). В работах (Burden et al., 2004; Burden et al., 2006; Zhanget al., 2005) показано, что даже в тех случаях, когда система не достигла равновесия, но стремится к нему (что обычно имеет место в экспериментах на биочипах), учёт кинетики взаимодействия приводит к тому же типу уравнений, что и изотерма Ленгмюра.

Методика биочипов позволяет в одном эксперименте получать сразу сотни наборов данных для разных зондов, характеризующихся разными энергиями связывания с мишенью. Этот факт можно использовать для построения кривой принципиально другого типа, чем изотерма Ленгмюра — энергетической изотермы гибридизации (ЭИГ). Кривая ЭИГ, как мы покажем дальше, позволяет оценивать концентрации мишеней в растворе.

2. *Уравнение энергетической изотермы гибридизации.* Рассмотрим вначале интенсивность флуоресценции комплексов в отдельной ячейке чипа, пренебрегая фоновой интенсивностью флуоресценции при нулевой концентрации мишени в растворе. Пусть интенсивность флуоресценции комплексов в отдельной ячейке прямо пропорциональна доле занятых (связанных с мишенями) зондов в этой ячейке: $I = I_{\max} \cdot R$, где I_{\max} — константа пропорциональности для данной ячейки, равная интенсивности флуоресценции в случае, когда все зонды ячейки образовали комплексы с молекулами мишени, то есть $R = 1$. Тогда интенсивность флуоресценции ячейки, соответствующая изотерме Ленгмюра (5), записывается в виде:

$$I = I_{\max} \frac{K \cdot [B]}{1 + K \cdot [B]} \quad (6)$$

В случае, если мишень и зонд связываются только единственным, «правильным» образом, константа равновесия в реакции соответствует константе гибридизации мишени на чипе и связана с энергией гибридизации мишени и зонды в растворе ΔG_{pm} соотношением:

$$K = \exp(-b \times \Delta G_{pm}).$$

Здесь $b = \frac{1}{RT}$, где $R = 8,3144$ — универсальная газовая постоянная,

ΔG_{pm} — энергия гибридизации мишени и зонда с образованием совершенного дуплекса. Отметим, что константа связывания мишени с зондом вблизи поверхности твердой фазы обычно меньше, чем константа

гибридизации в растворе (Levicky and Horgan, 2005). В работе (Carlson and Heim, 2006) такое уменьшение объясняют пропорциональным уменьшением энергии связывания мишени на чипе по сравнению с энергией гибридизации в растворе.

В дальнейшем нас будут интересовать кривые, соответствующие зависимостям интенсивности флуоресценции от энергии гибридизации мишени и зонда (ЭИГ). По сути, каждая такая кривая представляет собой проекцию совокупности изотерм адсорбции с различными энергиями гибридизации на плоскость $[B] = \text{const}$.

Предположим, что в пределе $C_b \rightarrow \infty$ все зонды в ячейке будут связаны с молекулами мишеней, $R = 1$ и $I = I_{\max}$. Тогда

$$R = \frac{e^{-b \cdot \Delta G_{pm}} \cdot (C_b - R \cdot C_a)}{1 + e^{-b \cdot \Delta G_{pm}} \cdot (C_b - R \cdot C_a)}. \quad (7)$$

Решение этого квадратичного уравнения будет иметь вид:

$$R = M - \sqrt{M^2 - \frac{C_b}{C_a} e^{-b \cdot \Delta G_{pm}}}, \quad (8)$$

где $M = \frac{1}{2C_a} + \frac{C_b}{2C_a} e^{-b \cdot \Delta G_{pm}} + \frac{1}{2} e^{-b \cdot \Delta G_{pm}}$.

При заданных значениях C_a и C_b параметры этой кривой можно характеризовать её «верхней» асимптотой, когда доля занятых зондов стремится к максимальному значению (при $\Delta G_{pm} \rightarrow \infty$):

$$R_{\max} = \frac{C_b}{2(C_a + C_b)}, \quad (9)$$

и значением ΔG^* , соответствующим половинному значению флуоресценции (без учёта нулевого уровня флуоресценции):

$$\Delta G^* = -\frac{1}{b} \ln \left(\frac{2(C_a + C_b)^2}{2(C_a + C_b) - C_a C_b} \right). \quad (10)$$

Из рис. 1а видно, что кривая, соответствующая уравнению (8) имеет S-образную форму; отмечена точка перегиба кривой, имеющая координаты $\{(\Delta G^*; R_{\max}/2)\}$ (критическая точка). С помощью этой точки удобно рассматривать оба характерных параметра кривой (сдвиг по оси абсцисс и «сжатие» по оси ординат). При значениях абсциссы, превышающих значение ΔG^* , кривая в логарифмическом представлении (рис. 1б) имеет линейный характер.

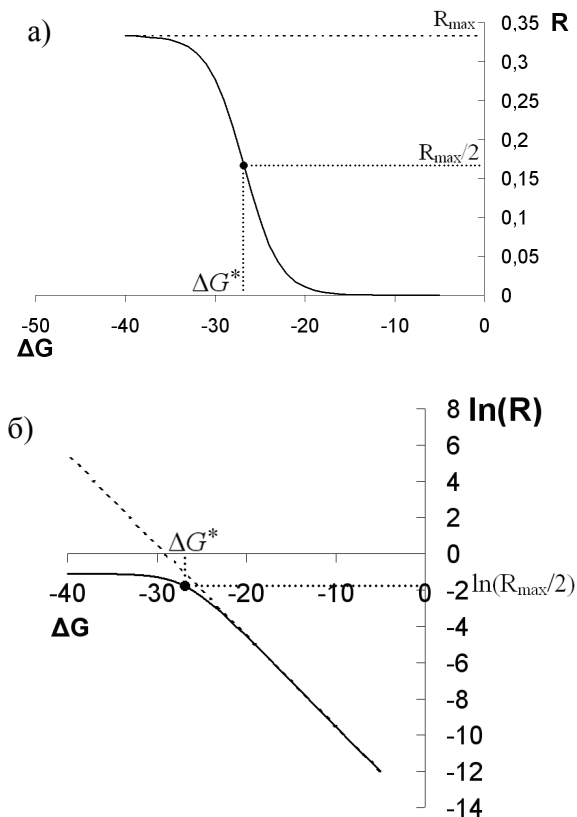


Рис. 1. Зависимость доли зондов, образовавших комплексы с мишенями от величины энергии гибридизации мишени и зонды в растворе $R(\Delta G_{pm})$ при концентрации зондов, в два раза превосходящей концентрацию мишеней. а) – зависимость в декартовых координатах (пунктиром отмечена горизонтальная асимптота кривой R_{\max}); б) зависимость в полулогарифмических координатах (пунктиром отмечена прямая, соответствующая линейному участку кривой).

Отметим, что в рамках принятых нами допущений экспериментальные зависимости ЭИГ должны соответствовать кривым $R(\Delta G_{pm})$, меняется лишь масштаб: горизонтальная асимптота каждой кривой будет равна $I_{\max} \cdot R_{\max}$. В дальнейшем мы будем рассматривать только кривые ЭИГ.

3. *Поведение кривой ЭИГ.* В зависимости от соотношения концентраций зондов и мишеней, координаты «критической точки» изменяются нелинейно (см. рис. 2).

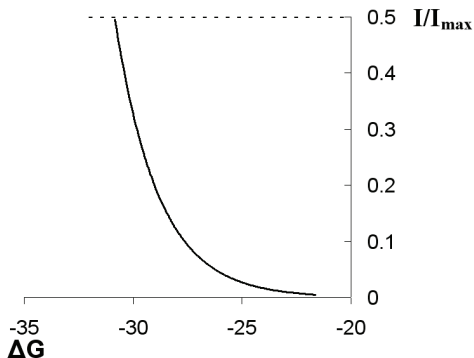


Рис. 2. Координаты «критической точки» для различных отношений концентраций мишеней и зондов C_b/C_a .

При увеличении отношения C_b/C_a ордината соответствующей критической точки на графике ЭИГ возрастает, пока не достигнет значения 0,5, соответствующего значению горизонтальной асимптоты $I = I_{\max}$ (все молекулы зондов на чипе образовали комплекс с мишенями). Из приведённых кривых видно, что в широком диапазоне значений концентраций C_a и C_b кривая ЭИГ имеет S-образную форму.

При уменьшении отношения C_b/C_a кривая ЭИГ будет смещаться в сторону уменьшения абсолютной величины ΔG_{pm} при одновременном уменьшении I (и максимальной интенсивности флуоресценции ячейки). В логарифмическом представлении эти же зависимости выглядят характерным образом: у них появляются линейные участки рис. 4а и б).

При уменьшении отношения C_b/C_a линейная часть кривых также смещается в сторону уменьшения абсолютной величины ΔG_{pm} . Определив расстояние по оси абсцисс между ними, исходя из (10) можно определить и отношения концентраций мишеней в растворе. Таким образом, имея две или более кривых ЭИГ для различных соотношений концентраций, можно на основании известных концентраций зондов в различных ячейках, вычислить исходную концентрацию мишеней в анализируемом растворе.

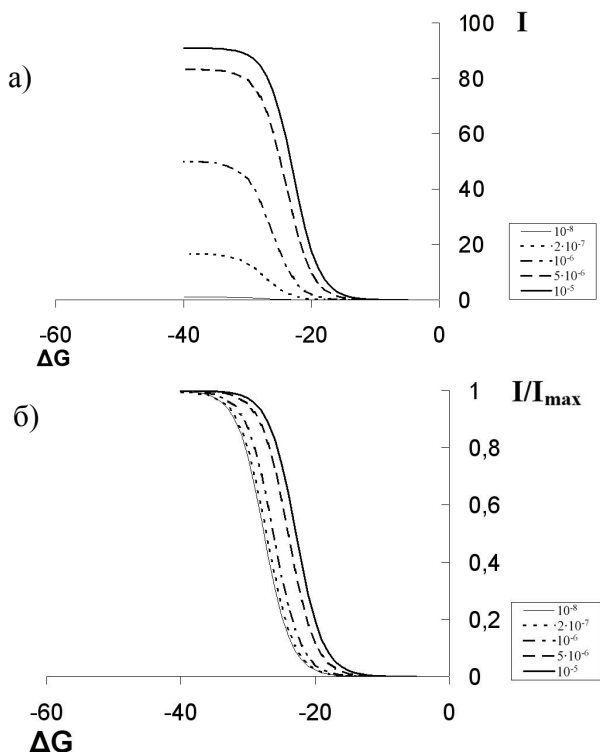


Рис. 3. Кривые ЭИГ при различных отношениях концентраций зондов и мишеней: в относительных единицах интенсивности флуоресценции (а); в нормированных на единицу значениях интенсивности флуоресценции (б). Для всех пяти кривых концентрация зондов равна 10^{-6} М.

Заметим, что при анализе экспериментальных данных (рис 2а) в работе (Hooyberghs et al.) было показано, что для ряда зондов имеют место кривые, сходные с представленными на рис. 3, 4. Однако авторы этой работы не смогли дать адекватную интерпретацию полученных ими результатов.

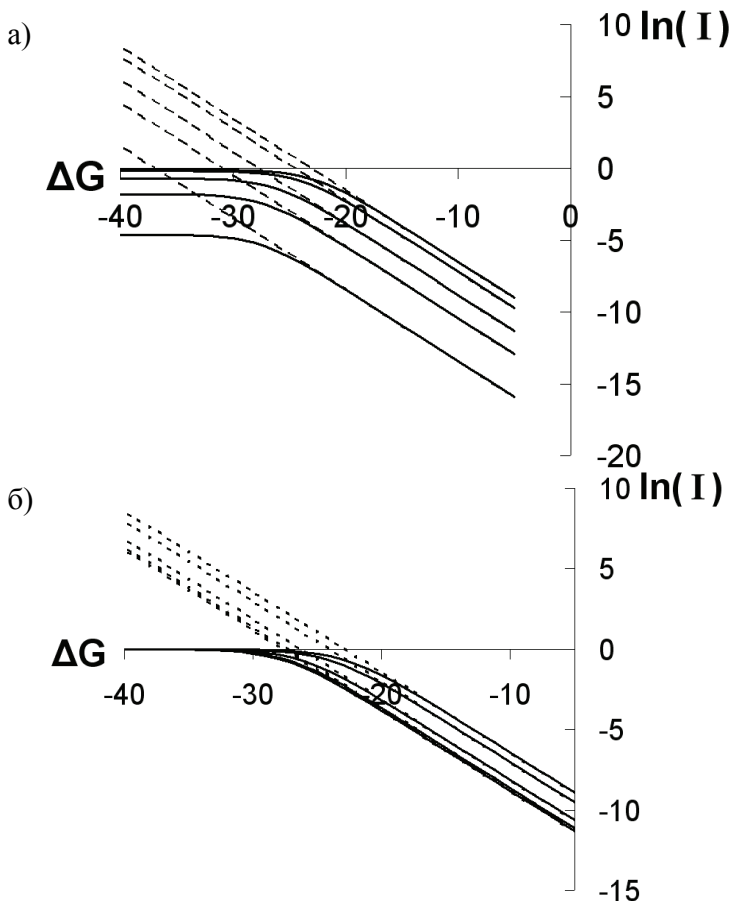


Рис. 4. Кривые ЭИГ при различных отношениях C_b/C_a в полулогарифмическом представлении: а) в относительных единицах интенсивности флуоресценции; б) в нормированных на единицу значениях интенсивности флуоресценции. Для всех пяти кривых концентрация зондов равна 10^{-6} М

Закключение. В данной работе продемонстрировано поведение изотермы адсорбции при изменении соотношений концентраций мишень-зонд. Показано, что в зависимости от соотношения концентраций зондов и мишеней кривая энергетической изотермы гибридизации мо-

жет смещаться как по оси энергии гибридизации ΔG , так и по оси интенсивности сигнала флуоресценции I . При помощи кривой ЭИГ в случае, когда имеются сигналы от набора ячеек для молекулы мишени одного типа, можно восстановить концентрацию этой молекулы в растворе. Таким образом, возникает принципиальная возможность оценить характерные свойства паттернов экспрессии генов в клетке.

Авторы благодарят за финансовую поддержку Программу Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и Российский фонд фундаментальных исследований (гранты 07-04-01031, 07-03-00492 и 08-04-01739).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burden, C. J., Pittelkow, Y. and Wilson, S. R. // *J. Phys.: Condens. Matter.* — 2006. — Vol. 18. — P. 5545–5565.
- Burden, C.J., Pittelkow, Y.E., Wilson, S.R. // *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 3. — Article 35.
- Carlson, E., Heim, T. // *Physica A.* — 2006. — Vol. 362. — P. 433–449.
- Halperin, A., Buhot, A., Zhulina, E.B. // *Clin. Chem.* — 2004. — Vol. 7. — P. 2254–2262.
- Hekstra, D., Taussig, A.R., Magnasco, M., Naef, F. // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31. — P. 1962–1968.
- Hooyberghs, J., Van Hummelen, P. and Carlson, E. // *Nucleic Acids Research.* — doi:10.1093/nar/gkp109.
- Kozal, M. J., Shah, N., Shen, N., Yang, R., Fucini, R., Merigan, T. C., Richman, D. D., Morris, D., Hubbell, E., Chee, M. and Gingeras, T. R. // *Nature Medicine.* — 1996. — Vol. 2. — P. 753–759.
- Levicky, R., Horgan, A. // *Trends Biotechnol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 143–149.
- Mei, R., Hubbell, E., Bekiranov, S., Mittmann, M., Christians, F.C., Shen, M.M., Lu, G., Fang, J., Liu, W.M., Ryder, T., Kaplan, P., Kulp, D., Webster, T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 11237–11242.
- Mikhailovich, V., Gryadunov, D., Kolchinsky, A., Makarov, A.A.; Zasedatelev, A. // *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology.* — 2008. — Vol. 30, no. 7. — P. 673–82.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. // *Science*. — 1995. — Vol. 270. — P. 467–70.

Zhang, Y., Hammer, D.A., Graves, D.J. // *Biophys. J.* — 2005. — Vol. 89. — P. 2950–2959.

PHYSICO-MATHEMATICAL MODELLING OF TARGET-PROBE BINDING ON MICROCHIPS AT BIOLOGICAL AND MEDICAL INVESTIGATIONS

Golovkin M. V., Matveeva O. V., Nechipurenko Yu. D.

The process of microarray oligo-target hybridization was modeled using equilibrium adsorption. The relationship between hybridization signal intensity and Gibbs free energy change for oligo-target duplex formation was our function of interest. The equilibrium adsorption model predicts S-shaped functional relationship between these two variables. We called the respective curve Energetic Hybridization Isotherm (EHI). It was demonstrated that change of target/probe ratio could result in shifts of the inflection point of S-shaped EHI curve along both axes. This study provides insights into EHI curves' behavior observed in microarray experiments.