

Поиск спейсера для иммобилизации фосфорорганических соединений через стрептавидин-биотиновую систему с помощью компьютерного моделирования

Белинская Д.А.¹, Гончаров Н.В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

²ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

d_belinskaya@mail.ru

Высокоаффинное связывание фосфорорганических соединений (ФОС) в кровеносном русле можно обеспечить с помощью ДНК- или РНК-аптамеров, представляющих собой короткие нити олигонуклеотидов. Экспериментальный метод систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) – основной способ поиска аптамеров в настоящее время. В процессе селекции аптамеров необходима иммобилизация молекулы-мишени через стрептавидин-биотиновый комплекс. Поскольку молекула отравляющего вещества имеет небольшие размеры, для увеличения ее доступности для связывания с аптамером необходимо использование спейсера между ФОС и биотином. В данной работе на примере параоксона с помощью компьютерного моделирования подбирался полимерный спейсер для иммобилизации ФОС. Были протестированы три спейсера: три звена полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четыре звена полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминоксепсил. Конформация комплекса биотинилированного параоксона со стрептавидином и процесс взаимодействия параоксона со связывающим фрагментом аптамера были смоделированы методами молекулярного докинга и молекулярной динамики. Оценка возможности биотинилированного параоксона связаться с аптамером проводилась путем анализа площади поверхности параоксона, доступной растворителю, и с помощью расчета свободных энергий связывания. Было показано, что только в случае использования аминоксепсила иммобилизованный параоксон может связаться с аптамером.

Ключевые слова: спейсер, иммобилизация, стрептавидин-биотиновая система, фосфорорганические соединения, аптамеры.

Search for a spacer for immobilization of organophosphates with the streptavidin-biotin system using computer simulations

Belinskaia D.A.¹, Goncharov N.V.^{1,2}

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences

²Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology

High-affinity binding of organophosphates (OPs) in the bloodstream could be achieved with the help of DNA- or RNA-aptamers, which are short strands of oligonucleotides. At present, the main method of selection of aptamers is the experimental method of systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). Immobilization of the target molecule through the biotin-streptavidin complex is required during the process of aptamers selection. Since OP molecule is small in size, it is necessary to use a spacer between the toxic agent and biotin to increase its accessibility for aptamer binding. In the presented study, the spacer for the immobilization of organophosphates (OPs) with the biotin-streptavidin system has been selected using the *in silico* tools based on the example of paraoxon. Three spacers were tested: three-step polyethylene glycol (3-PEG), four-step polyethylene glycol (4-PEG), and aminoethyl. The conformation of the complex of biotinylated paraoxon with streptavidin and the process of paraoxon interaction with the binding fragment of the aptamer were modeled by the molecular docking and molecular dynamics methods. The possibility of biotinylated paraoxon to bind with the aptamer was estimated by analyzing the solvent accessible surface area of paraoxon and by calculating the free binding energies. It has been shown that only in the case of using aminoethyl, immobilized paraoxon is able to bind with the aptamer.

Key words: spacer, immobilization, biotin-streptavidin system, organophosphates, aptamers.

1. Введение

Отравления фосфорорганическими соединениями (ФОС) занимают в общем числе экзотоксикозов одно из ведущих мест [1]. Эффективность антидотной, симптоматической и профилактической терапии можно существенно повысить за счет усиления детоксикации ФОС на первом этапе поступления яда в организм – в кровеносном русле, что позволит уменьшить токсическое действие ФОС на ацетилхолинэстеразу (АХЭ) нервно-мышечных и нейрональных синапсов. Высокоаффинное связывание ФОС в кровеносном русле можно обеспечить с помощью ДНК- или РНК-аптамеров, представляющих собой короткие нити олигонуклеотидов [2]. Основным способом поиска аптамеров в настоящее время является метод систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением. Процесс основан на поэтапной селекции и амплификации олигонуклеотидных последовательностей, обладающих максимальным сродством к молекуле-мишени [3]. Каждый цикл селекции начинается с инкубации аптамеров из стандартных библиотек с молекулой-мишенью. В процессе селекции аптамеров к высокомолекулярным соединениям для этапа инкубации молекула-мишень иммобилизуется через стрептавидин-биотиновый комплекс, затем к иммобилизованным мишеням добавляют олигонуклеотиды. Такой подход можно использовать и для иммобилизации ФОС, но поскольку молекула отравляющего вещества имеет небольшие размеры, для увеличения ее доступности для связывания с аптамером необходимо использование полимерного спейсера между ФОС и биотином. Цель представленного исследования – с помощью компьютерного моделирования на примере параоксона протестировать возможность применения следующих спейсеров: трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминокгексила. Химические формулы параоксона, связанного с биотином с помощью спейсеров, представлены на рисунке 1.

2. Методы

2.1. Подготовка трехмерных моделей молекул

Для расчетных экспериментов в качестве трехмерной модели стрептавидина использовались данные рентгеноструктурного анализа молекулы стрептавидина со связанной молекулой биотина, код структуры 3гу2 [4], из базы данных белковых структур [5]. Трехмерные модели биотинилированного параоксона (рис. 1) и связывающий фрагмент аптамера были построены и

затем минимизированы методом сопряженных градиентов с помощью программы NureChem 8.0.8 [6].

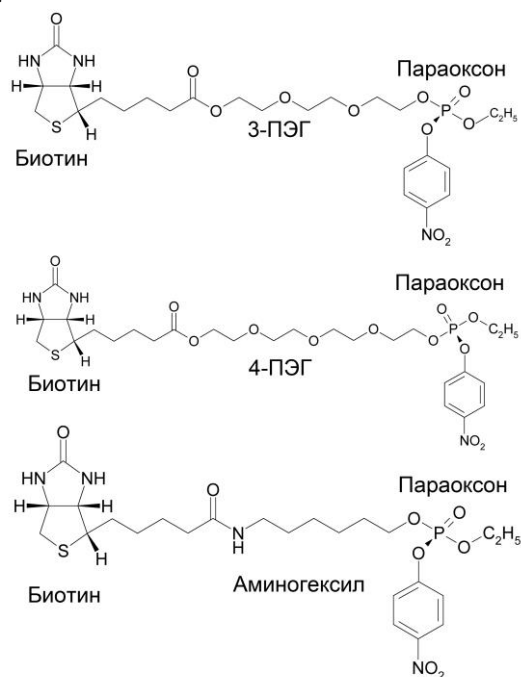


Рис. 1. Параоксон, биотинилированный с помощью трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминокгексила в качестве спейсеров.

2.2. Молекулярный докинг

Молекулярный докинг биотинилированного параоксона в центр связывания стрептавидина проводили с помощью программного пакета Autodock4.0 [7]. В исследуемом центре связывания белка строили решетку аппроксимации размером 60 узлов в x -, y -, и z -направлениях и с шагом 0.0375 нм. Для поиска оптимальных конформаций комплексов белок-лиганд был использован Ламарковский генетический алгоритм [7] с числом запусков равным 50. В итоге результатом докинга являлся набор из нескольких наиболее вероятных конформаций комплекса биотинилированного параоксона со стрептавидином. Полученные комплексы совмещались виртуально со структурой биотин-стрептавидин, полученной методом рентгеноструктурного анализа [4]. Для дальнейшего расчета конформационных изменений комплексов методом молекулярной динамики были отобраны те конформации, в которых положение биотинового фрагмента лиганда совпадает с положением биотина в центре связывания стрептавидина.

2.3. Молекулярная динамика

Конформационные изменения во времени комплексов стрептавидина с биотинилированным параоксоном в присутствии и отсутствии связывающего фрагмента аптамера были

рассчитаны методом молекулярной динамики с помощью программного пакета Gromacs 5.0.4 [8]. Комплекс, полученный методом молекулярного докинга, виртуально был помещен в периодическую кубическую решетку, заполненную молекулами воды. Для описания молекул воды использовали модельный потенциал SPC (single point charge), описанный в работе в [9]. Для поддержания в расчетном эксперименте постоянной температуры 300 К и постоянного давления 1 бар применяли термостат с масштабируемыми скоростями «V-rescale» [10] и баростат Берендсена [11] с временными константами 0.1 пс и 1 пс, соответственно. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда [12]. Взаимодействия Леннард-Джонса не учитывались при межатомном расстоянии больше 1 нм. Длины связей в молекулах белка и лигандов поддерживались постоянными с помощью алгоритма LINCS [13]. Расчету конформационных изменений комплексов белок-лиганд предшествовала минимизация энергии системы методом скорейшего спуска [14] и релаксация системы длиной 100 пс. Как показали наши предыдущие расчеты, комплекс водорастворимого белка с лигандом приходит в устойчивое состояние за 2–4 нс [15–18]. В данной работе время симуляции конформационных изменений было выбрано равным 5 нс с шагом интегрирования 0.002 пс.

2.4. Оценка свободной энергии образования белок-лигандных комплексов

Расчет свободной энергии связывания биотинилированного параоксона со стрептавидином проводился методом, сочетающим использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона-Больцмана (molecular mechanics – Poisson Boltzmann surface area, MM-PBSA) [19] с помощью модуля g_mmpbsa [20], встроенного в программный пакет Gromacs. Метод MM-PBSA позволяет оценить энергию образования комплекса белок-лиганд из траекторий молекулярной динамики. В этом подходе свободная энергия связывания ΔG_{bind} рассчитывается по формуле (1):

$$\Delta G_{bind} = G_{RL} - (G_R + G_L), \quad (1)$$

где G – свободная энергия системы, индекс R ссылается на рецептор, L – лиганд, RL – комплекс рецептор-лиганд. Свободная энергия каждой молекулы или комплекса рассчитывается по формуле (2):

$$G_X = E_{MM} + G_{solv} - TS_{MM}, \quad (2)$$

где индекс X ссылается на рецептор, лиганд или их комплекс, E_{MM} – потенциальная энергия молекулы или комплекса, рассчитанная методом молекулярной механики в вакууме, G_{solv} – свободная энергия сольватации, TS – энтропийная составляющая свободной энергии системы в вакууме, T и S – температура и энтропия

соответственно. Свободная энергия сольватации рассчитывается по формуле (3):

$$G_{solv} = G_{polar} + G_{non-polar}, \quad (3)$$

где G_{polar} и $G_{non-polar}$ – вклад полярных и неполярных взаимодействий соответственно в свободную энергию сольватации.

E_{MM} рассчитывается как сумма ковалентных, ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий. Предыдущие исследования выявили, что в течение симуляции молекулярной динамикой происходят очень большие колебания энтропии [20]. Было показано, что расчет только энтальпийного компонента лучше коррелирует с экспериментальными данными, чем расчет полной свободной энергии. Поэтому в нашей работе мы рассчитывали только энтальпийную составляющую свободной энергии образования комплекса.

В данной работе значение свободной энергии образования комплекса рассчитывалось каждые 10 пс в течение симуляции. Таким образом, результатом запуска модуля g_mmpbsa для одной траектории молекулярной динамики являлось 500 значений свободной энергии. Итоговое значение рассчитывалось из полученных 500 значений как среднее \pm стандартное среднее отклонение. В модуле g_mmpbsa в качестве размерности энергии используются кДж/моль, полученные значения энергий были переведены в ккал/моль.

3. Результаты

На первом этапе был проведен молекулярный докинг параоксона, биотинилированного через три изучаемых спейсера, в сайт связывания стрептавидина. Расчет конформационных изменений методом молекулярной динамики показал, что через 1–2 нс все три исследуемых комплекса пришли в устойчивое состояние (конформацию), в котором оставались на протяжении оставшегося времени симуляции. По полученным траекториям была построена временная зависимость площади поверхности параоксона, доступной растворителю (solvent accessible surface area, SASA, рис. 2).

В случае использования спейсера 3-ПЭГ бензольное кольцо и нитрогруппа параоксона «спрятаны» в углублении на поверхности стрептавидина. Анализ этого комплекса показал, что атомы кислорода нитрогруппы параоксона находятся в близком контакте с NH-группами остова остатков Gly48 и Asn49, по всей видимости, между кислородами параоксона и водородами этих NH-групп образуются водородные связи, удерживающие параоксон внутри глобулы белка. Значение параметра SASA параоксона оставалось самым низким на протяжении всей симуляции (рис. 2). Полученные данные указывают на то, что 3-ПЭГ слишком короткий и не может быть использован в качестве спейсера для иммобилизации параоксона на биотине.

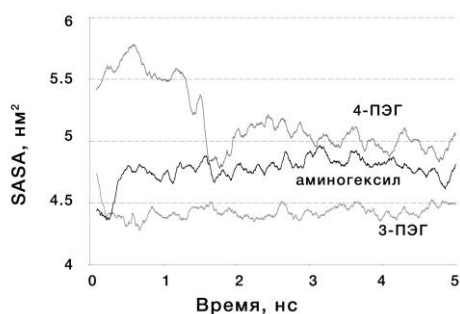


Рис. 2. Зависимость от времени площади поверхности, доступной растворителю (SASA), параоксона, иммобилизованного через стрептавидин-биотиновый комплекс с использованием в качестве спейсеров трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминокексила.

В случае использования спейсеров 4-ПЭГ и аминокексила, спейсер достаточно длинный, параоксон доступен для взаимодействия с олигонуклеотидами (рис. 2). Однако за счет разной химической структуры спейсеров (четыре отрицательно заряженных атома кислорода у 4-ПЭГ и алифатическая углеводородная цепочка у аминокексила), положение параоксона относительно поверхности стрептавидина различно. Скажется ли такое различие на эффективности взаимодействия параоксона с олигонуклеотидами, мы проверили на следующем этапе исследования.

Ранее нами методами молекулярного моделирования были найдены несколько ДНК-аптамеров, эффективно связывающих параоксон. Нуклеотидная последовательность 5'-СТТТГ-3' является фрагментом одного из аптамеров, непосредственно взаимодействующим с параоксоном. В представленной работе мы проверили способность иммобилизованного параоксона связываться с этим пентануклеотидом. К комплексам стрептавидина с биотинилированным параоксоном, полученным методом молекулярного докинга, был добавлен пентануклеотид 5'-СТТТГ-3', который виртуально был помещен в непосредственной близости от параоксона. Затем были рассчитаны дальнейшие конформационные изменения этих трех систем и свободные энергии связывания пентануклеотида с параоксоном. Рассчитанные значения свободных энергий связывания пентануклеотида с параоксоном представлены в таблице.

Таблица. Значения свободных энергий связывания (ΔG_{bind}) пентануклеотида 5'-СТТТГ-3' с параоксоном, иммобилизованным через стрептавидин-биотиновый комплекс с использованием в качестве спейсеров трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминокексила

	3-ПЭГ	4-ПЭГ	Аминокексил
ΔG_{bind} , ккал/моль	-0.2	0.5	-17.2

В случае использования спейсера 3-ПЭГ, пентануклеотид не смог связаться с параоксоном, и более того, полностью оторвался от комплекса стрептавидин-параоксон. В случае использования спейсера 4-ПЭГ фрагмент аптамера также не смог связаться с параоксоном. Отрицательно заряженный пентануклеотид связался с областью поверхности белка, ограниченной с двух сторон положительно заряженными Arg84 и Lys121. И в случае 3-ПЭГ, и в случае 4-ПЭГ, свободная энергия связывания фрагмента аптамера с параоксоном близка к нулю (табл.), что говорит о нулевой аффинности пентануклеотида к параоксону. Лишь в случае использования аминокексила в качестве спейсера фрагмент аптамера оставался связанным с параоксоном в течение всех 5 нс расчетного времени. Более того, пентануклеотид снова оказался связанным в той же области стрептавидина – между аминокислотами Arg84 и Lys121. Но в случае использования аминокексила в качестве спейсера параоксон также находится в этой области, что позволяет аптамеру связаться с ним. Расчет свободной энергии связывания фрагмента аптамера с параоксоном показал максимальную среди трех спейсеров аффинность пентануклеотида к отравляющему агенту (табл.).

Таким образом, согласно полученным нами данным, в экспериментах по селекции аптамеров к ФОС для иммобилизации отравляющих агентов через стрептавидин-биотиновый комплекс лучшим спейсером является аминокексил. При подборе спейсера важно учитывать не только его длину, но и электростатические характеристики. Полученная информация об эффективной иммобилизации отравляющих веществ может быть использована в других областях экспериментальной токсикологии и медицины.

4. Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290142-9.

5. Список литературы

- King A.M., Aaron C.K. Organophosphate and carbamate poisoning. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 2015. V. 33. P. 133–151. doi: [10.1016/j.emc.2014.09.010](https://doi.org/10.1016/j.emc.2014.09.010).
- Ku T.H., Zhang T., Luo H., Yen T.M., Chen P.W., Han Y., Lo Y.H. Nucleic acid aptamers: an emerging tool for biotechnology and biomedical sensing. *Sensors (Basel)*. 2015. V. 15. P. 16281–16313. doi: [10.3390/s150716281](https://doi.org/10.3390/s150716281).
- Darmostuk M., Rimpelova S., Gbelcova H., Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 1141–1161. doi: [10.1016/j.biotechadv.2015.02.008](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008).
- Le Trong I., Wang Z., Hyre D.E., Lybrand T.P., Stayton P.S., Stenkamp R.E. Streptavidin and its

- biotin complex at atomic resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2011. V. 67. P. 813–821. doi: [10.1107/S0907444911027806](https://doi.org/10.1107/S0907444911027806).
5. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 235–242.
 6. Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques.* 1993. V. 14. P. 1010–1013.
 7. Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 1998. V. 19. P. 1639–1662.
 8. Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp. Phys. Comm.* 1995. V. 91. P. 43–56. doi: [10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E).
 9. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., Hermans J. In: *Intermolecular forces: proceedings of the Fourteenth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry*. Ed. Pullman B. Dordrecht: Reidel Publ. Company, 1981. P. 331–342.
 10. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007. V. 126. P. 014101. doi: [10.1063/1.2408420](https://doi.org/10.1063/1.2408420).
 11. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., di Nola A., van Gunsteren W.F., Haak J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 3684–3690. doi: [10.1063/1.448118](https://doi.org/10.1063/1.448118).
 12. Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N²·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 1993. V. 3. P. 10089–10092.
 13. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.* 1997. V. 8. P. 1463–1473.
 14. Jensen J.H. *Molecular Modeling Basics*. Boca Raton: CRC Press. 2010. 190 p.
 15. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Сывороточный альбумин: поиск новых сайтов взаимодействия с фосфорорганическими соединениями на примере зомана. *Биоорг. химия*. 2014. Т. 40. С. 541–549.
 16. Белинская Д.А., Таборская К.И., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Модуляция жирными кислотами сайтов взаимодействия альбумина с параоксоном: анализ методами молекулярного моделирования. *Биоорг. химия*. 2017. Т. 43. № 4. С. 347–356.
 17. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Таборская К.И., Авдонин П.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Сравнительный анализ *in silico* связывания параоксона сывороточным альбумином человека и быка. *ЖЭБФ*. 2017. Т. 53. № 3. С. 170–177.
 18. Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Terpilowski M.A., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Serum albumin binding and esterase activity: mechanistic interactions with organophosphates. *Molecules.* 2017. V. 22. № 7. doi: [10.3390/molecules22071201](https://doi.org/10.3390/molecules22071201).
 19. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* 2015. V. 10. P. 449–461. doi: [10.1517/17460441.2015.1032936](https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936).
 20. Kumari R., Kumar R., Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A. g_mmpbsa – a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* 2014. V. 54. P. 1951–1962. doi: [10.1021/ci500020m](https://doi.org/10.1021/ci500020m).