

# ОСОБЕННОСТИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ЧЕРЕЗ СТРЕПТАВИДИН- БИОТИНОВУЮ СИСТЕМУ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО СЕЛЕКЦИИ АПТАМЕРОВ

Д.А. Белинская<sup>1</sup>, Ю.В. Челушнова<sup>2</sup>,  
В.В. Абзианидзе<sup>2</sup>, Н.В. Гончаров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup>Федеральное государственное унитарное предприятие «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация

Отравления фосфорорганическими соединениями (ФОС) занимают в общем числе экзотоксикозов одно из ведущих мест. Детоксикацию ФОС на первом этапе попадания в организм можно обеспечить с помощью ДНК- или РНК-аптамеров, связывающих яд в кровеносном русле. В настоящее время основным способом поиска аптамеров является экспериментальный метод систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX). 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. Цель данной работы – на примере параоксона оптимизировать процедуру селекции аптамеров к ФОС путем увеличения доступности иммобилизованной через стрептавидин-биотиновый комплекс молекулы отравляющего вещества. Для этого методами молекулярного моделирования были протестированы три спейсера между ФОС и биотином: три звена полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четыре звена полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминоксептил. 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 была проведена путем анализа площади поверхности параоксона, доступной растворителю, а также с помощью расчета свободных энергий связывания. Было показано, что только в случае использования аминоксептила иммобилизованный параоксон может связаться с аптамером. На заключительном этапе был проведен синтез параоксона, связанного с биотином через аминоксептил.

**Ключевые слова:** фосфорорганические соединения, селекция аптамеров, иммобилизация, молекулярное моделирование, синтез.

Цит: Д.А. Белинская, Ю.В. Челушнова, В.В. Абзианидзе, Н.В. Гончаров. Особенности иммобилизации фосфорорганических соединений через стрептавидин-биотиновую систему для экспериментов по селекции аптамеров. Токсикологический вестник. 2020; 4:

**Белинская Дарья Александровна (Belinskaya Daria Alexandrovna)**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии сенсорных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, d\_belinskaya@mail.ru;

**Челушнова Юлия Викторовна (Chelusnova Yulia Victorovna)**, научный сотрудник лаборатории химического моделирования ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, chelusnovayulia@mail.ru;

**Абзианидзе Виктория Вадимовна (Abzianidze Victoria Vadimovna)**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химического моделирования ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

**Гончаров Николай Васильевич (Goncharov Nikolay Vasil'evich)**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России; заведующий лабораторией сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, ngoncharov@gmail.com

**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 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 – SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Процесс основан на поэтапной селекции и амплификации олигонуклеотидных последовательностей, обладающих максимальным сродством к молекуле-мишени [3]. При селекции аптамеров к высокомолекулярным соединениям для этапа инкубации молекула-мишень иммобилизуется через стрептавидин-биотиновый комплекс, затем к иммобилизованным мишеням добавляют олигонуклеотиды [4]. В случае ФОС применение этого подхода затруднительно, поскольку молекула отравляющего вещества имеет небольшие размеры и ее доступность на поверхности стрептавидин-биотинового комплекса ограничена. 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 аминоксидила, а затем синтезировать наиболее подходящий из них. Химические формулы параоксона, связанного с биотином с помощью спейсеров, представлены на рисунке 1.

**Материалы и методы исследования.** Молекулярный докинг биотинилированного параоксона в сайт связывания стрептавидина проводили с помощью программного пакета Autodock4.0 [5]. Трехмерные модели лигандов конструировали с помощью программного пакета HyperChem [6]. В качестве трехмерной модели стрептавидина использовали данные рентгеноструктурного анализа молекулы стрептавидина со связанной молекулой биотина из базы данных белковых структур [7], код структуры 3гу2 [8]. В исследуемом центре связывания белка строили решетку аппроксимации размером 60 узлов в  $x$ -,  $y$ -, и  $z$ -направлении и с шагом 0.0375 нм. Для поиска оп-

тимальных конформаций использовали ламарковский генетический алгоритм [5] с числом запусков равным 50. Конформацию с минимальным значением константы диссоциации  $K_d$  отбирали как итоговую и использовали в качестве стартовой структуры для дальнейшей симуляции методом молекулярной динамики.

Конформационные изменения во времени комплексов биотинилированного параоксона со стрептавидином рассчитывали методом молекулярной динамики с помощью программного пакета Gromacs 5.0.4 [9] с использованием силового поля CHARMM [10]. Комплекс, полученный методом молекулярного докинга, виртуально помещали в периодическую кубическую решетку, заполненную молекулами воды. Для нейтрализации заряда в систему добавляли ионы натрия. Для описания молекул воды использовали модельный потенциал, описанный в работе в [11]. Для поддержания в расчетном эксперименте постоянной температуры 300 К и постоянного давления 1 бар применяли термостат с масштабируемыми скоростями «V-rescale» [12] и баростат Берендсена [13] с временными константами 0,1 пс и 1 пс, соответственно. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда [14]. Взаимодействия Леннард-Джонса не учитывали при межатомном расстоянии больше 1 нм. Длины связей поддерживали постоянными с помощью алгоритма LINCS [15]. Расчету конформационных изменений методом молекулярной динамики предшествовала релаксация системы длиной 100 пс. Для исследования конформационных изменений параоксона, иммобилизованного через стрептавидин-биотиновую систему, время симуляции составило 5 нс с шагом интегрирования 0,002 пс.

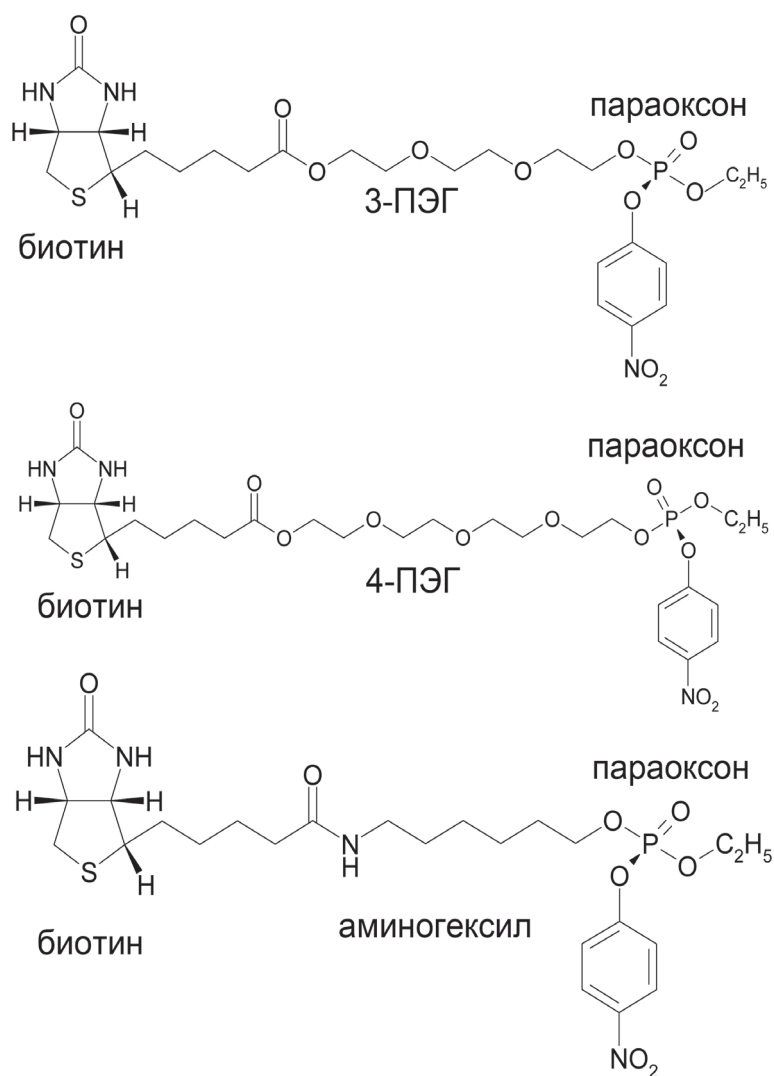
Оценку энергий связывания проводили методом, сочетающим использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона-Больцмана (molecular mechanics – Poisson Boltzmann surface area, MM-PBSA) [16] с помощью модуля g\_mmpbsa [17], встроенного в программный пакет Gromacs. Метод MM-PBSA позволяет оценить энергию образования комплекса рецептор-лиганд из траекторий молекулярной динамики. В этом подходе свободная энергия связывания  $\Delta G_{\text{bind}}$  рассчитывается по формуле (1):

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{RL}} - (G_{\text{R}} + G_{\text{L}}) \quad (1),$$

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):

$$G_{\text{X}} = E_{\text{MM}} + G_{\text{sol}} - TS_{\text{MM}} \quad (2),$$

где индекс X ссылается на рецептор, лиганд или их комплекс,  $E_{\text{MM}}$  – потенциальная энергия молекулы или комплекса, рассчитанная методом мо-



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

лекулярной механики в вакууме,  $G_{\text{solv}}$  – 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):

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

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

$E_{\text{MM}}$  рассчитывается как сумма ковалентных, ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий.

Предыдущие исследования выявили, что в течение симуляции молекулярной динамикой происходят очень большие колебания энтропии. Было показано, что расчет только энтальпийного компонента лучше коррелирует с эксперимен-

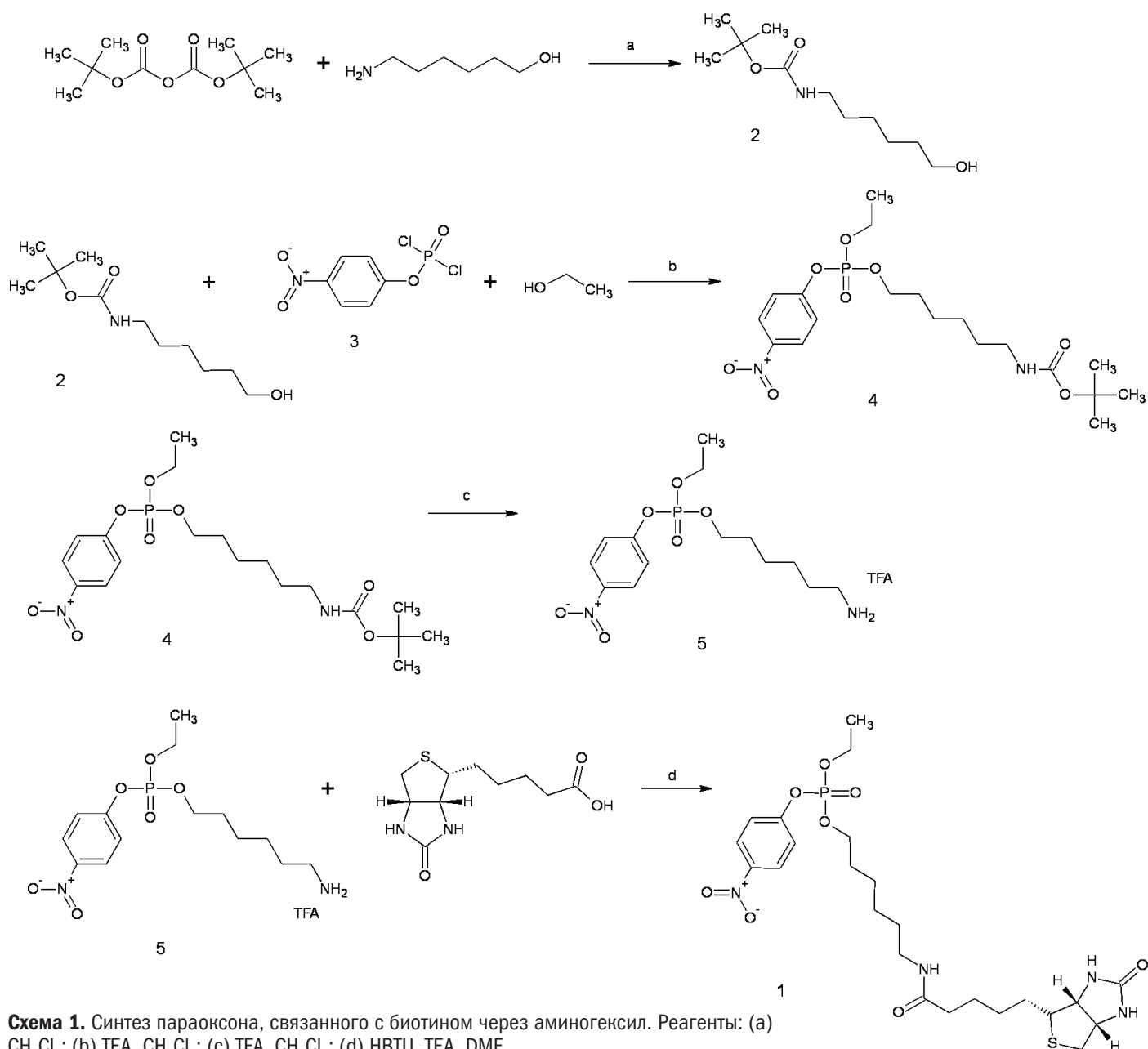
тальными данными, чем расчет полной свободной энергии [17]. Поэтому в нашей работе мы рассчитывали только энтальпийную составляющую свободной энергии образования комплекса.

В данной работе значение свободной энергии образования комплекса рассчитывали каждые 10 пс в течение симуляции. Таким образом, результатом запуска модуля `g_mmpbsa` для одной траектории молекулярной динамики было 500 значений свободной энергии. Итоговое значение рассчитывали из полученных 500 значений как среднее  $\pm$  стандартное среднее отклонение.

Материалы для синтеза биотинилированного параоксона (схема 1) были получены с помощью следующих процедур:

трет-Бутил (6-гидроксигексил) карбамат (соединение 2). К раствору 1 г (8,53 ммоль) аминокгексанола в 10 мл хлористого метилена медленно прикапали 2,05 г (9,39 ммоль) бок-ангидрида. По окончании прикапывания раствор перемешивали еще 2 часа, затем упарили досуха в вакууме. Получили 1,85 г (100 %), который использовали в следующей стадии без дополнительной обработки. HPLC-MS  $[M+H]^+$   $m/z$  вычислено  $C_6H_{15}NO$  (- бок): 118.17, получено: 118.12.

(6-[(трет-Бутоксикарбонил)амино]гексил) этил 4-нитрофенилфосфат (соединение 4). К раствору 0,3 г (1,38 ммоль) соединения 2 в 5 мл безводного хлористого метилена прибавили 0,353 г (1,38 ммоль) паранитрофенилдихлорфосфата (соединение 3). Затем прибавили 0,279 г (2,76 ммоль) сухого триэтиламина и оставили на ночь при перемешивании под аргоном. Затем прибавили 0,095 г (2,07 ммоль) безводного этилового спирта и 0,140 г (1,38 ммоль) сухого триэтиламина. Реакционную массу перемешивали 2 часа под аргоном. Контроль реакции вели по HPLC-MS. Образовавшийся осадок триэтиламина гидрохлорида отфильтровали, фильтрат упарили досуха в вакууме. Продукт выделяли на хроматографической колонке (элюент DCM : MeOH – 20:1,  $R_f=0,45$  для соотношения 10:1), получили 120 мг (20 %) соединения 4 в виде желтоватого масла и 230 мг (37 %) (6-[(трет-бутоксикарбонил)амино]гексил 4-нитрофенил гидрофосфата в виде

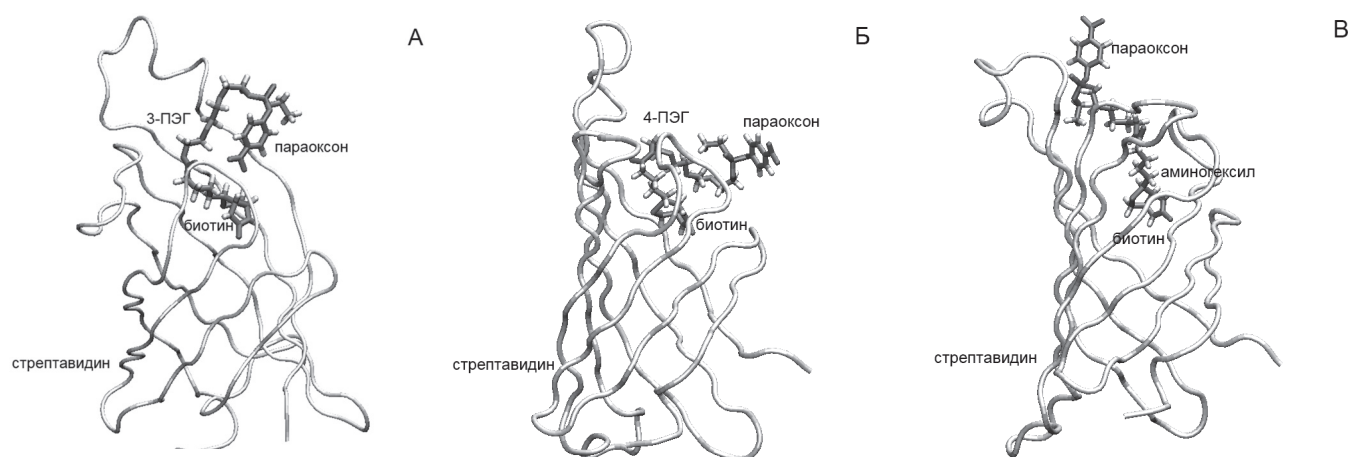


желтоватого масла в качестве основного побочного продукта. HPLC-MS  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  вычислено  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$  (- бок): 347.19, получено: 347.05.

*6-Аминогексил этил 4-нитрофенилфосфата* трифторацетат (соединение 5). 0,120 г (0,269 ммоль) соединения 4 растворили в 3 мл хлористого метилена, прибавили 0,3 г трифторуксусной кислоты. Реакционную массу оставили на ночь при интенсивном перемешивании. Затем прибавили еще 0,3 г трифторуксусной кислоты и перемешивали дополнительно 5 часов. Контроль за прохождением реакции осуществляли по тонкослойной хроматографии (DCM: MeOH – 10 : 1,  $R_f=0,55$ ) до полного исчезновения пятна исходного соединения. Растворитель отгоняли в вакууме,

дополнительно переупаривали с 5 мл хлористого метилена, получили 0,131 г соединения 5 в виде масла коричневатого цвета. Продукт использовали в следующей стадии без дополнительной обработки. HPLC-MS  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$   $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ : 347.19, получено: 346.98.

*6-([5-[(3aS,4S,6aR)-2-оксогексагидро-1H-тиено[3,4-d]имидазол-4-ил]пентаноил]амино)гексил этил 4-нитрофенил фосфат* (соединение 1). В колбу загрузили 0,124 г (0,269 ммоль) соединения 5, 4 мл безводного диметилформамида и 0,24 мл сухого триэтиламина до pH=8. Смесь перемешивали 15 минут под аргоном. Затем прибавили 0,053 г (0,215 ммоль) биотина и 0,102 г (0,269 ммоль) HBTU. Оставили на ночь при пере-



**Рис. 2.** Конформация параоксона, иммобилизованного через стрептавидин-биотиновый комплекс с использованием в качестве линкеров трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ, А), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ, Б), аминогексила (В), по данным молекулярной динамики.

мешивании под аргоном. Растворитель отогнали в вакууме досуха. Полученное масло очищали на хроматографической колонке (DCM : MeOH – 100 : 1 → 20 : 1,  $R_f = 0,5$  при соотношении 9 : 1), получили 63 мг грязного продукта, далее очищали на препаративном хроматографе, получили 12 мг (10 %) соединения 1. HPLC-MS  $[M+H]^+$   $m/z$  вычислено  $C_{24}H_{37}N_4O_8PS$ : 573.21, получено: 573.13.

**Результаты и обсуждение.** На первом этапе был проведен молекулярный докинг параоксона, биотинилированного через три изучаемых спейсера, в сайт связывания стрептавидина. Полученные конформации мы сравнили со структурой биотин-стрептавидин, полученной методом рентгеноструктурного анализа [8]. Для всех трех спейсеров в конформации с минимальным значением константы диссоциации  $K_d$  положение биотинового фрагмента лиганда совпадает с положением биотина в центре связывания стрептавидина. Эта конформации стали стартовыми для расчета конформационных изменений методом молекулярной динамики. Длина траектории составила 5 нс.

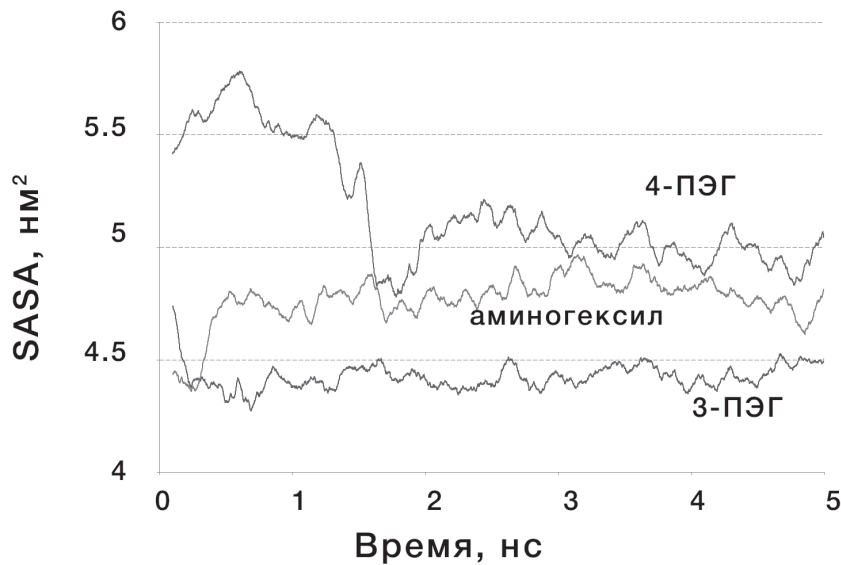
По полученным траекториям были рассчитаны зависимости от времени величин среднеквадратичных отклонений (root mean square deviation – RMSD) атомов  $C\alpha$  молекулы стрептавидина от их начального положения. Анализ полученной зависимости показал, что через 1-2 нс для всех трех исследуемых комплексов значение RMSD выходит на плато, что говорит о стабилизации системы. Конечные конформации комплексов представлены на рисунке 2.

По полученным траекториям была построена временная зависимость площади поверхности параоксона, доступной растворителю (solvent accessible surface area, SASA, рис. 3).

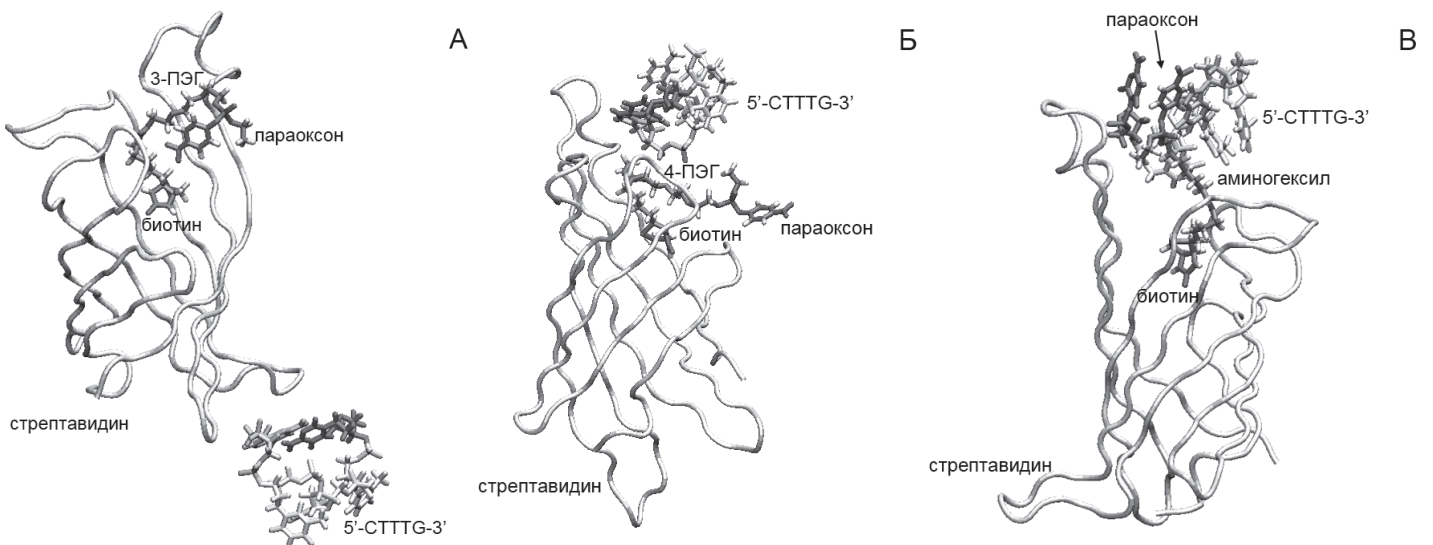
В случае использования спейсера 3-ПЭГ бензольное кольцо и нитрогруппа параоксона «спрятаны» в углублении на поверхности стрептавидина (рис. 2А). Анализ этого комплекса показал, что атомы кислорода нитрогруппы параоксона находятся в близком контакте с NH-группами остова остатков Gly48 и Asn49, по всей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

В случае использования спейсеров 4-ПЭГ и аминогексила, спейсер достаточно длинный, доступность параоксона для взаимодействия с олигонуклеотидами на протяжении симуляции выше, чем в случае использования 3-ПЭГ (рис. 3). Более того, согласно значениям SASA, 4-ПЭГ более предпочтителен, чем аминогексил. Однако за счет разной химической структуры спейсеров (четыре отрицательно заряженных атома кислорода у 4-ПЭГ и алифатическая углеводородная цепочка у аминогексила), положение параоксона относительно поверхности стрептавидина различно (рис. 4Б, В). Скажется ли такое различие на эффективности взаимодействия параоксона с олигонуклеотидами, мы проверили на следующем этапе исследования.

Ранее нами методами молекулярного моделирования были найдены ДНК-аптамеры, максимально эффективно связывающие параоксон:



**Рис. 3.** 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 аминогексила.



**Рис. 4.** Комплекс связывающего фрагмента аптамера к параоксону 5'-СТТТГ-3' с параоксоном, иммобилизованного через стрептавидин-биотиновый комплекс с использованием в качестве линкеров трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ, А), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ, Б), аминогексила (В), по данным молекулярной динамики.

5'-AGCTTGCTGC<sup>10</sup>AGCGATCTTT<sup>20</sup>GATCGC CACA<sup>30</sup>GAGCT-3',

в котором нуклеотиды С17, Т18, Т19, Т20, а также частично G21 непосредственно взаимодействуют с молекулой параоксона. Согласно нашим расчетам, значение свободной энергии связывания этого аптамера с параоксоном составило  $-124.4 \pm 13.6$  кДж/моль.

Мы проверили способность иммобилизованного параоксона связываться с этим нуклеотидным фрагментом. К комплексам стрептавидина с биотинилированным параоксоном, полученным ме-

тодом молекулярного докинга, был добавлен пентануклеотид 5'-СТТТГ-3', который виртуально был помещен в непосредственной близости от параоксона. Дальнейшие конформационные изменения этих трех систем были рассчитаны методом молекулярной динамики, свободные энергии связывания пентануклеотида с параоксоном были оценены методом ММ-РBSA. Полученные в результате расчета структуры представлены на рисунке 4. Рассчитанные значения свободных энергий связывания пентануклеотида с параоксоном представлены в таблице.

**Энергетические характеристики связывания пентануклеотида 5'-СТТГ-3' с параоксоном, иммобилизованным через стрептавидин-биотиновый комплекс с использованием в качестве линкеров трех звеньев полиэтиленгликоля (3-ПЭГ), четырех звеньев полиэтиленгликоля (4-ПЭГ) и аминокссила**

Энергия, кДж/моль	3-ПЭГ	4-ПЭГ	аминокссил
$E_{vdw}$	-28±17	-53±30	-152±12
$E_{el}$	-28±16	-25±13	-125±26
$E_{MM}$	-56±27	-78±40	-276±21
$\Delta G_{polar}$	58±35	86±30	218±30
$\Delta G_{non-polar}$	-3±2	-6±3	-14±1
$\Delta G$	-1±22	2±30	-72±23

$E_{vdw}$  – энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий пентануклеотида и параоксона,  $E_{el}$  – энергия электростатических взаимодействий пентануклеотида и параоксона,  $E_{MM}$  – потенциальная энергия взаимодействия пентануклеотида и параоксона,  $E_{MM} = E_{vdw} + E_{el}$ ,  $G_{polar}$  и  $G_{non-polar}$  – вклад полярных и неполярных взаимодействий в свободную энергию сольватации,  $\Delta G$  – итоговое значение свободной энергии образования комплекса (подробнее см. раздел Материалы и методы исследования).

В случае использования спейсера 3-ПЭГ, пентануклеотид не смог связаться с параоксоном, и более того, полностью оторвался от комплекса стрептавидин-параоксон (рис. 4А). 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 (рис. 4Б). Более того, и в случае 3-ПЭГ, и в случае 4-ПЭГ, средняя по траектории свободная энергия связывания фрагмента аптамера с параоксоном близка к нулю (табл.), что говорит о нулевой аффинности пентануклеотида к параоксону.

Лишь в случае использования аминокссила в качестве спейсера фрагмент аптамера оставался связанным с параоксоном в течение всех 5 нс расчетного времени. Расчет свободной энергии связывания фрагмента аптамера с параоксоном показал максимальную среди трех спейсеров аффинность пентануклеотида к отравляющему агенту (табл.).

Анализируя вклад различных взаимодействий в суммарную свободную энергию (табл.), можно заметить, что для всех трех спейсеров  $E_{vdw}$  примерно в равной степени компенсируется энергией сольватации, то есть чем сильнее стерическое взаимодействие между атомами нуклеотида и параоксона, тем больше требуется энергии на вытеснение молекул воды. Поэтому можно сделать вывод, что возможность связывания биотинили-

рованного параоксона с пентануклеотидом зависит преимущественно от электростатических взаимодействий в системе.

Таким образом, согласно полученным нами данным, в экспериментах по селекции аптамеров к ФОС для иммобилизации отравляющих агентов через стрептавидин-биотиновый комплекс лучшим спейсером является аминокссил.

На заключительном этапе был проведен синтез параоксона, связанного с биотином через аминокссил. Процесс синтеза представлен на схеме 1. Бокирование 6-аминогексанола проводили по стандартной методике, к раствору 6-аминогексанола в хлористом метиле прикапывали бок-ангидрид. Реакция проходит при комнатной температуре в течение 2 часов, с последующей отгонкой растворителя. Соединение 2 использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

Замещение атомов хлора паранитрофенил-дихлорфосфата (соединение 3) проводили по методике, описанной в [18]. Реакцию проводили в безводном хлористом метиле в присутствии триэтиламина в качестве акцептора хлористого водорода при комнатной температуре, с последующей очисткой на хроматографической колонке (элюент DCM : MeOH – 20 : 1, Rf = 0.45) получали продукт с 20 % выходом. В качестве основного побочного продукта образуется (6-[(трет-бутоксикарбонил)амино]гексил 4-нитрофенил гидрофосфат с выходом 37 %.

Бок-защиту соединения 4 снимали в хлористом метиле в присутствии трифторуксусной кислоты, с образованием соответствующей трифторацетатной соли 7. Контроль прохождения реакции вели по HPLC-MS. Растворитель отгоняли в вакууме досуха и использовали полученный продукт в следующей стадии без дополнительной очистки.

Образование амидной связи проводили по известной методике с использованием HBTU в качестве активатора карбоксильной группы. Реакцию проводили в безводном N,N-диметилформамиде в присутствии триэтиламина при комнатной температуре. Контролировали ход реакции по HPLC-MS. По данным жидкостной хроматографии в смеси присутствует исходное соединение, дальнейшая выдержка не приводит к увеличению продукта. Реакция идет с большим количеством побочных соединений, продукт чистили на хроматографической колонке (элюент DCM : MeOH – 100 : 1 → 20 : 1, Rf = 0.5 при соотношении DCM : MeOH – 9 : 1) и препаративном хроматографе с выходом 10 %.

Важность правильного выбора спейсера для биотехнологических экспериментов обсуждается во многих исследованиях. Например, еще в 1994 году авторы работы [19] показали существенное влияние длины спейсера на ферментативную активность папаина, иммобилизованного на пористых хитозановых бусах. В работе [20] антимикробный пептид цекропин P1 иммобилизовывали на самособирающемся монослое с применением полиэтиленгликолевых спейсеров разной длины. Оказалось, что длина ПЭГ влияет на конформацию CP1 и, как следствие, на его антибактериальную эффективность. В нашем исследовании мы впервые продемонстрировали, что при подборе спейсера для экспериментов SELEX важно учитывать не только его длину, но и электростатические характеристики.

Мы не ставили перед собой задачу проводить подробный анализ межмолекулярных взаимодействий в системе стрептавидин-биотин-спейсер-параоксон-аптамер. Но нельзя не обратить внимание на тот факт, что иммобилизованный на стрептавидине (даже на лучшем спейсере) параоксон, согласно данным *in silico*, слабее взаимодействует с олигонуклеотидной последовательностью, чем в свободном состоянии. А в случае использования спейсера 4-ПЭГ, олигонуклеотид и вовсе закорился на молекуле стрептавидина и стал недоступным для параоксона. Это наблюдение наводит на мысль, что в условиях *in vivo* в кровеносном русле аптамер будет работать совсем не так, как в условиях идеального раствора *in vitro*. Тем не менее, проводится очень мало исследований, изучающих возможность взаимодействия полученных *in vitro* аптамеров с другими

компонентами «живой» среды, в первую очередь белками плазмы крови. В случае стрептавидина, олигонуклеотид закорился на положительно заряженные Arg84 и Lys121. На поверхности альбумина, мажорного белка плазмы крови, также присутствуют положительно заряженные аминокислоты [21], которые могут перетянуть на себя аптамер. Эти догадки подтверждаются и экспериментально. В работе [22] экспериментальным методом MALDI-MS и методами молекулярного моделирования было исследовано взаимодействие трех аптамеров к различным мишеням с сывороточным альбумином и было показано, что все они могут связываться с этим белком и частично терять биологическую доступность в плазме крови, а, значит, и терапевтическую эффективность. Связывающая и эстеразная активность альбумина является объектом пристального внимания в последние годы, происходит переоценка роли этого белка в транспорте и возможной детоксикации ФОС [23]. Авторы работы [24] методом плазмонного резонанса исследовали взаимодействие трёх известных аптамеров к тромбину с альбумином и другими релевантными компонентами плазмы крови – протромбином и ингибиторами тромбина. На основании полученных данных они предсказали, что один из трёх аптамеров, работающий *in vitro*, не будет достаточно эффективно работать *in vivo*. Таким образом, получение аптамеров к ФОС с помощью методов SELEX и молекулярного моделирования не является конечным этапом перед их тестированием. Требуется анализ взаимодействия полученных олигонуклеотидов с компонентами плазмы крови, чтобы предсказать, будет ли аптамер работать *in vivo*, и если нет, из-за каких именно компонентов среды.

**Заключение.** В представленной работе впервые было показано, что в экспериментах по селекции аптамеров к ФОС для иммобилизации отравляющих агентов через стрептавидин-биотин-спейсер комплекс лучшим спейсером является аминокислота. Впервые был проведен химический синтез параоксона, биотинилированного через аминокислоту в качестве спейсера. Впервые продемонстрировано, что при подборе спейсера для экспериментов SELEX 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.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-015-00304) и в рамках госзадания АААА-А18-118012290142-9.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. King A.M., Aaron C.K. Organophosphate and carbamate poisoning. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 2015; 33: 133-51.
2. Ku T.H., Zhang T., Luo H., Yen T.M., Chen P.W., Han Y. et al. Nucleic acid aptamers: an emerging tool for biotechnology and biomedical sensing. *Sensors (Basel)* 2015; 15: 16281-313.
3. Darmostuk M., Rimpelova S., Gbelcova H., Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* 2015; 33: 1141-61.
4. Bing T., Yang X., Mei H., Cao Z., Shangguan D. Conservative secondary structure motif of streptavidin-binding aptamers generated by different laboratories. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18(5): 1798-805.
5. Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 1998; 19: 1639-62.
6. Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques* 1993; 14: 1010-13.
7. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 235-42.
8. 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; 67: 813-21.
9. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 2015; 1-2: 19-25.
10. Zhu X., Lopes P.E., Mackerell A.D. Jr. Recent developments and applications of the CHARMM force fields. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2012; 2: 167-85.
11. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., Hermans J. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: Pullman B., ed. *Intermolecular forces*. Dordrecht: Reidel Publishing Company; 1981: 331-42.
12. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007; 126: 014101.
13. 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; 81: 3684-90.
14. Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 1993; 3: 10089-92.
15. 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; 8: 1463-73.
16. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* 2015; 10: 449-61.
17. 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; 54: 1951-62.
18. Shizuka M., Schrader T.O., Snapper M.L. Synthesis of isoprostanyl phosphatidylcholine and isoprostanyl phosphatidylethanolamine. *J. Org. Chem.* 2006; 71(4): 1330-4
19. Itoyama K., Tanibe H., Hayashi T., Ikada Y. Spacer effects on enzymatic activity of papain immobilized onto porous chitosan beads. *Biomaterials* 1994; 15(2): 107-12.
20. Han X., Liu Y., Wu F.-G., Jansensky J., Kim T., Wang Z. et al. Different interfacial behaviors of peptides chemically immobilized on surfaces with different linker lengths and via different termini. *J. Phys. Chem. B* 2014; 118: 2904-12.
21. Panman W., Japrun D., Pongprayoon P. Exploring the interactions of a DNA aptamer with human serum albumins: simulation studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2017; 35(11): 2328-36.
22. Silva D., Missailidis S. Analyzing models for interactions of aptamers to proteins. *AIP Conf. Proc.* 2014; 1618: 594-7.
23. 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; 22: E1201.
24. Trapaidze A., Herault J.P., Herbert J.M., Bancaud A., Gue A.M. Investigation of the selectivity of thrombin-binding aptamers for thrombin titration in murine plasma. *Biosensors and Bioelectronics* 2016; 78: 58-66.

D.A. Belinskaya<sup>1</sup>, Yu.V. Chelusnova<sup>2</sup>, V.V. Abzianidze<sup>2</sup>, N.V. Goncharov<sup>1,2</sup>

### FEATURES OF ORGANOPHOSPHATES IMMOBILIZATION VIA STREPTAVIDIN-BIOTIN SYSTEM FOR EXPERIMENTS ON SELECTION OF APTAMERS

<sup>1</sup>I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, 188663, p.o. Kuz'molovskiy, Leningrad Region, Russian Federation

Poisoning with organophosphorus compounds occupy one of the leading places in exotoxicosis. At the first stage, the detoxification of organophosphates can be provided with the help of DNA or RNA aptamers that bind the poison in the bloodstream. Currently, the main method of searching for aptamers is the experimental method of systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). In the process of aptamer selection, the target molecule must be immobilized via the streptavidin-biotin complex. Since the poison molecule is small in size, to increase its availability for binding to aptamer, it is necessary to use a spacer between organophosphorus compounds and biotin. The aim of this work was to optimize the selection of aptamers for organophosphorus compounds by increasing the availability of a poison molecule immobilized via the streptavidin-biotin complex on the example of paraoxon. For this purpose, three spacers between organophosphorus compounds and biotin were tested using molecular modeling methods: three links of polyethylene glycol (3-PEG), four links of polyethylene glycol (4-PEG) and aminohexyl. The conformation of the biotinylated paraoxon complex with streptavidin and the interaction of paraoxon with the binding fragment of the aptamer were modeled using molecular docking and molecular dynamics methods. The ability of biotinylated paraoxon to bind to the aptamer has been evaluated by analyzing the surface area of the paraoxon available to the solvent, as well as by calculating the free binding energies. It has been shown that only in the case of aminohexyl immobilized paraoxon can contact the aptamer. At the final stage, the synthesis of paraoxon bound to biotin via aminohexyl was carried out.

**Keywords:** organophosphorus compounds, selection of aptamers, immobilization, molecular modeling, synthesis.

Quote: D.A. Belinskaya, Yu.V. Chelusnova, V.V. Abzianidze, N.V. Goncharov. Features of organophosphates immobilization via streptavidin-biotin system for experiments on selection of aptamers. *Toxicological Review.* 2020; 4: 12-20

Материал поступил в редакцию 20.09.2019 г.