

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей и неорганической химии

**Компьютерное моделирование микроцистина специфичного к
микроцистину**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 411 группы
направления 04.03.01 «Химия»
Института химии
Решетника Ивана Александровича

Научный руководитель:
профессор, д.х.н., доцента

дата, подпись

Н.А. Бурмистрова

Заведующий кафедрой
д.х.н., профессор

И. Ю. Горячева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Разработка современных материалов с заданными свойствами требует понимания и детального изучения механизмов процесса. Для этого необходимо привлечение высокопроизводительного скрининга и методов молекулярного моделирования. Сегодня, задачи проектирования систем систем на основе молекулярного распознавания, в том числе систем доставки лекарственных препаратов, могут быть решены компьютерным моделированием взаимодействия лиганда с рецептором. Примером такой системы является импринтированный белок (ИБ). Для создания комплиментарных поверхностей в молекуле белка используется непосредственно токсичная молекула шаблона. Помимо высокой стоимости шаблона, ее токсичности, нередко случаются ситуации когда эксперимент с ней невозможен. Решением является использование структурного аналога молекулы шаблона. Связь механизма взаимодействия молекулы шаблона и его структурного аналога для разработки подобных систем крайне важна, тем не менее, зачастую, экспериментальное знание об этом ограничено.

Целью работы является теоретическое исследование механизма взаимодействия молекулы микроцистина-LR и ее фиктивных шаблонов с белковой матрицей.

Для достижения данной цели решены следующие **задачи**:

- выбраны и подготовлены молекулярные систем для симуляций молекулярной динамики и метадинамики,
- изучено влияния рН среды на конформационное поведение белковых матриц для импринтинга - бычьего сывороточного альбумина (БСА) и овальбумина (ОВА) методами молекулярной динамики (МД) и метадинамики (МТД),

- проведен молекулярный докинг белковых матриц с микроцистином-LR и конъюгатами аминокислот аргинина (Arg) и лейцина (Leu) с анилином,
- рассчитаны энергии комплексов методами MM/GBSA,
- проведены симуляции метадинамики воронки и рассчитаны абсолютные энергии связывания.

Краткая характеристика методов исследования. Методы молекулярной динамики, метадинамики и молекулярного докинга использовались как основные методы в работе.

Описание структуры работы. Работа состоит из введения, трёх глав (литературного обзора, экспериментальной части и обсуждения результатов), заключения, списка использованных источников, инструктажа по охране труда и технике безопасности. В тексте работы содержатся рисунки, таблицы и графические иллюстрации. Общий объем работы составляет 40 страниц, включающих 4 таблиц и 15 рисунков. Проанализирован 48 литературный источник.

Научная значимость работы:

1. Изучено влияние pH среды на белковые матрицы БСА и ОВА.
2. Определен механизм взаимодействия MC-LR с белковыми матрицам
3. Предложены фиктивные шаблоны для синтеза ИБ специфичного к MC-LR

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность темы исследования, раскрыта научная новизна работы и определены основные цели и задачи.

В **первой главе** рассмотрены основные подходы к моделированию лиганд-белковых взаимодействий, методы моделирования свободной энергии связывания лиганда с белковым рецептором. Описана структура микроцистина-Lr (MC-LR), токсичный эффект на человека и возможные способы анализа и очистки водных объектов.

Методы молекулярного моделирования на сегодняшний день активно используются для изучения поведения биологических систем, таких как белки, нуклеиновые кислоты, лиганд-белковые комплексы, белок-белковые комплексы [1]. Широко распространенным методом исследования лиганд-белковых взаимодействий является метод молекулярного докинга. Молекулярный докинг позволяет предсказать положение лиганда на поверхности белковой молекулы, его аффинность к целевому сайту связывания и ранжировать результаты в соответствии со значениями оценочных функций и энергетических параметров [2].

Важным аспектом использования методов молекулярного докинга является определение целевых мест связывания лиганда на поверхности биомолекулы. В случае когда сайт связывания экспериментально не изучен, то необходимо воспользоваться способами для описания “геодезии” поверхностей белковых молекулы и идентификации полостей пригодных для связывания лиганда [3]. Рекомендующим этапом после проведения процедуры докинга является валидация полученных лиганд-белковых комплексов методом молекулярной динамики [4]. Моделирование молекулярной динамики помогает преодолеть ограничения молекулярного докинга. Помимо стабильности комплексов на данном этапе можно получить информацию об изменении элементов вторичной структуры белковой молекулы в сайте связывания.

Важным параметром определяющим направление взаимодействия лиганда с белком является свободная энергия связывания. На сегодняшний день существует различные методы для оценки энергии взаимодействий. Наиболее быстрыми являются эмпирические методы основанные на энергетических функциях. Промежуточными по производительности и по точности методами являются методы конечной точки - MM/GBSA и MM/PBSA [5]. Статистически строгими являются методы моделирования свободной энергии, исследующие процесс

постепенного преобразования одного состояния системы в другое - методы потенциала средней силы [6], возмущения свободной энергии [7], метадинамики [8].

Одной из систем основанных на взаимодействии лиганда с рецептором является импринтированный белок. Импринтинг белков - метод набирающий популярность в современной биотехнологии, энзимологии, биокатализе. Существуют по крайней мере два исследования в которых были использованы методы молекулярного моделирования для определения свойств ИБ. В исследовании [9] методами молекулярной динамики и молекулярного докинга изучены конформационные изменения белковой матрицы - БСА в процессе протонирования, определены возможные сайты связывания с молекулами-шаблонами - микотоксинами и их аффинность к найденным сайтам связывания, сделаны предположения о влиянии количества молекул-шаблонов на сорбционные свойства будущих систем. В исследовании [10] методами молекулярного докинга оценена возможность замены зеараленона его структурным аналогом 4-гидрокси-кумарином, а также определены его возможные сайты связывания на поверхности БСА.

Во **второй главе** приведена информация о подготовке систем для молекулярного моделирования, выборе параметров для моделирования и экспериментальной методике.

Расчеты молекулярной динамики ОВА и метадинамики БСА проводили в программе GROMACS 2024.3 [11] и PLUMED 1.9.3 [12]. Для всех молекулярных систем сгенерированы параметры с помощью силового поля Amber19sb. Для молекул лиганда и модифицированных остатков белка рассчитаны частичные заряды с помощью пакета psiresp. Системы помещены в кубические и прямоугольные боксы и сольватированы молекулами воды TIP3P, после чего нейтрализованы ионами Na^+ и Cl^- и минимизированы 5000 шагами наискорейшего спуска.

Системы уравновешены в несколько этапов в ансамблях NVT и NPT. Симуляции МД проводились в течении 1000 нс с шагом интегрирования 2 фс.

Для идентификации полостей связывания белков использовали плагин SiteMap программы Schrodinger в сочетании с протоколом слепого докинга в программе Autodock Vina. Необходимость подобного сочетания возникает поскольку Autodock Vina не позволяет охарактеризовать непосредственно сам сайт связывания, в то время как SiteMap не характеризует найденные сайты как потенциальные места связывания, а лишь на основе вычисляемых структурных и физических дескрипторов присваивает метрики геодезии.

Процедуры молекулярного докинга проводили с использованием Glide (Schrodinger) [13] с уровнем точности SP. Размер GridBox для MC-LR составил 20 Å, для конъюгатов аминокислот 16 Å. Докинг MC-LR предполагает создание обширной выборки, поскольку для циклического пептида характерно множество низкоэнергетических конформаций. Для этого оптимизированы 100 позиций докинга с помощью модуля Prime. Для расчета энергий связывания MM/GBSA использовались позы докинга с наименьшими значениями Glide Emodel. Модель растворителя VSGB с силовым полем OPLS4. Структуру белка минимизировали методом наискорейшего спуска.

При моделировании метадинамики воронки использовались две CV, одна из которых описывала положение центра масс лиганда на расстоянии 3.5 нм от места связывания, на основе проекции вдоль линии воронки. Вторая описывала расстояние от оси воронки. Метадинамический потенциал 0.5 кДж/моль накладывался каждые 500 шагов. Параметр biasfactor установлен на 22. В данном моделировании использовано 6 «пешеходов». Профили свободной энергии построены с помощью процедуры перевеса [14].

В третьей главе обсуждаются полученные результаты моделирования. Применение методов молекулярного моделирования позволило определить механизм взаимодействия MC-LR с белковыми матрицами.

Так как первый этап импринтинга изменение pH среды и протонирование белковой молекулы, конформационный переход БСА может влиять на связывание с молекулами-шаблонами. Для эффективного сканирования конформационных переходов БСА использовали метод хорошо темперированной метадинамики. Структура, лежащая в пределах минимума, соответствует N изоформе БСА. При этом для того, чтобы достичь расстояния между доменами больше 7.5 нм необходимо преодолеть энергетический барьер, больше 6 ккал/моль.

Для исследования поведения ОВА в различных условиях pH проводили моделирование молекулярной динамики. Изучены три системы: ОВА в нейтральной среде (pH 7.4), в кислой среде (pH 3.0) и щелочной (pH 9.0). Спустя 1000 нс моделирования молекула ОВА сохраняет свою стабильность при исследованных pH, видимые конформационные переходы отсутствуют. Анализ RMSD подтверждает отсутствие выраженных изменений (рисунок 1).

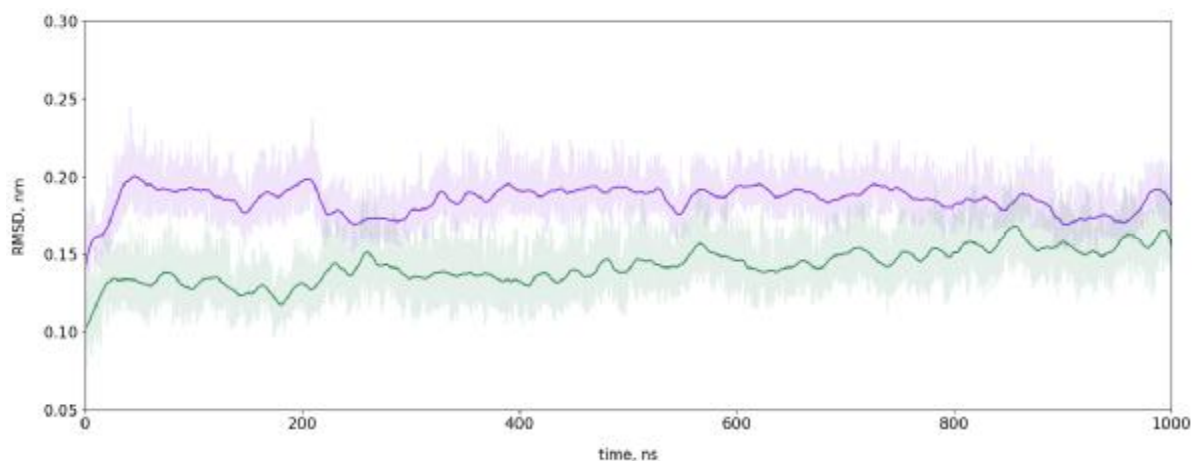


Рисунок 1 - Динамическая стабильность структур ОВА при pH 7.4 и pH 3.0 в течение 1000 нс

В результате кластеризации молекулярно-динамической траектории обнаружено 2 кластера структур ОВА. Наиболее преобладающая структура ОВА в последующем была использована для процедур молекулярного докинга (рисунок 9).

Высокая токсичность и стоимость MC-LR не позволяют на их основе рационально и безопасно проектировать ИБ. Имея информацию о том какие аминокислоты, принимают участие в взаимодействии с белком, можно на основе техник биоконъюгирования сконструировать фиктивный шаблон MC-LR. В качестве элемента, имитирующего фрагмент ADDA можно использовать ароматическую молекулу, которая также позволит детектировать аминокислоты в процессе импринтинга белка и его очистки.

Для определения взаимодействий между MC-LR и белковыми матрицами использованы процедуры молекулярного докинга. Результаты молекулярного докинга ранжированы в соответствии с наименьшими значениями ΔE_{model} .

MC-LR связывается с ОВА преимущественно переменными аминокислотами Arg и Leu, образуя водородные связи (рисунок 2). Фрагмент ADDA при этом расположен в гидрофобном кармане сайта связывания, но не образует взаимодействий. Важно отметить, что профили связывания MC-LR и фиктивных шаблонов (конъюгатов Arg/Ani и Leu/Ani) схожи. Рассчитанные энергии $\Delta G_{\text{MM/GBSA}}$ комплексов имеют близкие значения, на основе чего, можно сделать предположение, что непосредственно переменные аминокислоты вносят основной вклад в связывание MC-LR.

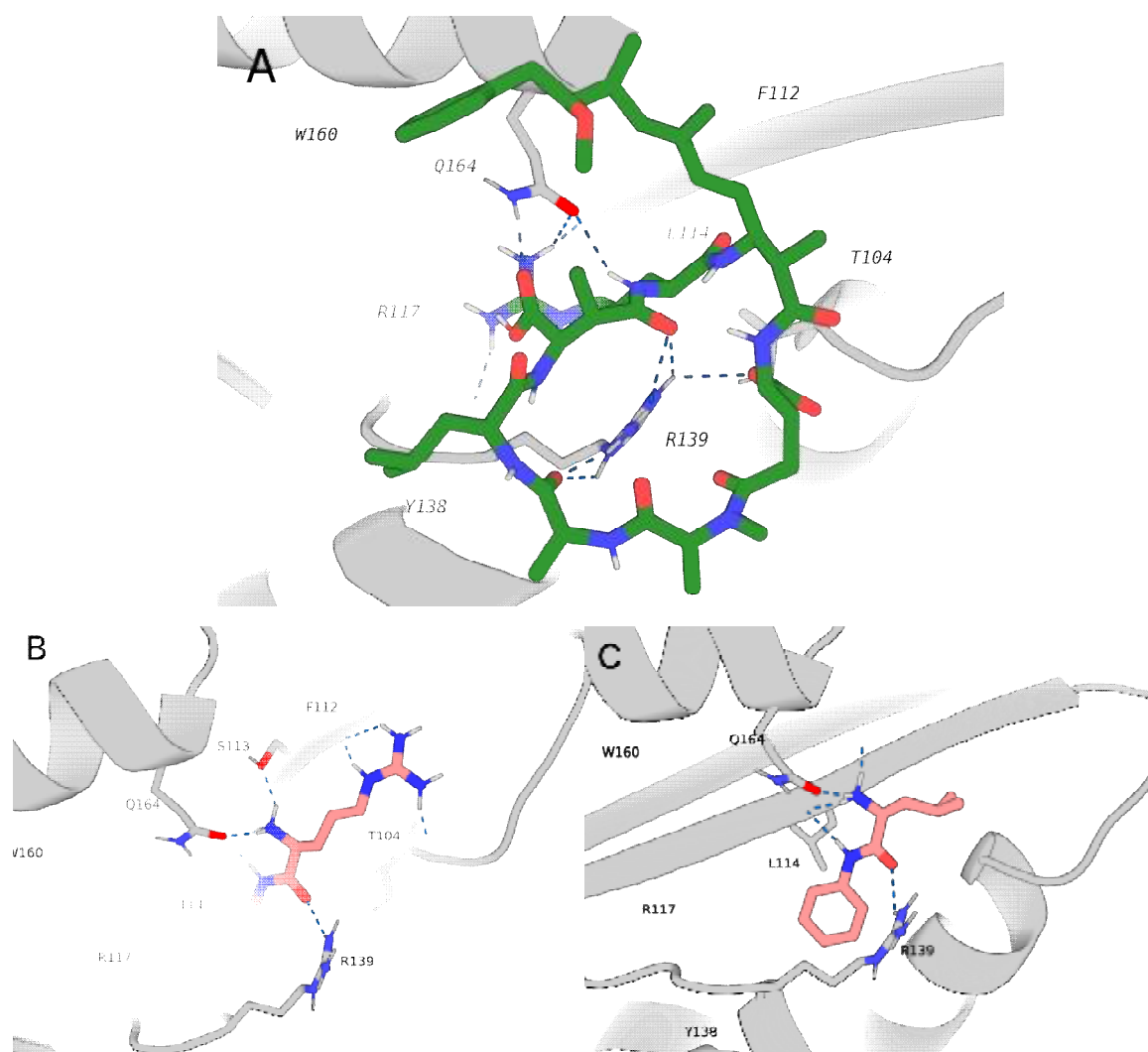


Рисунок 2 - Возможные сайты связывания: (A) OBA - MC-LR, (B) OBA - Arg/Ani, (C) OBA- Leu/Ani

Результаты молекулярного докинга БСА и MC-LR неоднозначны (рисунок 3). Помимо образования водородных связей между сайтами связывания и переменными аминокислотами Arg и Leu, также образуются водородные связи между фрагментами ADDA, Me-Asp, Mdha, D-Glu и другие типы взаимодействий. Анализ расчетов $\Delta G_{MM/GBSA}$ и распределений энергий на атомах конъюгатов показал, что эффективное связывание достигается в случае, когда фрагмент Ani располагается в гидрофобной части кармана связывания. Однако в случае конъюгата Leu/Ani отмечено, что расположение Leu в гидрофобной части является

термодинамически выгодным. Если конъюгат располагается, наоборот, фрагментом Ani в гидрофобной части связывание значительно ухудшается. Можно предположить, что для молекулы БСА наилучшим фиктивным шаблоном является Arg/Ani, поскольку наилучшим образом воспроизводит профиль связывания MC-LR.

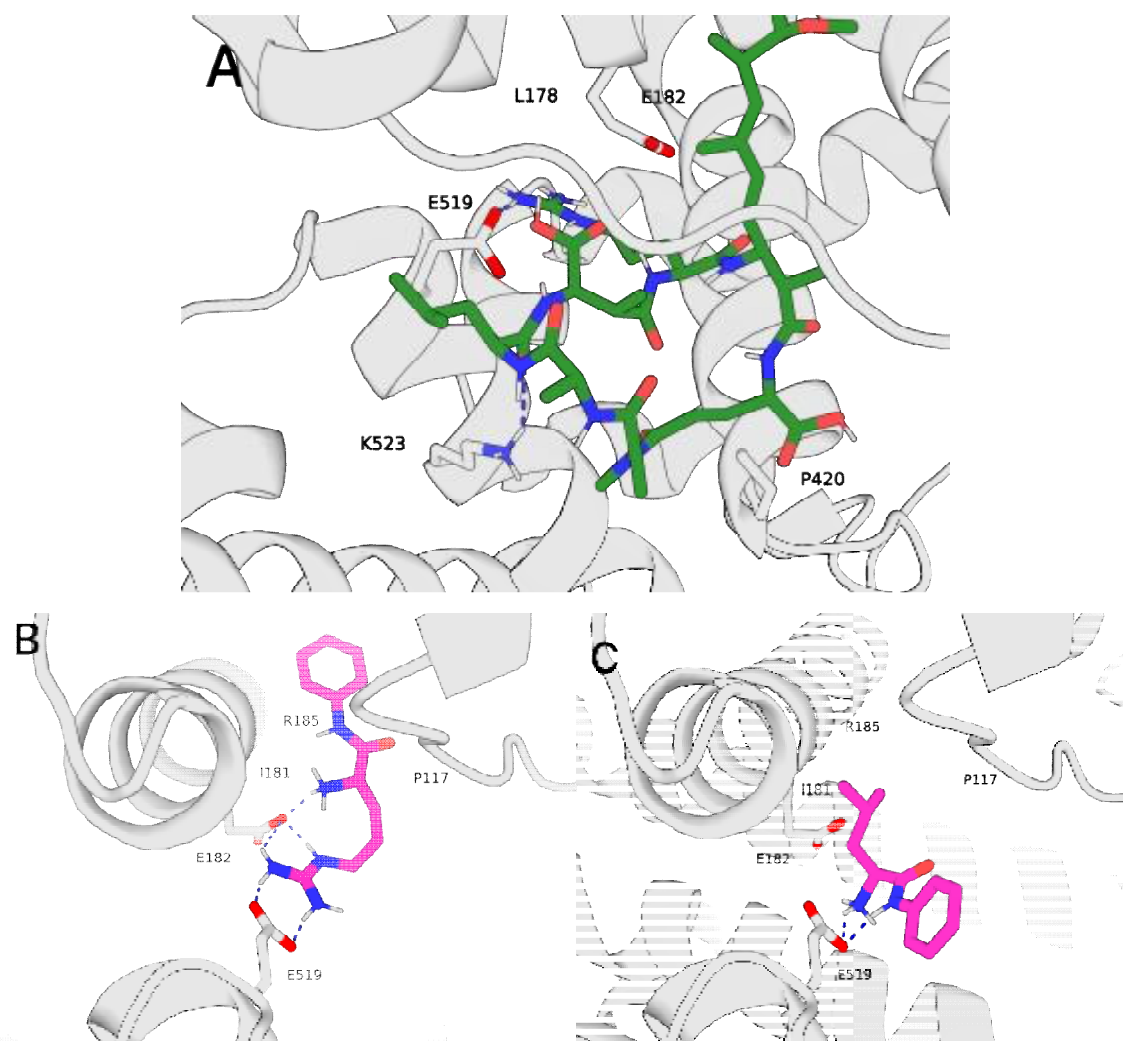


Рисунок 3 - Возможные сайты связывания: (A) БСА - MC-LR, (B) БСА - Arg/Ani, (C) БСА - Leu/Ani

Для раскрытия режима связывания MC-LR с ОВА проводили симуляции метадинамики воронки общей длительностью 1200 нс. Молекула MC-LR связывается с сайтом ОВА посредством образования водородных связей между функциональной группой Leu с Arg139 и Me-

ASP с Gln164. При этом фрагмент ADDA находится вне сайта связывания и фактически не участвует в связывании MC-LR. Профиль связывания отличается от результатов молекулярного докинга. Согласно данным метадинамики возможно более целесообразно использовать в качестве фиктивного шаблона Leu или Me-ASP, при этом внесение гидрофобного фрагмента может быть излишне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено теоретическое исследование механизма взаимодействия MC-LR с белковыми матрицами БСА и ОВА методами молекулярной динамики и метадинамики.

Исследовано влияние pH среды на конформационное поведение БСА и ОВА. Установлено, что конформационное изменение БСА может протекать через несколько метастабильных состояний.

На основе анализа результатов докинга и расчетов энергий связывания MC-LR подобраны и изучены фиктивные шаблоны для синтеза ИБ специфичных к MC-LR. Рассчитанные значения $\Delta G_{MM/GBSA}$ подтверждают возможность замены MC-LR фиктивными шаблонами (Arg/Ani и Leu/Ani).

Симуляции метадинамики воронки свидетельствуют о наличии пути связывания MC-LR с молекулой ОВА отличного от результатов молекулярного докинга.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Biomolecular simulations: methods and protocols / ed. Bonomi M., Camilloni C. New York, NY: Humana Press, 2020. 581 p.
2. Protein-Ligand Interactions and Drug Design. 1st ed. 2021 / ed. Ballante F. New York, NY: Springer US, 2021. 1 p.
3. Halgren T.A. Identifying and Characterizing Binding Sites and Assessing Druggability // J. Chem. Inf. Model. 2009. Vol. 49, № 2. P. 377–389.
4. Zhao H., Caflisch A. Molecular dynamics in drug design // Eur. J. Med. Chem. 2015. Vol. 91. P. 4–14.
5. Wang E. et al. End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design // Chem. Rev. 2019. Vol. 119, № 16. P. 9478–9508.
6. Doudou S., Burton N.A., Henchman R.H. Standard Free Energy of Binding from a One-Dimensional Potential of Mean Force // J. Chem. Theory Comput. 2009. Vol. 5, № 4. P. 909–918.
7. Lundborg M., Lidmar J., Hess B. On the Path to Optimal Alchemy // Protein J. 2023. Vol. 42, № 5. P. 477–489.
8. Barducci A., Bussi G., Parrinello M. Well-Tempered Metadynamics: A Smoothly Converging and Tunable Free-Energy Method // Phys. Rev. Lett. 2008. Vol. 100, № 2. P. 020603.
9. Ilicheva P.M. et al. Theoretical design of imprinted albumin against foodborne toxins // Mol. Syst. Des. Eng. 2024. Vol. 9, № 5. P. 456–463.
10. Presnyakov K.Yu. et al. Dummy-template imprinted bovine serum albumin for extraction of zearalenone // Microchim. Acta. 2024. Vol. 191, № 12. P. 767.
11. 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.

12. Bussi G., Tribello G.A. Analyzing and Biasing Simulations with PLUMED // Biomolecular Simulations / ed. Bonomi M., Camilloni C. New York, NY: Springer New York, 2019. Vol. 2022. P. 529–578.
13. Friesner R.A. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy // J. Med. Chem. 2004. Vol. 47, № 7. P. 1739–1749.
14. Tiwary P., Parrinello M. A Time-Independent Free Energy Estimator for Metadynamics // J. Phys. Chem. B. 2015. Vol. 119, № 3. P. 736–742.