

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ДИЗАЙН МОНО- И БИСХРОМОФОРНЫХ КАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Е.В. Радченко¹, М.Г. Местергази^{1,2}, Т.А. Подругина¹, А.А. Костюков², В.А. Кузьмин², В.А. Палюлин¹

¹ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия



5 - 7 Апреля, 2021

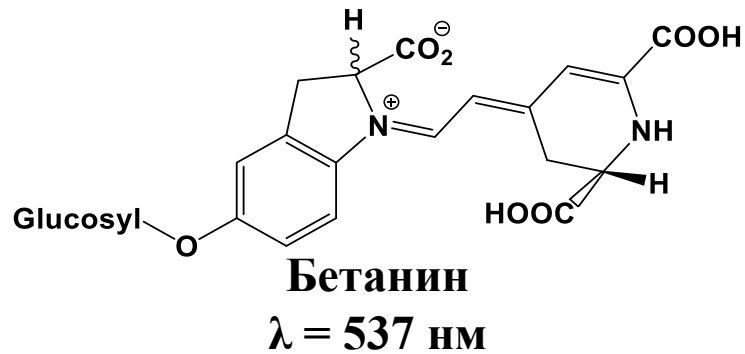


XXVII Симпозиум «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств»

От малых и больших данных - к молекулярным мишеням и лекарствам

Многообразие полиметиновых красителей

В природе:



Карбоцианиновые красители

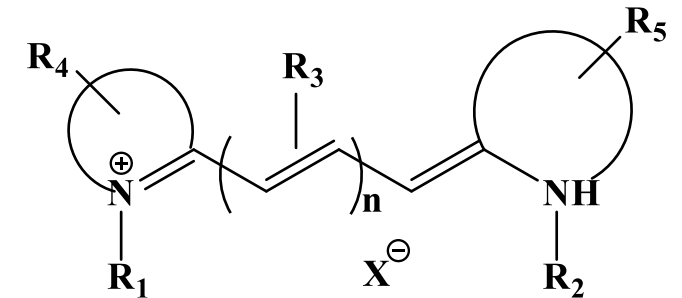
Апоцианины

Гемицианины

Азагемицианины

Мероцианины

Скварилиевые цианиновые красители

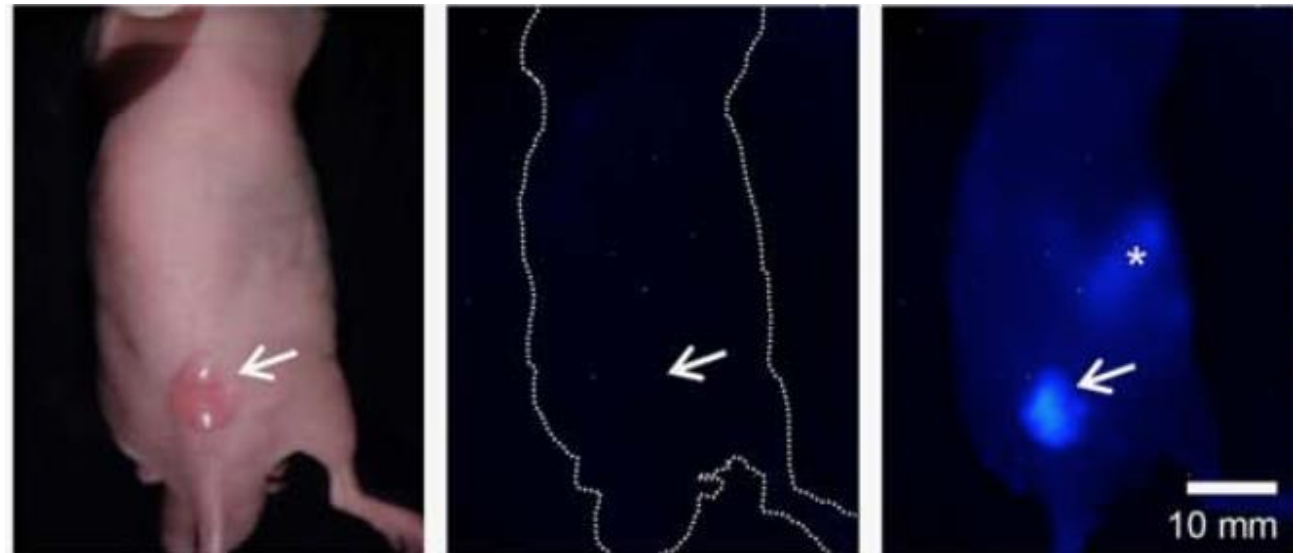
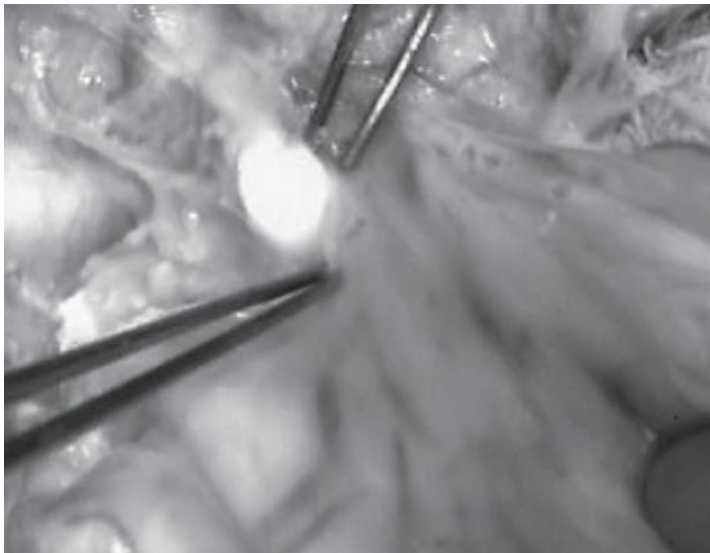


Сферы применения

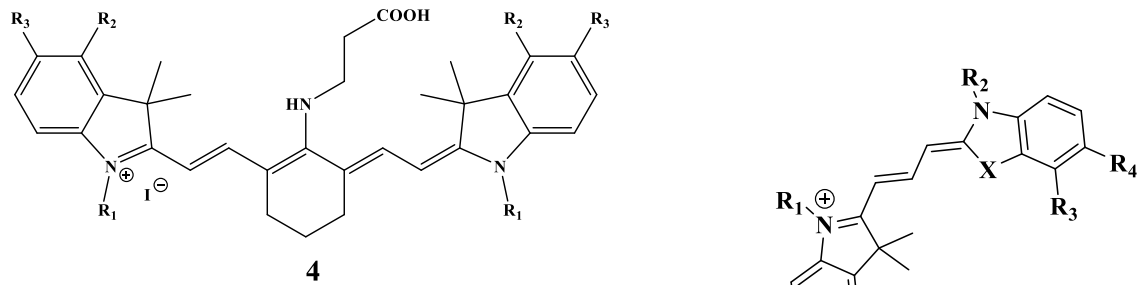
- Фотография
- Оптика
- Производство сенсоров
- Производство лазеров
- Текстильная промышленность
- Медицина и биология

Актуальность: применение в медицине

- Высокое молярное поглощение и хорошая флуоресценция
- Комплексы с транспортными белками крови (сывороточный альбумин, альфа-фетопроtein), накопление в опухолях
- Флуоресцентная визуализация
- Фотодинамическая терапия (ФДТ)
- Тераностика

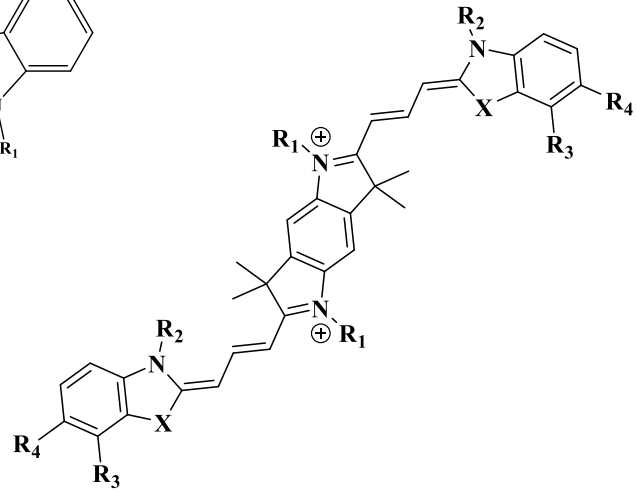


Моно- и бис-хромофорные карбоцианиновые красители

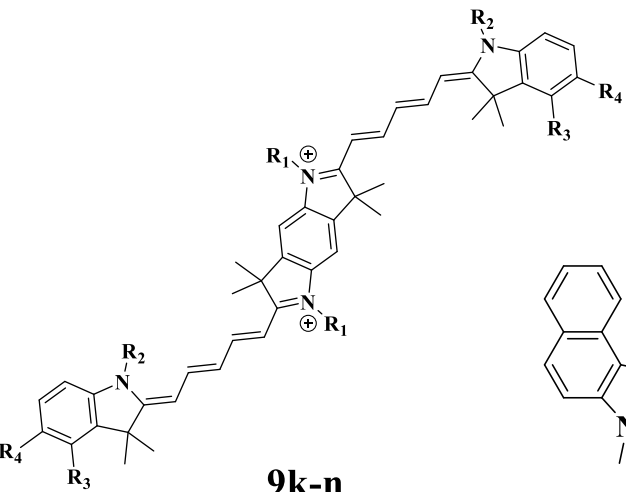


4

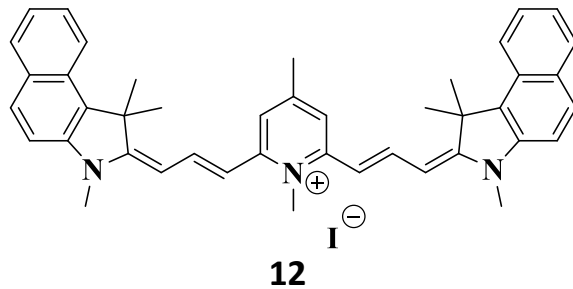
4a-e



9a-j



9k-n



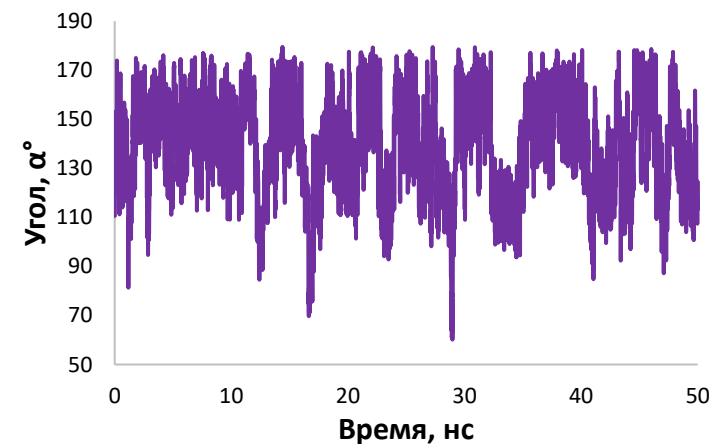
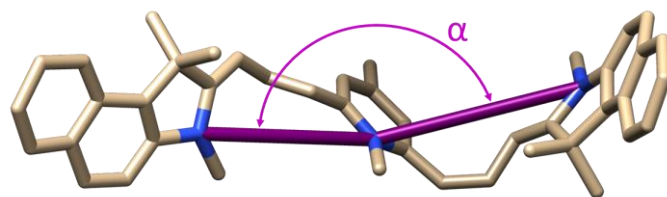
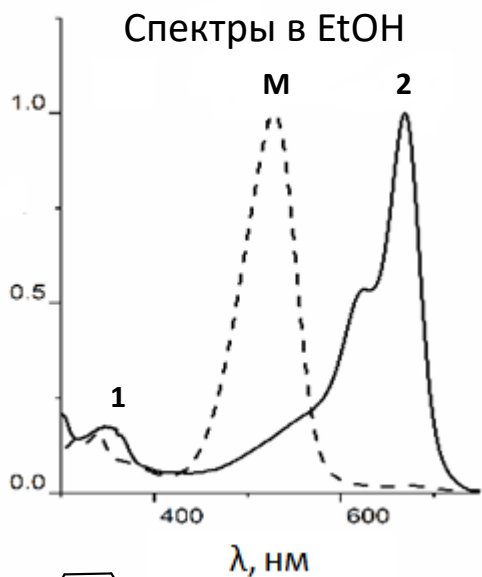
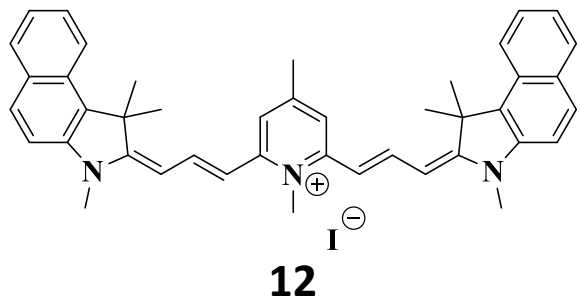
12

№	X	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
4a	C(CH ₃) ₂	Pr	H	H	—
4b	C(CH ₃) ₂	Pr	—CH=CH—CH=CH—	—	—
4c	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	H	H	—
4d	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	—CH=CH—CH=CH—	—	—
4e	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ COOEt	H	H	—
9a	S	(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₅ CH ₃	H	H
9b	S	(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	H	H
9c	S	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₅ CH ₃	H	H
9d	S	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	H	H
9e	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ P(O)(OEt) ₂	—CH=CH—CH=CH—	—
9f	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₁₀ COOH	—CH=CH—CH=CH—	—
9g	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₁₀ COOEt	—CH=CH—CH=CH—	—
9h	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	CH ₃	—CH=CH—CH=CH—	—
9i	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₅ CH ₃	—CH=CH—CH=CH—	—
9j	C(CH ₃) ₂	CH ₂ COOMe	CH ₃	—CH=CH—CH=CH—	—
9k	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	—CH=CH—CH=CH—	—
9l	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	CH ₃	—CH=CH—CH=CH—	—
9m	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₁₀ COOEt	—CH=CH—CH=CH—	—
9n	C(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ P(O)(OEt) ₂	—CH=CH—CH=CH—	—
12	C(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	—	—

Структура и спектры поглощения БКЦ

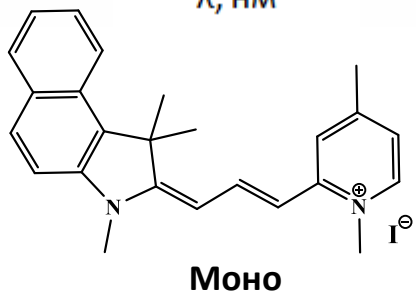
Молекулярная динамика

Почти свободное вращение полиметиновых цепочек, но ключевые геометрические параметры довольно стабильны



Модель взаимодействия хромофоров (расщепление по Давыдову)

$$\cos(\alpha) = \frac{\frac{\lambda_1 \varepsilon_1 - 1}{\lambda_2 \varepsilon_2}}{\frac{\lambda_1 \varepsilon_1 + 1}{\lambda_2 \varepsilon_2}} = 148^\circ$$

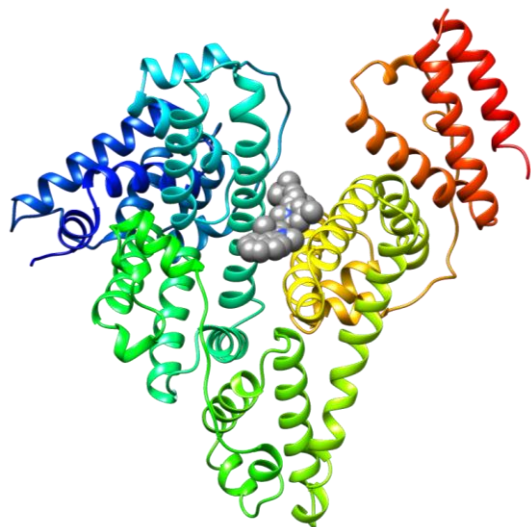


Среда	Угол
EtOH	140±19°
EtOH/H ₂ O	130±23°
H ₂ O	125±20°
ЧСА	121±7°

Связывание с белками плазмы крови

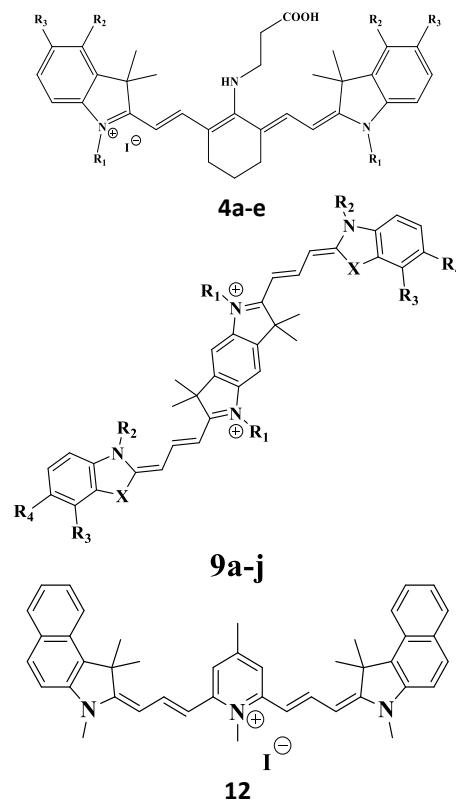
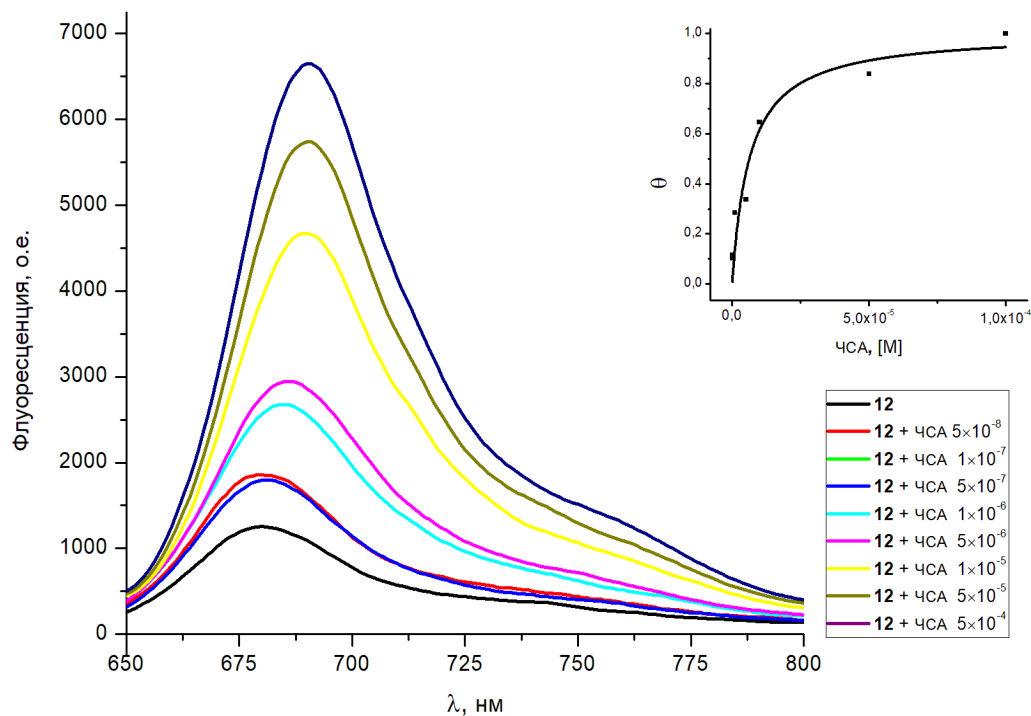
Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА)

Определение констант связывания по усилению флуоресценции



$$\theta = \frac{K_b[\text{ЧСА}]}{1 + K_b[\text{ЧСА}]}$$

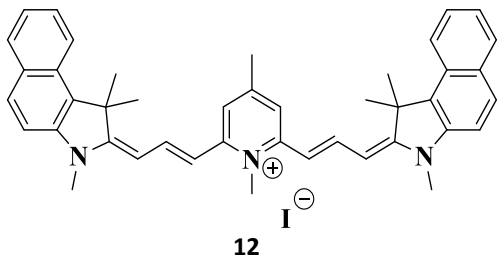
$$\Delta G^0 = -RT \ln K_b$$



№	K_b, M^{-1}	$\Delta G, \text{ккал/моль}$
4a	3.67×10^4	-6.22
4b	2.67×10^4	-6.04
4c	1.07×10^5	-6.86
4d	1.48×10^4	-5.69
4e	1.78×10^4	-5.80
9a	2.90×10^5	-7.45
9c	1.60×10^5	-7.10
9d	1.34×10^5	-6.99
9i	4.40×10^5	-7.69
9j	2.50×10^5	-7.36
12	2.20×10^5	-7.28

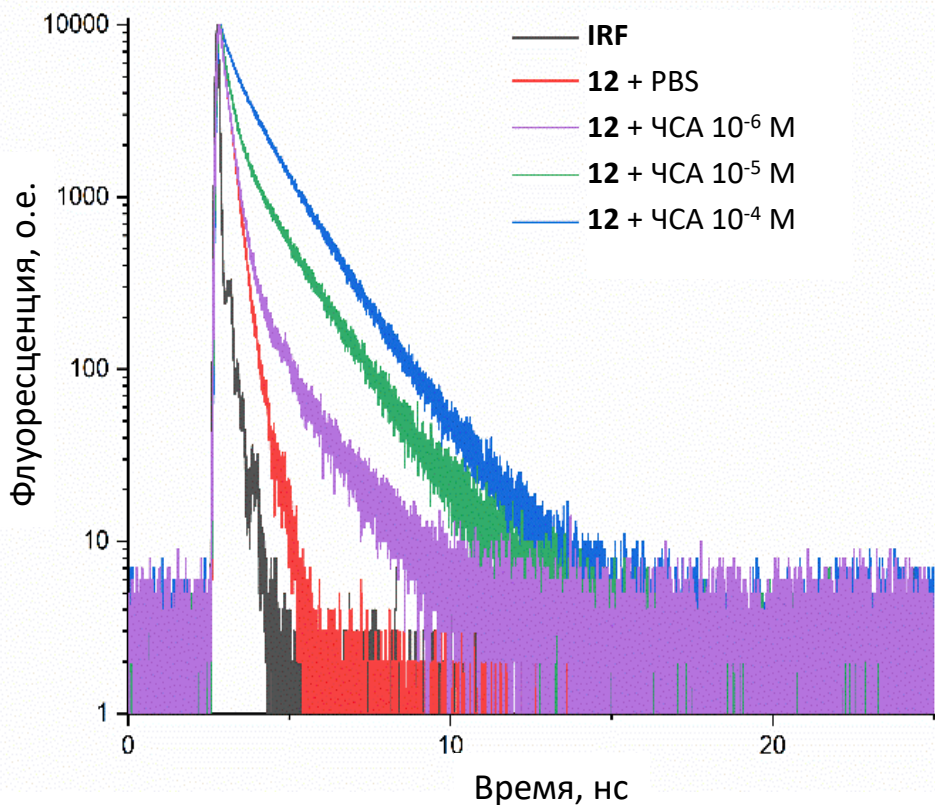
Высокая аффинность к ЧСА у всех красителей, но БКЦ связываются сильнее остальных

Регистрация комплексов методом TCSPC

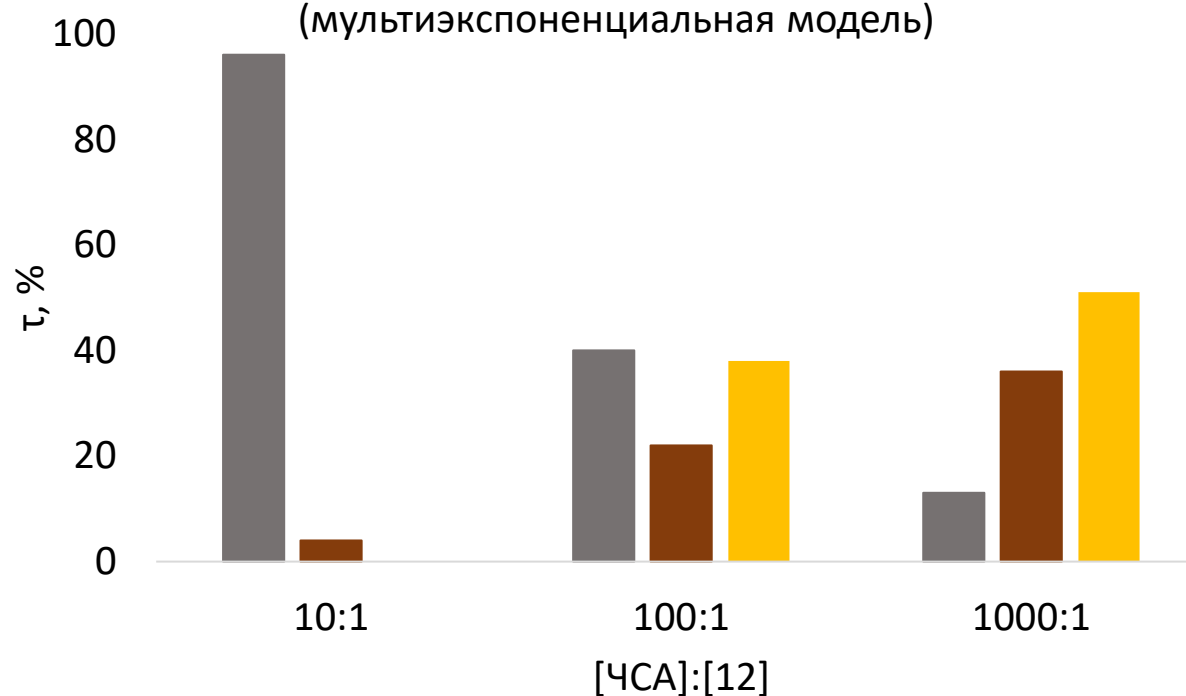


Разные состояния связывания имеют разные спектры и время жизни флуоресценции τ

Соотношения времен жизни флуоресценции τ_i смеси **12** с ЧСА при разных соотношениях ЧСА:12 (690 нм) (мультиэкспоненциальная модель)

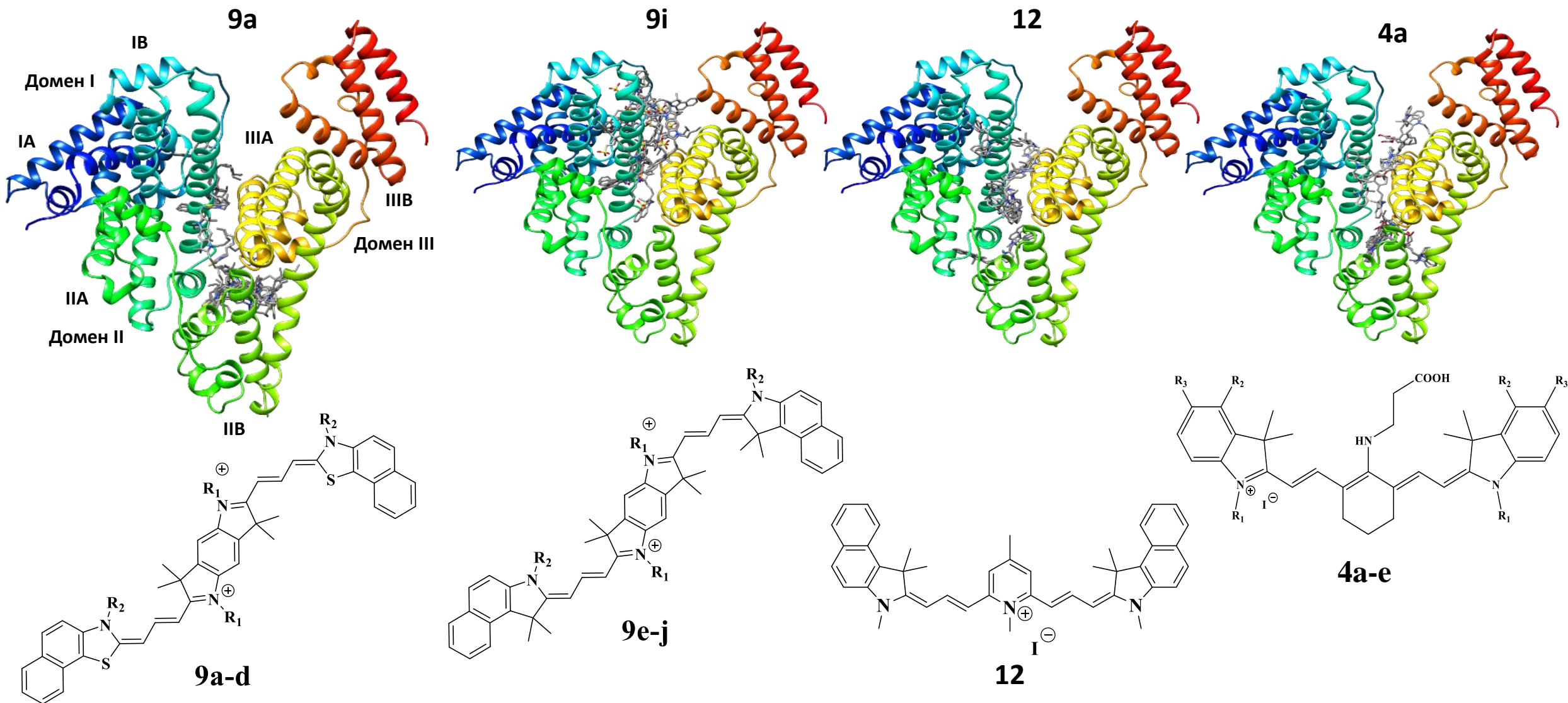


Кинетика затухания флуоресценции при разных концентрациях ЧСА
 λ_{ex} 640 нм, λ_{reg} 690 нм



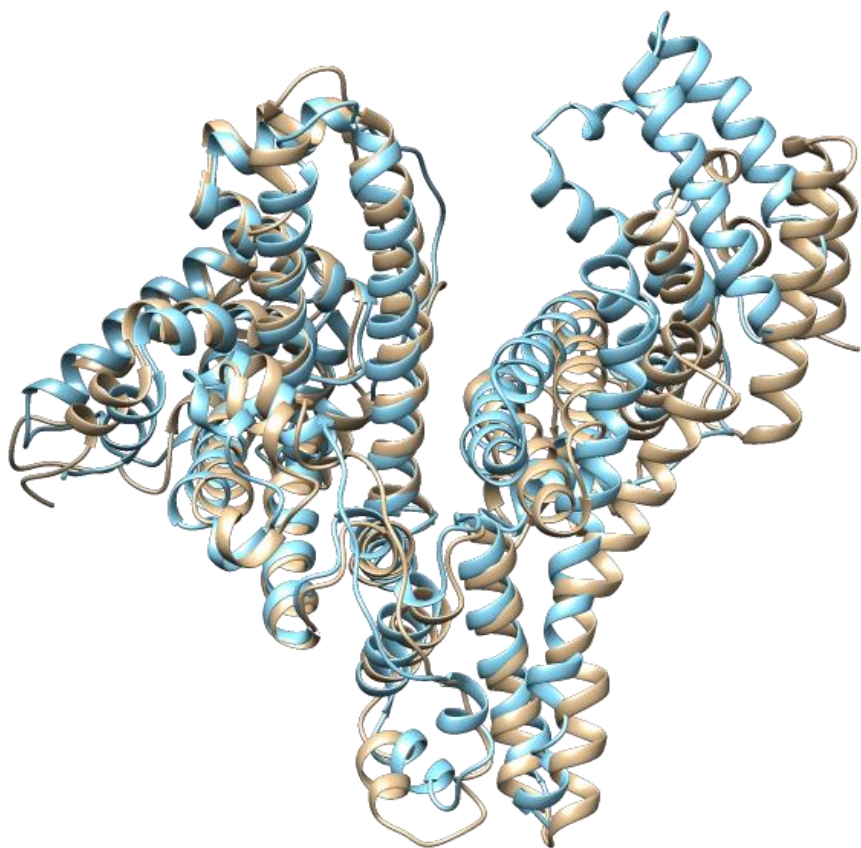
τ_3 , нс	τ_2 , нс	τ_1 , нс
0.18 – 0.21	0.80 – 1.20	1.65 – 1.80

Изучение комплексообразования с ЧСА методом молекулярного докинга



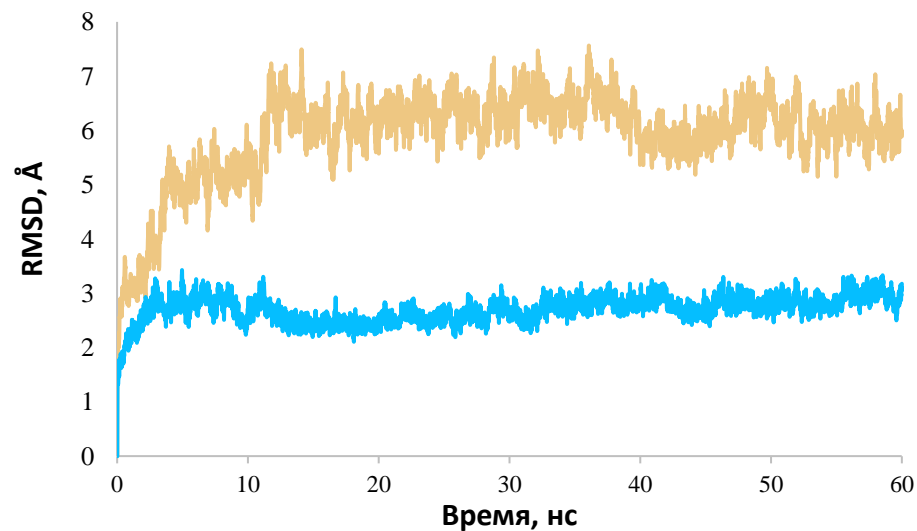
Kuzmin V.A., Nekipelova T.D., Podrugina T.A., Golovina G.V., Kostyukov A.A., Temnov V.V., Doroshenko I.A., Radchenko E.V., Palyulin V.A., Zefirov N.S. Complex formation of albumin with tricyanocyanine dyes containing phosphonate groups // Photochem. Photobiol. Sci. 2016. V. 15, № 11. P. 1377–1384.

Моделирование структуры альфа-фетопротейна (АФП)



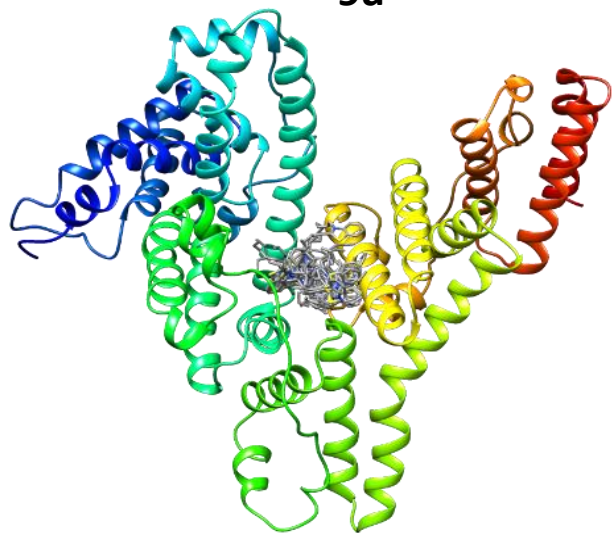
Голубой – структура ЧСА (PDB: 4L9Q)
 Бежевый – структура АФП

4l9q_a	2	AHKSEVAHRFKDL	10	GEENFKALVLI	20	IATAQYLQCCPF	30	FEDHVLVNEVTE	40	FAKTCVADESAEN	50	CDKSLHTLFGDKL	60	CTVATLRET	70	TYGEMADCCAKQEP	80	ENEC	101		
P02771	26	YGIASILDYQCTAE	34	ISLADLATIFFAQ	42	FVQEATYKEVS	50	KMKDALTAIEK	58	PTGDEQSSG	66	QLENQLPAFL	74	EELCHEKEILE	82	KYGH-SDCC	90	SQSEEGRHNC	124		
4l9q_a	102	FLQHKDDNPN-L	110	PRLVREVDVMCT	120	AFHDNEETFLK	130	KYLYEIAARRHP	140	YFYAPPELLFFAK	150	RYKAAFT	160	ECCQAADKAACLL	170	PKLDEL	180	LRDEGKASSAK	190	QRLKC	200
P02771	125	FLAHKKTPTASI	133	PLFQVPEPVTSC	141	EAYEDRETFM	149	NKFIYEIARRHP	157	FLYAPTILLWAAR	165	YDKIIPSCCK	173	KAENAVECFQT	181	KAATVTKEL	189	RESSLNQ	197	HAC	224
4l9q_a	201	ASLQKFGERAFK	210	AWAVARLSQRF	220	PKAEFAEVS	230	KLVTDLTKVHTE	240	CCHGDLLECAD	250	DRADLAKYICEN	260	QDISSKLKECCEK	270	PLLEKSHCI	280	AEVND	290	EMPA	300
P02771	225	AVMKNFGTRTFQ	233	AITVTKLSQKFT	241	KVNFTEIQKLV	249	LDVAHVHEHC	257	CRGVDVLDCLQ	265	GEKIMS	273	YICSQD	281	TLNKKIT	289	ECCKLTT	297	LERGQCII	324
4l9q_a	301	DLPSLAADFVES	310	KDVCKNYAEAK	320	DVFLGMFLYEY	330	ARRHPDYSVV	340	LLRLAKTYETT	350	LEKCCAAAD	360	PHECYAKV	370	DFEFKPLVEE	380	PQNLIKQNC	390	ELFQLGE	400
P02771	325	GLSPNLNRF	333	LDGDFDNQFSS	341	GKNIFLAS	349	FEVYSRRHP	357	QLAVSVILRV	365	AKGYQELLE	373	KCFQ	381	TENPLECQD	389	KGEEEL	397	KYIQES	424
4l9q_a	401	YKFQNALLVRY	410	TKKVPOVSTPT	420	LVEVSRNLGK	430	VSGSKCKKHP	440	EAKRMPGAE	450	YLSVVLNQL	460	CVLHEKTPV	470	SDRVTCKCTE	480	SLVNR	490	RRPCFSA	500
P02771	425	YQLQNAFLVAY	433	TKKAPQLT	441	TSSELMAITRK	449	MAATAATCC	457	QLSEDKLLAC	465	GEGAADI	473	IIGHLCIR	481	HEMTPVNP	489	PGVGCC	497	TSSYAN	524
4l9q_a	501	EFNAETFTFHAD	510	ICTLSEKERQIK	520	QCTALVELV	530	KHKPKATKE	540	QLKAVMD	550	DFAAFVEK	560	CKCKADD	570	KETCF	580	FAEEGK	582	LVAA	582
P02771	525	AFSDKFI	533	FKDLCAQAG	541	VALQTMKQ	549	EFLINLVKQ	557	KQIIEE	565	QLEAVI	573	ADFSGLLE	581	KCCQ	582	QEQVCF	582	FAEEGQLISK	606

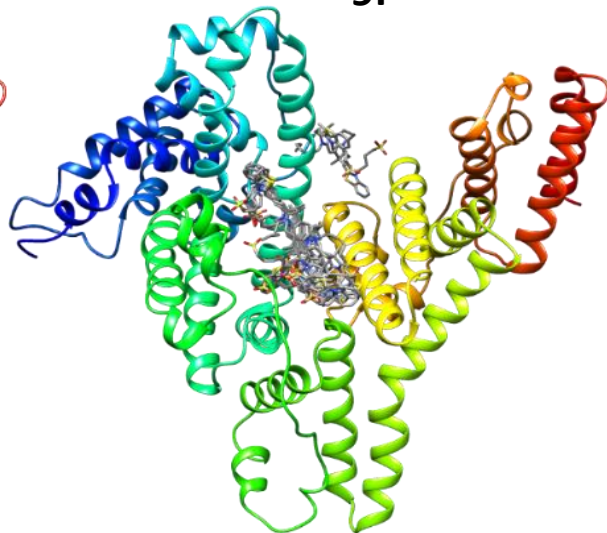


Изучение комплексообразования с АФП методом молекулярного докинга

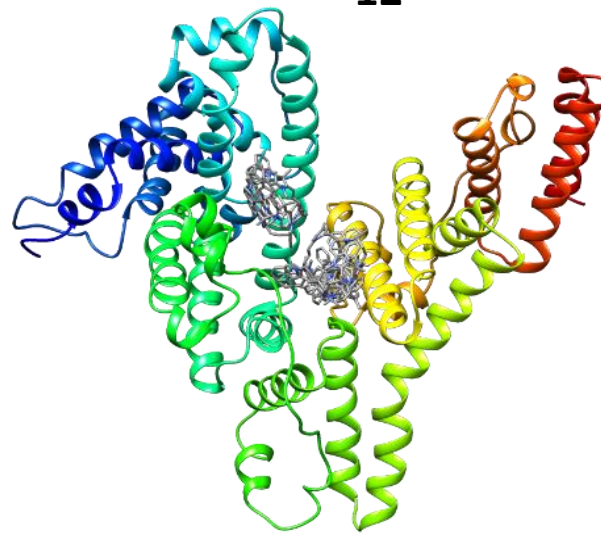
9a



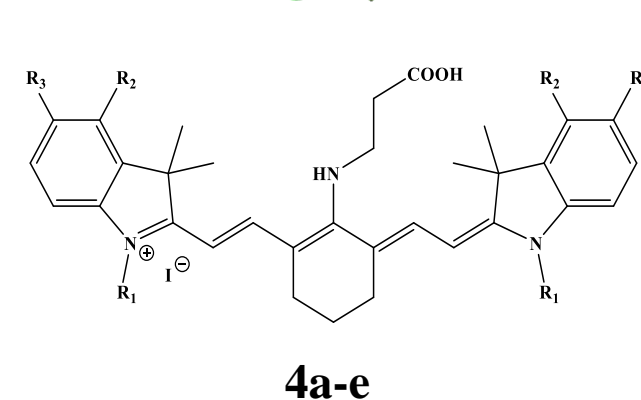
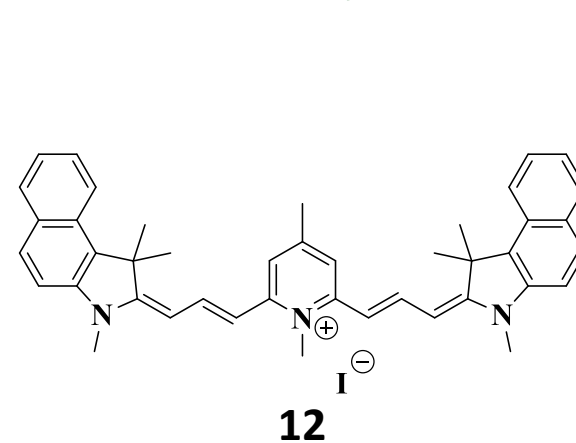
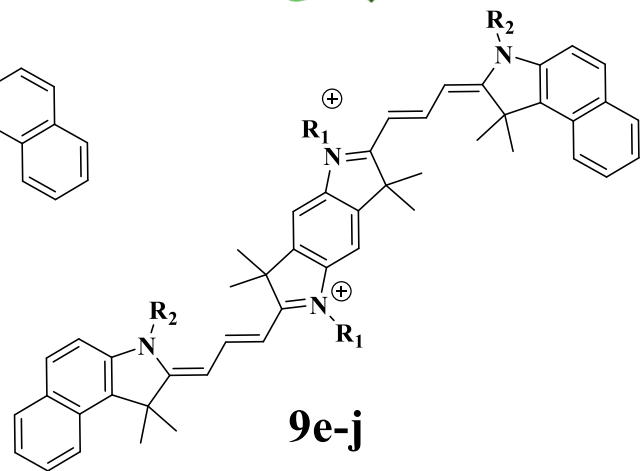
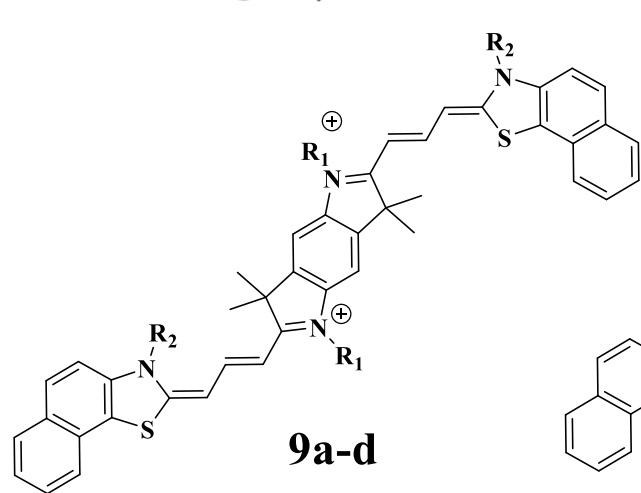
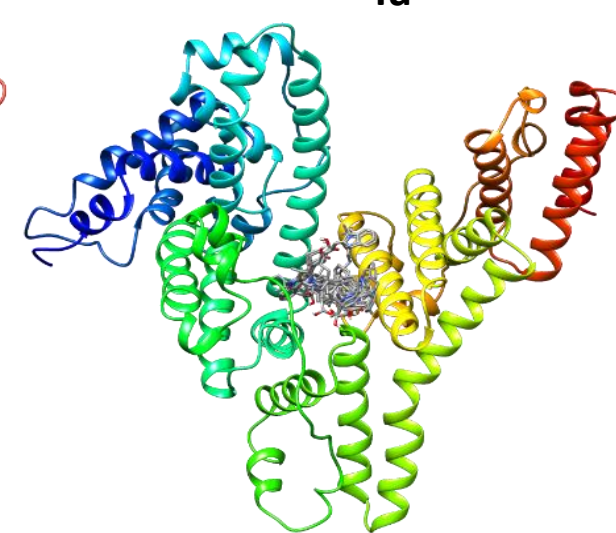
9i



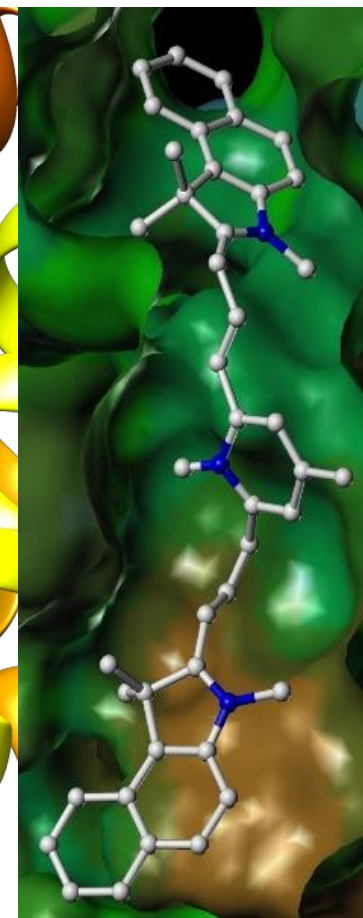
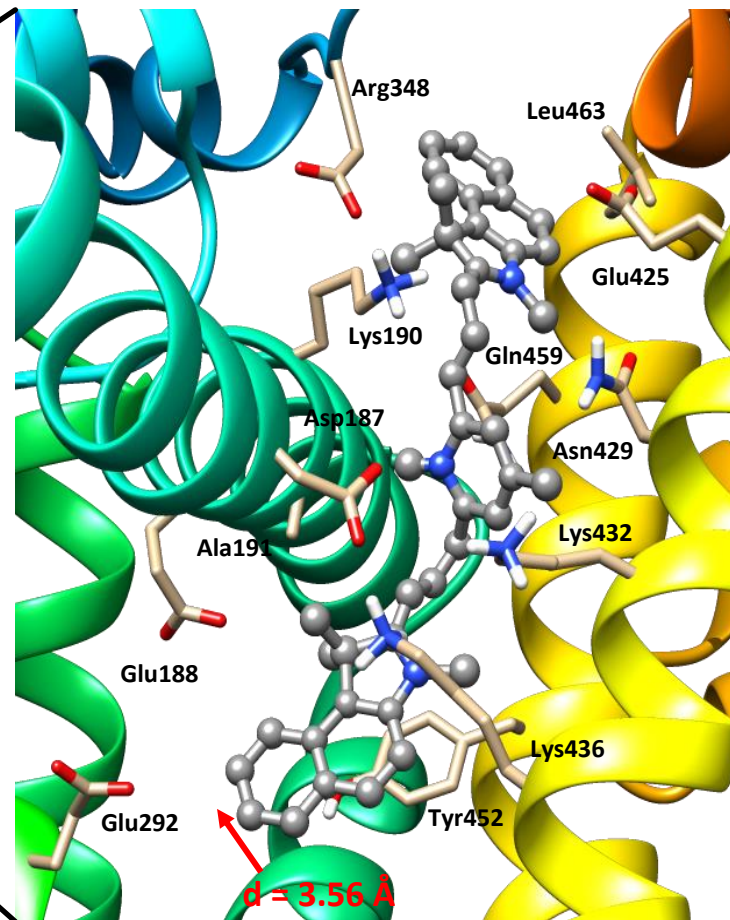
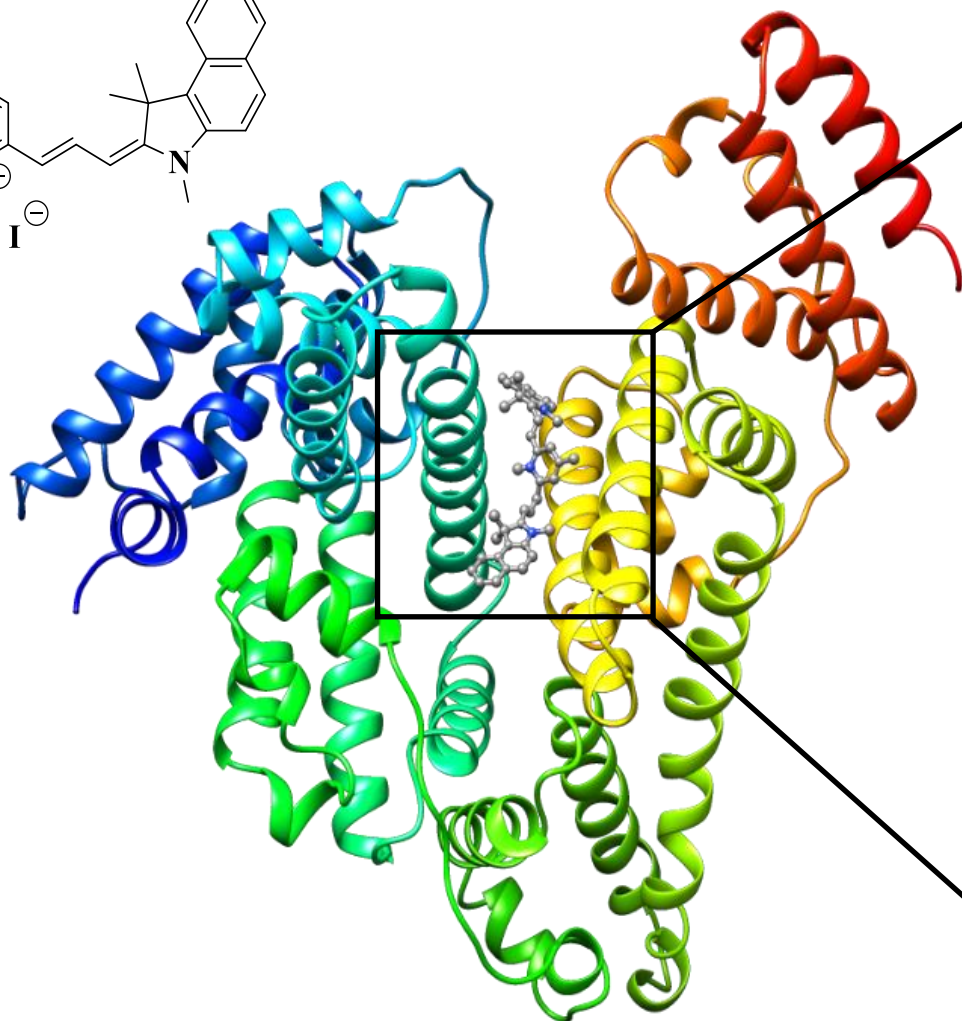
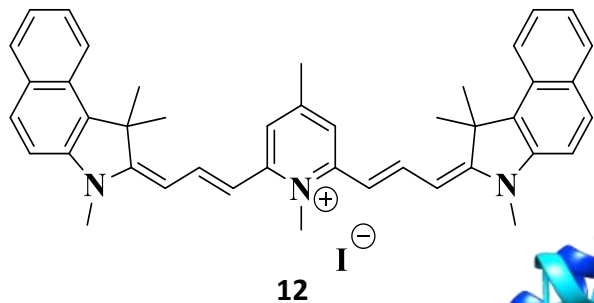
12



4a

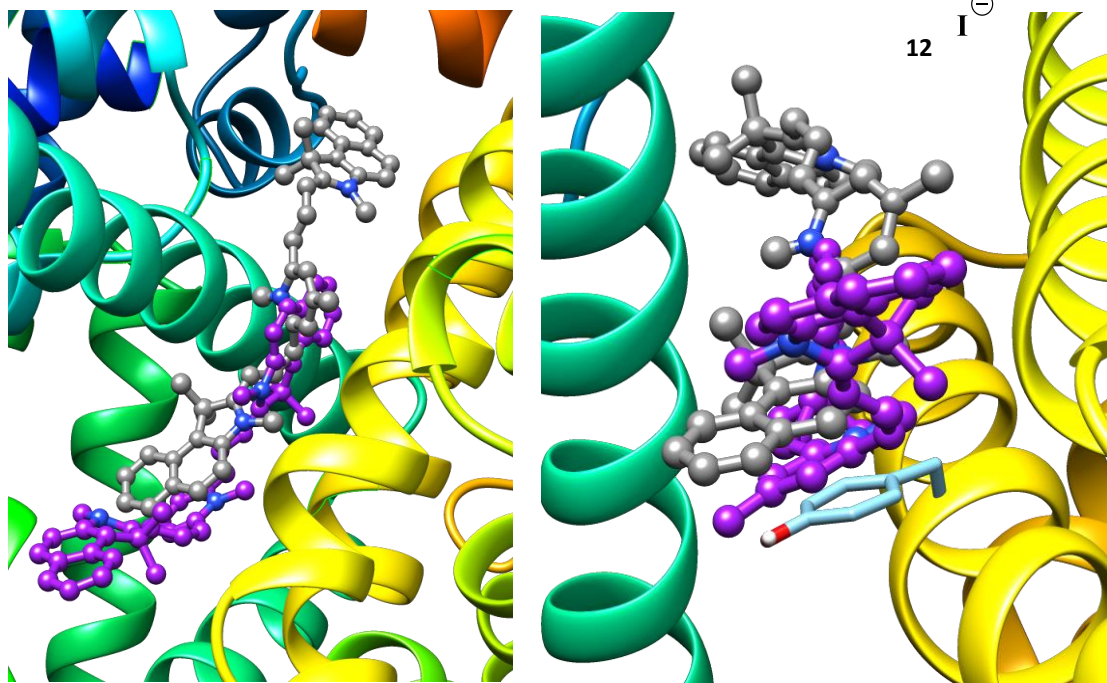
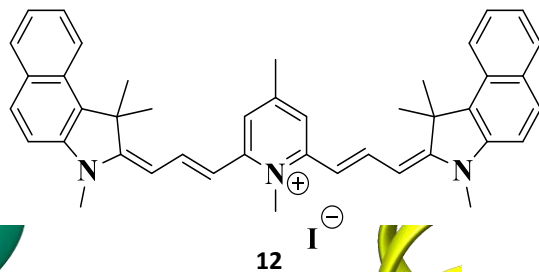


Изучение комплексообразования **12** с ЧСА методом молекулярного докинга



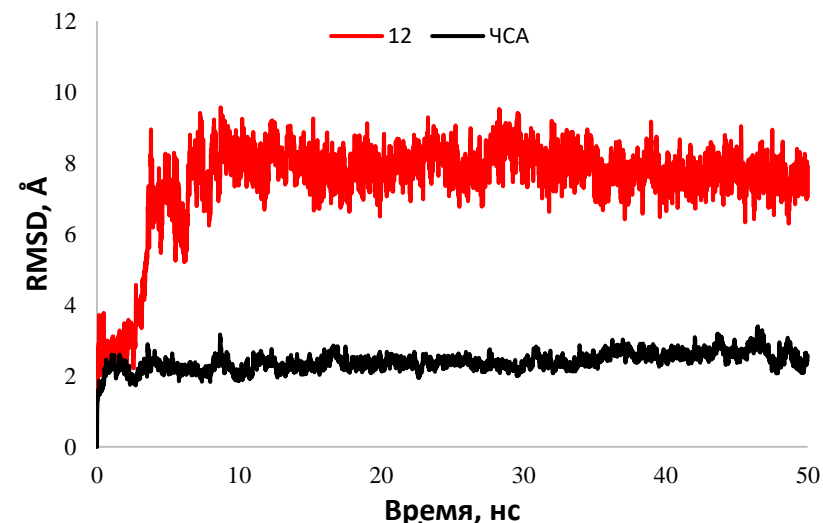
- Гидрофобные взаимодействия
- Образование водородных связей
- Стерически доступные сайты
- π - π стекинг с Tyr

Моделирование молекулярной динамики для комплекса **12** с ЧСА

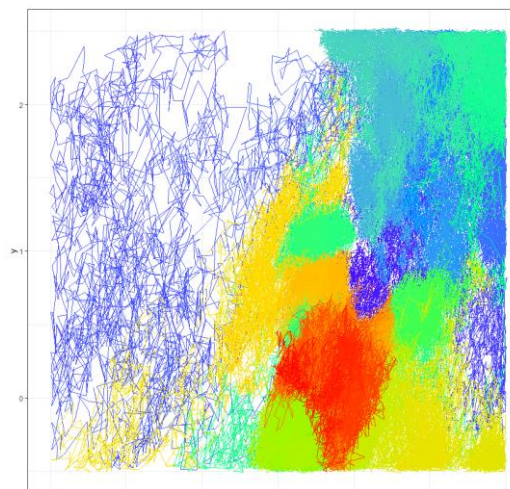


Две проекции наложения структур **12** в сайте связывания ЧСА:
молекулярный докинг, молекулярная динамика

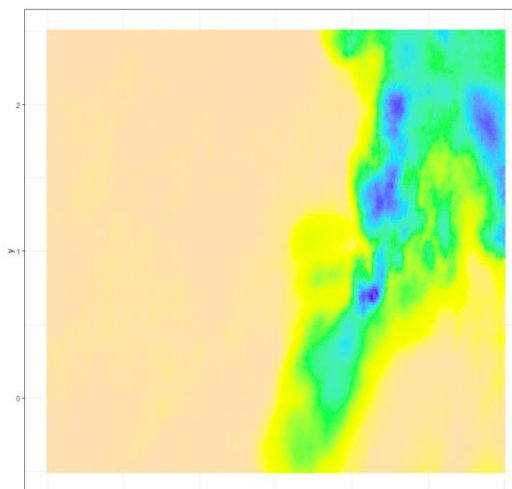
- Уменьшение конформационной подвижности в комплексе
- Возможны несколько сайтов и способов связывания
- Существенные различия для разных красителей
- Полуколичественное соответствие энергии связывания



Анализ энергетического профиля связывания методом AWH



Траектория моделирования
(460 нс)



Карта профиля свободной энергии

$\Delta E \sim -20$ кДж/моль (эксперимент -30.5 кДж/моль)
Полуколичественное согласие

Выводы

1. Методами молекулярного докинга и моделирования молекулярной динамики впервые проанализировано связывание с ЧСА и АФП, уточнены их сайты связывания и выявлены влияющие на связывание структурные факторы.
2. Благодаря неспецифичности связывания карбоцианиновых красителей с человеческим сывороточным альбумином и присутствию разнообразных аминокислот в сайтах связывания возможно связывание красителей самых разных структурных типов. Целесообразно наличие ароматических групп в структуре красителя для повышения его аффинности.
3. Методы молекулярного докинга пока не обеспечивают точного моделирования структуры комплексов.

Спасибо за внимание!