

# ОТЧЁТ О ПРОДЕЛАННОЙ РАБОТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБОРУДОВАНИЯ ИВЦ НГУ

## 1. Аннотация

В рамках работы были проведены молекулярное моделирование и молекулярная динамика комплексов человеческого сывороточного альбумина (HSA) с порфириновыми фотосенсибилизаторами, применяемыми в фотодинамической терапии. Разработан новый подход к определению сайтов связывания белок–лиганд, объединяющий слепой молекулярный докинг с ускорением на GPU и дипольную ЭПР-спектроскопию. Вычислительные ресурсы комплекса ИВЦ НГУ использовались для расчетов квантовой химии порфиринов (ORCA). Полученные результаты легли в основу статьи, опубликованной в журнале Journal of the American Chemical Society (JACS).

## 2. Тема работы

Определение сайтов связывания в комплексах белок–лиганд комбинированным методом слепого молекулярного докинга и дипольной ЭПР-спектроскопии.

*Примечание: тема работы была изменена по сравнению с первоначальной заявкой («Исследование структуры и функций комплексов рибосом человека методами магнитного резонанса») в связи с изменением тематики магистерской диссертации.*

## 3. Состав коллектива

**Колоколов Михаил Игоревич**, студент Физического факультета НГУ (кафедра химической и биологической физики, 2-й курс магистратуры на момент выполнения работы), МТЦ СО РАН. E-mail: m.kolokolov@tomo.nsc.ru.

**Крумкачева Олеся Анатольевна**, к.ф.-м.н., с.н.с. МТЦ СО РАН, доцент НГУ. Научный руководитель.

**Федин Матвей Владимирович**, д.ф.-м.н., профессор РАН, зав. лабораторией ЭПР МТЦ СО РАН, профессор НГУ.

## 4. Финансовая поддержка

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-73-10176, в части синтеза порфиринов) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

## 5. Научное содержание работы

### 5.1. Постановка задачи

Определение сайтов связывания между биомолекулами и лигандами является ключевой задачей в фармацевтической разработке. Метод слепого докинга позволяет искать потенциальные сайты связывания по всей поверхности белка, однако сталкивается с проблемами вычислительной сложности и неточности функций оценки, что приводит к неоднозначности результатов. В свою очередь, дипольная ЭПР-спектроскопия предоставляет распределения спин–спиновых расстояний, но не позволяет однозначно определить относительное положение объектов в трёхмерном пространстве.

Целью работы являлось создание нового подхода, объединяющего предсказательные возможности GPU-ускоренного слепого молекулярного докинга с конформационной информацией из экспериментов дипольной ЭПР-спектроскопии. В качестве модельной системы были выбраны комплексы человеческого сывороточного альбумина (HSA) с порфириновыми фотосенсибилизаторами различного заряда (анионные: TSPP, TCPP, DCPP, PheoA; нейтральный: THPP; катионные: C3Py, C5Py), используемыми в фотодинамической терапии.

Вычислительные задачи, решавшиеся на оборудовании ИВЦ НГУ, включали оптимизацию структур лигандов методами квантовой химии (ORCA).

## 5.2. Современное состояние проблемы

Высокоразрешающие экспериментальные методы (рентгеноструктурный анализ, крио-ЭМ, ЯМР) предоставляют детальную структурную информацию о биомолекулярных комплексах, однако каждый из них имеет ограничения, связанные с размером системы, подготовкой образцов и стоимостью. Это обуславливает активное использование вычислительных методов, в частности молекулярного докинга.

Слепой докинг обеспечивает всестороннее исследование поверхности белка, но требует значительных вычислительных ресурсов. Более того, даже наиболее передовые модели достигают точности ниже 50% при выборе позы с наименьшей энергией. Дипольная ЭПР-спектроскопия позволяет измерять распределения расстояний между парамагнитными метками (1.5–8 нм), однако для полного определения структуры требуется множество ограничений по расстояниям.

Методом, широко применяемым для изучения связывания фотосенсибилизаторов с альбумином, является FRET. Однако недавние исследования показали, что результаты FRET для систем альбумин–лиганд часто неверно интерпретируются из-за нарушения условия соотношения донор–акцептор 1:1 при наличии множественных сайтов связывания.

## 5.3. Описание алгоритма

1. Докинг между HSA в апо-форме (PDB: 1AO6) и фотосенсибилизаторами проводился с использованием GPU-ускоренной версии AutoDock 4 (AutoDock-GPU) на локальном оборудовании с GPU Nvidia RTX 4070. Для каждого лиганда выполнялось 5000 прогонов генетического алгоритма (LGA) на популяции из 2048 особей.

2. Полученные позы кластеризовались по RMSD с порогом 3 Å. Низконаселённые позы отфильтровывались (сохранялось 75% общей популяции). Дальнейшая кластеризация проводилась методом K-Means (SciPy) с определением оптимального числа кластеров методами Elbow и Silhouette.

3. Для каждого кластера рассчитывалось среднее расстояние от центра до спиновой метки MTSL, смоделированной на остатке Cys34 с помощью библиотеки ChiLife. Кластеры, расстояния которых не соответствовали экспериментальным распределениям LaserIMD, отсеивались. Как правило, это позволяло сократить число возможных сайтов связывания в 2–4 раза.

4. Трёхмерные структуры лигандов были оптимизированы, а парциальные заряды рассчитаны на уровне B3LYP/6-31+G\* с использованием пакета ORCA. Данные расчёты проводились на оборудовании ИВЦ НГУ.

5. Молекулярная динамика. Для оценки подвижности и стабильности комплексов проводились расчёты МД с помощью пакета GROMACS 2024 с силовым полем Amber FF14SB. Топологии лигандов создавались с помощью Antechamber/Асуре (GAFF2) с парциальными зарядами из квантово-химических расчётов. Система помещалась в кубический периодический бокс с водой TIP3P и ионами Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (0.15 M). Для каждого комплекса белок-сайт проводились 4 независимых симуляции по 20 нс (суммарная траектория 80 нс).

6. Анализ расстояний. По полученным траекториям МД для каждого кадра рассчитывались ротамеры спиновой метки (ChiLife) и распределения расстояний фотосенсибилизатор-нитроксид (MDAnalysis). Результаты сравнивались с экспериментальными данными LaserIMD.

#### 5.4. Полученные результаты

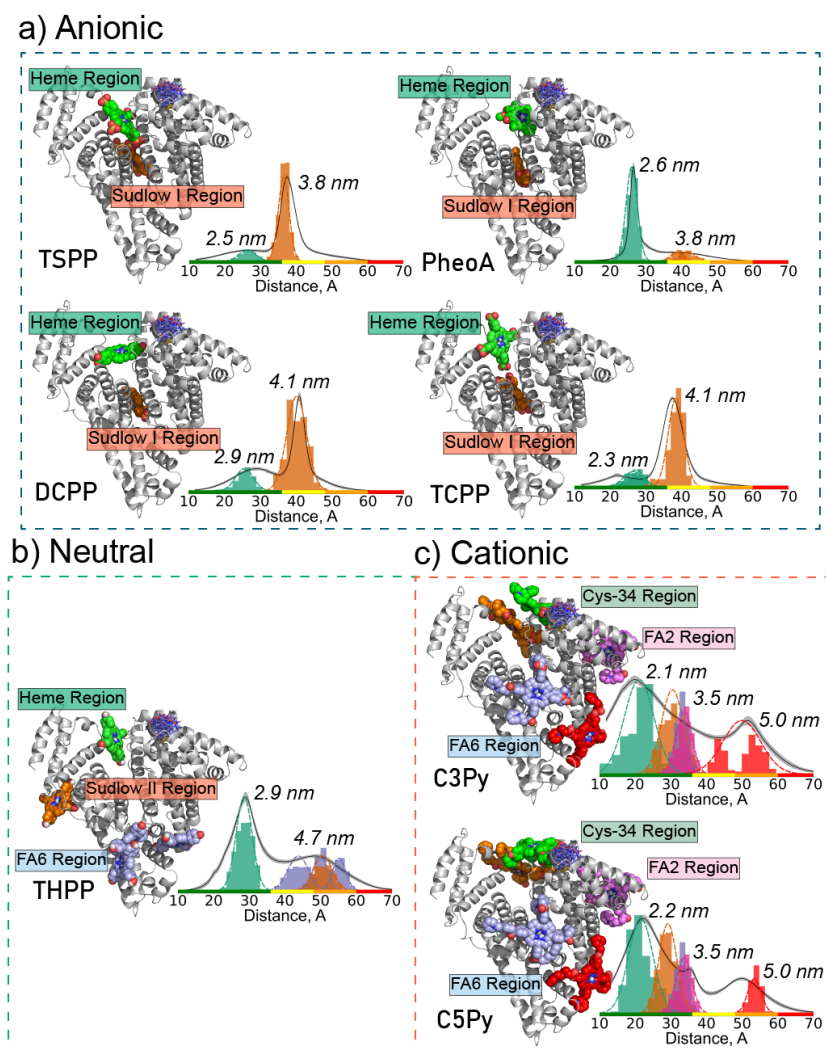


Рис. 1. Полученные карты связывания порфиринов с альбумином

Разработан комплексный подход к описанию структуры комплексов биомолекул с ЭПР-активными лигандами, объединяющий дипольную ЭПР-спектроскопию и молекулярное

моделирование. Экспериментальные спин–спиновые расстояния позволили эффективно фильтровать результаты молекулярного докинга и определять несколько сайтов связывания из одного эксперимента ЭПР.

Для анионных фотосенсибилизаторов (TSPP, TCPP, DCPP, PheoA) подтверждено связывание в области сайтов гема и Sudlow I, однако их относительные аффинности существенно зависят от структуры лиганда. Показано, что крупные порфирины с периферическими группами не могут полностью войти в сайт гема, в результате чего сайт Sudlow I становится доминантным.

Для нейтрального порфирина THPP идентифицирован доминантный сайт между субдоменами IB и IIIB вблизи сайта гема, а также три возможных сайта на поверхности альбумина, в том числе вблизи сайта жирных кислот FA6, что нетипично для порфиринов.

Впервые продемонстрировано разнообразное мультисайтовое связывание катионных порфиринов (C3Py, C5Py) с альбумином. Доминантный сайт расположен вблизи остатка Cys34 на субдомене IB. Эти сайты связывания находятся далеко от Trp214, что объясняет низкую чувствительность стандартного флуоресцентного метода для изучения таких комплексов.

Сравнение с ранее опубликованными данными (FRET и докинг) для TSPP и THPP показало, что предложенный подход даёт более точные и экспериментально обоснованные структуры, преодолевая ограничения флуоресцентных методов при наличии множественных сайтов связывания.

## **6. Эффект от использования кластера в достижении целей работы**

Использование вычислительных ресурсов ИВЦ НГУ являлось необходимым для оптимизации структур лигандов методами квантовой химии (ORCA, B3LYP/6-31+G\*). Использование многопроцессорных вычислительных систем обеспечило приемлемое время расчёта.

## **7. Перечень публикаций**

По итогам проекта была опубликована статья:

Kolokolov M., Sannikova N., Dementev S., Podarov R., Zhdanova K., Bragina N., Chubarov A., Fedin M., Krumkacheva O. Enhanced Binding Site Identification in Protein–Ligand Complexes with a Combined Blind Docking and Dipolar Electron Paramagnetic Resonance Approach. *Journal of the American Chemical Society* (2025). DOI: [10.1021/jacs.5c01274](https://doi.org/10.1021/jacs.5c01274). Импакт-фактор: 14.4 (JCR 2024).

Стоит отметить, что данная статья отмечена как Editors' Choice. Благодарность ИВЦ НГУ была включена в секцию Acknowledgments статьи.