

LIGAND-PROTEIN INTERAKCIJE 3-(1-(3-HIDROKSIPROPILAMINO)ETILIDEN)HROMAN-2,4-DIONA SA HUMANIM C REATIVNIM PROTEINOM

Edina Avdović¹, Dejan Milenković², Svetlana Jeremić³, Jelena Đorović², Nenad Vuković¹, Zana Dolićanin³, Srećko Trifunović¹, Zoran Marković³

Izvod: Struktura novo sintetisanog derivata kumarina, 3-(1-(3-hidroksipropilamino)-etiliden)-hroman-2,4-diona, ispitana je primenom teorijskih metoda. Za optimizaciju strukture ispitivanog kumarinskog derivata korišćena je teorija funkcionalne gustine: B3LYP funkcional (sa empirijskim ispravkama disperzije D3BJ) u kombinaciji sa 6-311+G(d, p) bazisnim setom. Urađen je molekularski doking, kao i analiza dobijenih rezultata kako bi se utvrdio potencijal inhibicije molekula ispitivanog jedinjenja prema humanom C-reaktivnom proteinu. Aktivnost inhibicije izračunata je za deset potencijalnih konformacija liganda unutar proteina.

Ključne reči: 3-(1-(3-hidroksipropilamino)-etiliden)-hroman-2,4-dion; CRP, molekularski doking

Uvod

Kumarini (benzopironi) su velika grupa heterocikličnih jedinjenja čiju osnovu čine kondenzovani benzenov i α -pironov prsten. Proučavanje kumarina je počelo 1820-te godine, kada je A. Vogel prvi put izolovao kumarin 2H-hromen-2-on (John Leo Abernethy, 1969) koji je poznat po mirisu vanile ili sveže pokošene trave, iz biljke *Coumarouna odorata* Aube (*Dipetryx odorata*), po kojoj je i dobio ime (kumaru, što na jeziku južnoameričkih indijanaca iz Francuske Gvajane znači drvo, Slika 1)



Slika 1. Drvo *Coumarouna odorata* Aube (*Dipetryx odorata*) i njegov plod
Figure 1. Wood *Coumarouna odorata* Aube (*Dipetryx odorata*) and its fruit

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (edinanp@hotmail.com);

²Istraživačko-razvojni centar za bioinženjering – BioIRC, Prvoslava Stojanovića 6, Kragujevac, Srbija;

³Državni univerzitet u Novom Pazaru, Vuka Karadžića bb, 36 300 Novi Pazar, Srbija.

Kumarini i njegovi derivati su veoma rasprostranjeni u prirodi, naročito u biljnom svetu, odakle je do danas izolovano više od 1300 različitih jedinjenja, koji se nalaze u različitim delovima biljaka (korenu, kori, stablu, plodu i listu) (Hoult i Paya, 1996). Osim u biljkama, kumarini su pronađeni i u proizvodima metabolizma nekih mikroorganizama i životinja (Moore, 1962).

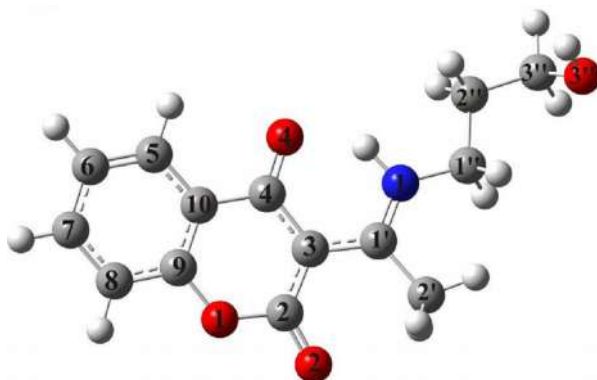
Kumarini pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti koje uključuju antibakterijsku, antitumorsku, antioksidativnu, antiinflamatornu, antifungalnu, (Talapatra i Talapatra, 2015) itd. Zahvaljujući širokom spektru delovanja ova jedinjenja su našla široku primenu u medicini u poboljšanju tretmana lečenja raznih bolesti. Međutim, neki derivati kumarina se ne mogu koristiti u terapeutske svrhe zbog njihovih toksičnih, kancerogenih i mutagenih osobina. Pored toga, kumarini se koriste koriste i kao aditivi u hrani, kao kumarinske boje, u kozmetickoj industriji itd.

Derivati kumarina su postali interesantni za hemičare zbog njihove izražene biološke aktivnosti, što je prouzrokovalo intenzivan razvoj brojnih tehnika za njihovu sintezu (Zabradnik, 1992). U ovom radu je opisana sintezaje novog derivat kumarina 3-(1-(3-hidroksipropilamino)-etiliden)-hroman-2,4-dion i ispitivana je njegova interakcija sa humanim C reaktivnim proteinom (CRP) korišćenjem molekulskog dokinga.

Materijal i metode rada

Ispitivano jedinjenje je sintetisano u reakciji 3-acetil-4-hidroksi kumarina sa 3-amino-1-propanolom u metanolu, korišćenjem procedure koju su opisali Budzisz i saradnici (Budzisz, 2003).

Simulacija molekulskog dokinga urađena je korišćenjem AutoDock 4.0 softvera (Morris i sar., 2009). Trodimenzionalna kristalna struktura CRP proteina uzeta je iz the Protein Data Bank (PDB ID: 1B09) (Thompson i sar., 1999). Discovery Studio 4.0 je korišćen za pripremu proteina za dokingovanje; da se uklonile ko-kristalizovani ligand, molekuli vode i kofaktori (BIOVIA Discovery Studio 2016). Za izračunavanje Kollman-ovih naelektrisanja i dodavanje polarnih vodonika korišćen je grafički interfejs AutoDockTools (ADT). Ispitivani molekul (Slika 2) je pre dokingovanja najpre optimizovan na B3LYP-D3BJ/6-311+ G (d, p) nivou teorije, i potvrđena je njegova X-ray struktura. Razmatrana je fleksibilnost liganda, dok je protein fiksiran u ADT-u. Sve veze liganda su postavljene kao rotirajuće. Primenjena je Geistengerova metoda za izračunavanje parcijalnih naelektrisanja. Svi proračuni za fleksibilno dokingovanje proteina i liganda su urađeni korišćenjem Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) metode.



Slika 2: Optimizovana struktura ispitivanog jedinjenja na B3LYP-D3BJ/6–311+G(d,p) nivou teorije sa numeracijom atoma

Figure 2. The optimized structure of investigated molecule obtained at the B3LYP-D3BJ/6–311+G(d,p) level of theory with with atom numbering

Rezultati istraživanja i diskusija

Procena inhibitorne aktivnosti ispitivanog jedinjenja prema humanom CRP proteinu, urađena je molekulskim dokingom. U ovoj studiji su određena mesta potencijalnih vezivanja liganda za protein, kao i energije njihovog vezivanja. Konformacija liganda koja je pokazala najnižu energiju vezivanja (najbolja pozicija) određena je na osnovu rezultata dokinga liganda i receptora. Položaj i orijentacija liganda unutar receptora (CRP) i interakcije sa aminokiselinama, koji su vezani za ligand, analizirani su i prikazani pomoću Discovery Studio 4.0 i AutoDockTools-a.

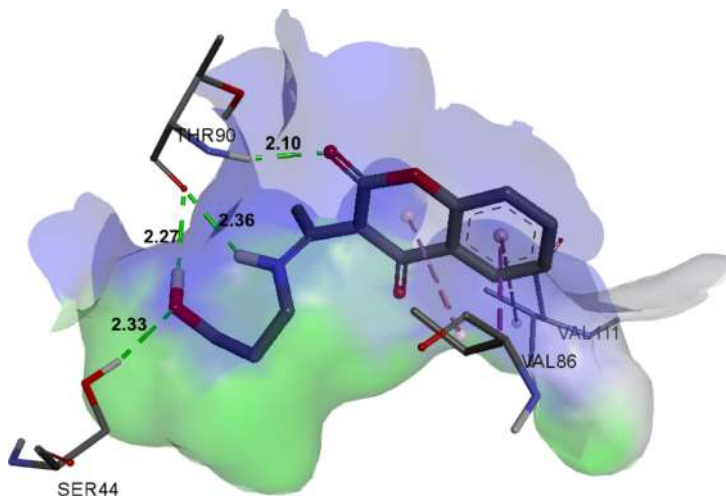
U Tabeli 1 navedene su vrednosti procenjene slobodne energije vezivanja i konstante inhibicije (K_i) za deset različitih konformacija ispitivanog liganda. Što je niža vrednost K_i smatra se da je veći stepen inhibicije.

Tabela 1. Vrednosti slobodne energije vezivanja (ΔG_{vez}) u kcal/mol i konstantne inhibicije $K_i(\mu M)$ različitih položaja liganada prema C reaktivnom proteinu
 Table 1. Estimated free energy of binding (ΔG_{bind}) in kcal/mol and estimated inhibition constant $K_i (\mu M)$ of different poses of ligand against C-reactive protein.

Konformacije liganda	ΔG_{vez} (kcal/mol)	K_i (μM)	Vodonične veze	Hidrofobni kontakti
1	-4.70	3.6×10^2	A:THR90 A:SER44	A: VAL86 A: VAL111
2	-4.49	5.1×10^2	A:VAL30	A:GLN31 A:VAL34
3	-4.41	5.9×10^2	A:GLN31 A:VAL34	A:VAL30 A:ALA27

4	-4.07	1.0x10 ³	A:VAL34	A:VAL30 A:ALA27
5	-4.02	1.1x10 ³	A:VAL30 A:GLN31	A:GLN31 A:VAL34
6	-3.88	1.4x10 ³	A:VAL34	A:VAL30 A:ALA27
7	-3.52	2.6x10 ³	/	A:GLN31 A:VAL34
8	-3.50	2.7x10 ³	/	A:VAL30 A:VAL34
9	-3.29	3.9x10 ³	/	A:VAL30 A:VAL34
10	-3.26	4.1x10 ³	A:GLN35	A:ASP32 A:TYR33

Najniže vrijednosti ΔG_{vez} i K_i su dobijene za konformaciju 1 (Tabela 1). Analizirajući položaje aktivnih amino kiselina, može se zaključiti da se ligand vezuje na katalitičkom mestu substrata slabim nekovalentnim interakcijama. Najistaknutije su H-veze, alkil- π i π - σ interakcije. Treonin i Serin na pozicijama 90 i 44, u primarnim strukturama lanca A, imaju dominantnu ulogu kao aktivna mesta humanog CRP proteina za inhibitornu aktivnost, bez obzira na konformaciju ispitivanog liganda (slika 3). THR90 formira tri vodonične veze (2.10, 2.27 i 2.36 Å dužine) sa C = O, OH i amino grupama liganda, dok SER44 formira vodoničnu vezu od 2.33 Å dužine sa kiseonikom iz hidroksilne grupe liganda (Slika 3). Val86 formira slabe interakcije π - σ i alkil- π sa benzenom i hromanskim prstenovima liganda, dok VAL111 formira alkil- π slabu interakciju sa benzenskim prstenom (Slika 3).



Slika 3: Interakcija između liganda i amino kiselina iz humanog C reaktivnog proteina
Figure 3. Picture showing interaction between ligand and amino acids in human C-reactive protein.

Zaključak

Novo sintetisani derivat kumarina 3-(1-(3-hidroksipropilamino)-etiliden)-hroman-2,4-dion je ispitivan primenom teorijskih metoda. Izabrani DFT model (B3LYP-D3BJ/6-311+G(d,p)) je veoma dobro reprodukovao X-ray strukturu sintetisanog molekula. Rezultati molekuskog dokinga pokazuju da ispitivano jedinjenje formira stabilan kompleks sa humanim CRP-om, što je evidentno iz dobijenih vrednosti energija vezivanja (ΔG_{vez} u kcal/mol). Najznačajnije interakcije između liganda i proteina su ostvarene vodonične veze, alkil- π i π - σ interakcije. Na osnovu dobijenih preliminarnih rezultata može se zaključiti da ligand 1 (ispitivano jedinjenje) pokazuje inhibitornu aktivnost prema humanom C-reaktivnom proteinu.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekata "Metode modeliranja na više skala sa primenama u biomedicini" (broj: 174028), „Sinteza, modelovanje, fizičko-hemijske i biološke osobine organskih jedinjenja i odgovarajućih kompleksa metala" (broj: 172016) i „Dinamika nelinearnih fizičko-hemijskih i biohemijskih sistema sa modeliranjem i predviđanjem njihovih ponašanja pod neravnotežnim uslovima" (broj: 172015), koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Literatura

- Abernethy J.L., (1969) The Historical and Current Interest in Coumarin, *Journal of Chemical Education*, 46: 561-568.
- BIOVIA Discovery Studio 2016, (2016). Accelrys Studio Inc, San Diego.
- Budzisz E., Brzezinska E., Krajewska U., Rozalski M., (2003) Cytotoxic effects, alkylating properties and molecular modelling of coumarin derivatives and their phosphonic analogues, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38: 597-603.
- Hoult J. R. S. and Paya M., (1996) Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential, *General Pharmacology*, 27: 713-722
- Moore B. P., (1962), Coumarin-like Substances from Australian Termites, *Nature*, 195: 1101-1102
- Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J., (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computational Chemistry*, 30: 2785-2791.
- Talapatra S. K., and Talapatra B., (2015), *Chemistry of Plant Natural Products*, Berlin Heidelberg, Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Thompson D., Pepys M. B., Wood S. P., (1999) The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine, *Structure*, 7: 169-177.
- Zabradnik M., (1992) *The Production and Application of Fluorescent Brightening Agent*, New York, USA, John Wiley and Sons Ltd

LIGAND-PROTEIN INTERACTION OF 3-(1-(3-HYDROXYPROPYLAMINO)ETHYLIDENE)CHROMAN-2,4-DIONE WITH HUMAN C REACTIVE PROTEIN

Edina Avdović¹, Dejan Milenković², Svetlana Jeremić³, Jelena Đorović², Nenad Vuković¹, Zana Dolićanin³, Srećko Trifunović¹, Zoran Marković³

Abstract

The structure of the newly synthesized coumarin derivative, 3-(1-(3-hydroxypropylamino)-ethylidene)-chroman-2,4-dione, was investigated theoretically. The density functional theory calculations, with B3LYP functional (and with empirical dispersion corrections D3BJ) in combination with the 6-311+G(d,p) basis set, are performed in order to optimized the molecular structure of the investigated coumarin derivative. Molecular docking analysis was carried out in order to identify the potency of inhibition of the title molecule against human C-reactive protein. The inhibition activity was obtained for ten conformations of ligand inside protein.

Key words: 3-(1-(3-hydroxypropylamino)ethylidene)chroman-2,4-dione, CRP, Molecular docking

¹University of Kragujevc, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (edinanp@hotmail.com);

²Bioengineering Research and Development Center – BioIRC, Prvoslava Stojanovića 6, Kragujevac, Serbia;

³State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb, 36 300 Novi Pazar, Serbia.