

Fehérje-ligandum kölcsönhatások és a kötődés termodinamikai jellemzése

Ferenczy György

Semmelweis Egyetem
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

ferenczy.gyorgy@med.semmelweis-univ.hu

Célkitűzés/témák

- Biokémiai folyamatok, elsősorban ligandum-fehérje kötődés
 - kvalitatív és kvantitatív jellemzése
 - termodinamikája (és kinetikája)
 - befolyásolása, gyógyszertervezés
 - molekuladinamika
 - Kvantitatív jellemzés eszköze
 - Kitekintés más alkalmazásokra

2

Vázlat

- Alapok
- Számítás-mérés
- Víz szerepe
- Ligandum-fehérje kötés „lépései”
- Számítás – Molekuladinamika

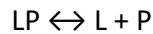
3

Ligandum-fehérje kötődés szerepe

- Jelátvitel
 - G-fehérjéhez kapcsolt receptor
- Enzimkatalízis
 - Citokróm P450
- Transzkripció
 - nukleáris receptorok
- ...
- Endogén és exogén (pl gyógyszer) ligandumok

4

Néhány összefüggés



$$K_d = \frac{[L][P]}{[LP]}; pK_d = -\log(K_d)$$

$$\Delta G_{\text{bind}} = RT \ln(K_d/C_{\text{ref}})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{tipikus kísérleti körülmények (NPT)}$$

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S \quad \text{oldat számításánál gyakran használt (NVT, kanonikus)}$$

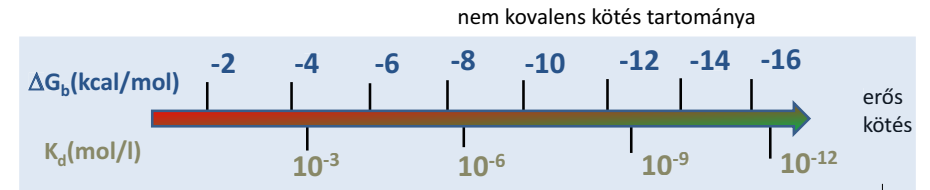
$$F = -k_B T \ln Z,$$

$$Z = \sum_i e^{-\frac{E_i}{k_B T}} - \text{állapotösszeg} \quad (\sim \int e^{-\frac{E(r,p)}{k_B T}} dr dp)$$

csak egyszerű rendszerekre számítható

5

Szabadenergia – Egyensúlyi állandó



$$A + P \leftrightarrow AP; K_A = \frac{[A][P]}{[AP]}; \Delta G_A^{\text{bind}} = RT \ln K_A$$

$$B + P \leftrightarrow BP; K_B = \frac{[B][P]}{[BP]}; \Delta G_B^{\text{bind}} = RT \ln K_B$$

$$\Delta \Delta G = \Delta G_B^{\text{bind}} - \Delta G_A^{\text{bind}} = RT \ln \frac{[B]}{[BP]} / \frac{[A]}{[AP]}$$

$$\Delta \Delta G \sim 1.4 \text{ kcal/mol} \rightarrow \frac{[B]}{[BP]} / \frac{[A]}{[AP]} \sim 10$$

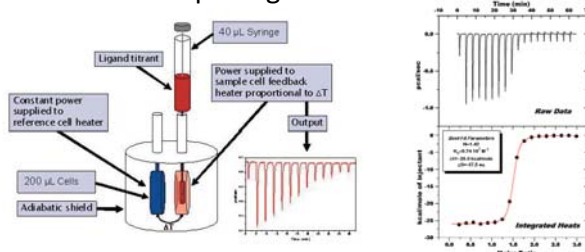
$$2.8 \text{ kcal/mol} \rightarrow \frac{[B]}{[BP]} / \frac{[A]}{[AP]} \sim 100$$

biotin-avidin
 $\Delta G = -20.4 \text{ kcal/mol}$
 $K_d = 10^{-15} \text{ mol/l}$

6

Kötési termodinamika mérése

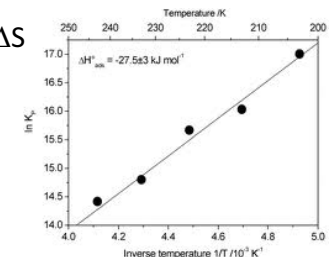
- Izotermális titráló kalorimetria
 - n , K_d , ΔH $\rightarrow \Delta G$, ΔS
 - korlátok:
 - oldatban
 - fehérje mennyiség (10-100 μg)
 - áteresztőképesség



7

Kötési termodinamika mérése

- Van't Hoff analízis
 - $\ln K_d = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R}$
 - K_d hőmérséklet függéséből ΔH és ΔS
 - Kísérleti technikák
 - Radioligandum leszorítás
 - Tömegspektrometria
 - Kromatográfia
 - Felületi plazmon rezonancia (SPR)
 - Korlát
 - ΔH hőmérséklet függése
 - Extrapoláció (ΔS : $1/T=0$)



8

Hidrofób effektus

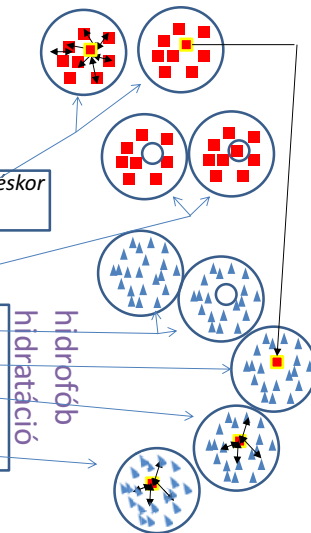
- Hidrofób effektus:

Apoláris vegyület átvitele apoláris oldatából vízbe
(szénhidrogén -> vízbe)

*Analógia (inverz): deszolvatáció ligandum-fehérje kötődéskor
apoláris részek: oldat->kölcsönhatás egymással*

- Apoláris kölcsönhatások megszűnése
- Üres hely betöltése az apoláris közegben
- Üreg kialakítása vízben
- Apoláris vegyület behelyezése
- Oldott anyag – oldószer kölcsönhatás létrejötte
- Vízszerkezet átrendeződése

ΔG pozitív



9

Hidrofób effektus

- Hidrofób effektus:

ΔG nő

20°C: ΔH (kedvező) és $T\Delta S$ (kedvezőtlen) csökken;

$T\Delta S$ változás dominál

Magasabb T – ΔG alig változik, de

ΔH nő és dominál – energetikailag kedvezőtlen
(kölcsönhatást feláldoz a rendezetlenség növeléséért)

– Magyarázat: hidrofób hidratáció lépésire koncentrál

10

Hidrofób hidratáció

- Kulcstényezők az entrópia csökkenéshez:

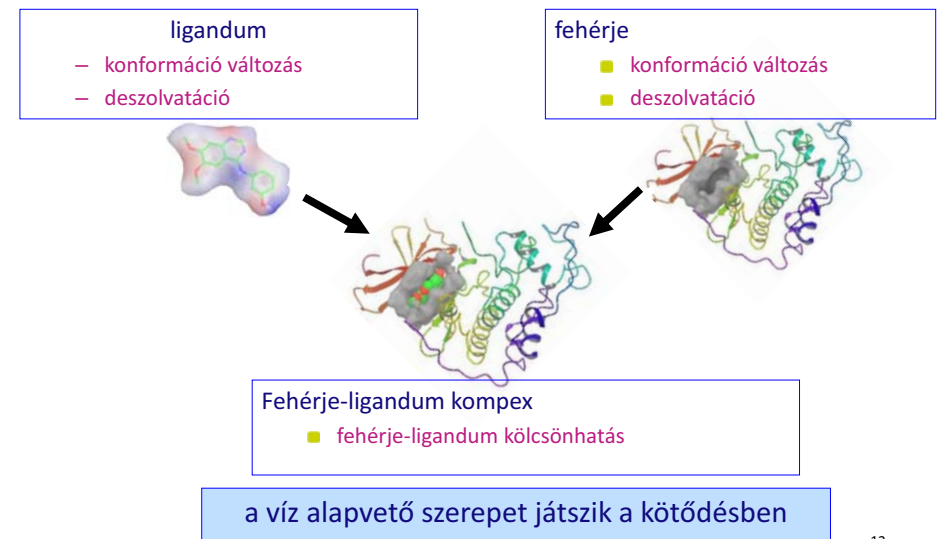
- Víz molekula kis mérete - üreg képződés
- H-híd kötés az oldott molekulák közelében
 - Erősebb és több H-híd – jéghegy modell
 - ⇕
 - Erősebb, de kevesebb H-híd – „two-state” modell

• Milyen mértékben felelősek a fentiek ΔH és $T\Delta S$ változásért?

• Nincsen általános érvényű kvantitatív modell!

11

Fehérje-ligandum kötődés „lépései”



12

Kötődés kvalitatív termodinamikája

- Deszolvatáció (ligandum+fehérje)
 - kedvező ΔS (vízszerkezet változás)
 - kedvezőtlen ΔH
- Konformáció változás (ligandum+fehérje)
 - kedvezőtlen ΔH (kötés előtt optimális)
- Fehérje-ligandum kölcsönhatás
 - kedvezőtlen ΔS (korlátozott mozgás)
 - kedvező ΔH (poláris és van der Waals kölcsönhatások)

ΔG több ellentétes hatású tag összege

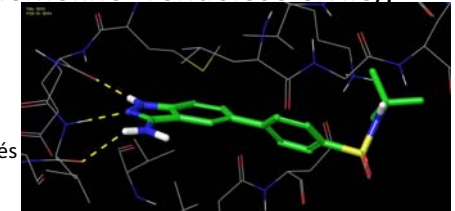
13

Kötődés kvalitatív termodinamikája

- ΔG , ΔH , ΔS szerkezeti elemekhez rendelése elvileg problémás

– Additivitás korlátozott

- ΔH additivitás jó közelítés
- ΔS additivitása rossz közelítés

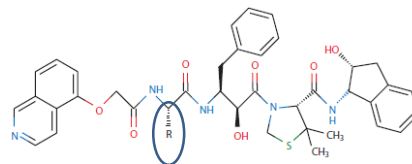
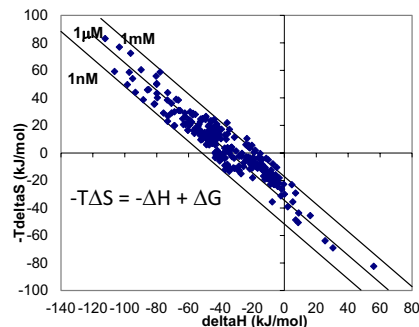


- ΔG , ΔH , ΔS tényleges lépésekhez rendelhető - állapotfüggvények

14

Entalpia-entrópia kompenzáció

- Fehérje-ligandum rendszer kis szerkezeti változása tipikusan nagy és ellentétes irányú $\Delta\Delta H$ és $\Delta\Delta S$ változást, és kisebb $\Delta\Delta G$ változást eredményez
 - a kompenzáció a jelenségek széles körében észlelt
 - vízben és apoláris oldószerben egyaránt



R group	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
-S-CH ₃	-14.87(9)	-8.2(2)	-6.67(9)
-SO ₂ -CH ₃	-14.6(2)	-12.1(6)	-2.5(2)

Annu. Rev. Biophys. 2013, 42:121–42

15

Affinitás és molekula méret

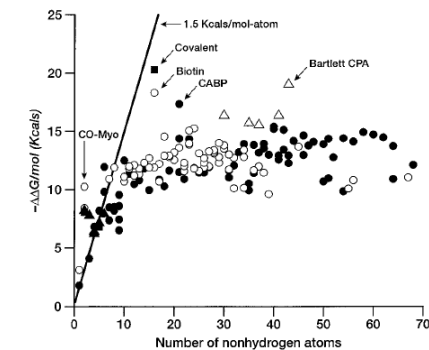


FIG. 1. Free energy of binding (in kcal/mol) for ligands and enzyme inhibitors plotted as a function of the number of nonhydrogen atoms in the ligand. See Table 1. A line with slope of 1.5 kcal/mol and an intercept of 0 is included as a visual aid to analysis. Δ , Metal ions or metalloenzymes; \blacktriangle , small anions; \circ , natural ligands; \bullet , enzyme inhibitors.

PNAS 1999, 96, 9997

16

Összefoglalás

- Kötődési termodinamika – ligandum-fehérje kölcsönhatás jellemzése
- Kötődés meghatározó, de nem kizárólagos elemei: poláris kölcsönhatások és apoláris deszolvatáció
- Kapcsolódó jelenségek: hidrofób effektus, entalpia-entrópia kompenzáció
- A ligandum mérete befolyásolja a kötődés módját
 - ΔG_{\max} – elérhető szabadentalpia nyereség mérettel előbb gyorsan, majd lassan nő

17

Molekuladinamika

2015.10.08

18

Bevezetés

- Molekula dinamika - Időfüggő tulajdonságok vizsgálata
 - szerkezet
 - dinamika
 - termodinamika



19

Történet

- Alder, B. J. and Wainwright, T. E.
J. Chem. Phys. **27**, 1208 (1957)

[illegible]

- McCammon, J. A., Gelin, B. R., and Karplus, M.
Nature (Lond.) **267**, 585 (1977)



20

Néhány alapfogalom

- Termodinamikai állapot
 - A rendszert néhány paraméter jellemzi; pl: T, P, N
- Mikroszkopikus állapot
 - A rendszert az atomok koordinátái és impulzus momentumai (fázistér) jellemzik
- Termodinamikai sokaság
 - Azonos termodinamikai állapotokhoz tartozó mikroszkopikus állapotok együttese
- Molekula dinamikai szimuláció
 - Egy adott sokasághoz tartozó fázistér pontjainak előállítása az idő függvényében

21

Termodinamikai sokaságok

- Mikrokanonikus – NVE (elszigetelt rendszer)
- Kanonikus – NVT (termikus egyensúly)
- Izoterm-izobar – NPT
- Nagykanonikus – μVT (egyensúly részecsketartállyal)

22

Ergodikus hipotézis

- Mérhető mennyiségek: sokaság átlag $\langle A \rangle_{sokaság}$
- Molekuladinamika: időátlag $\langle A \rangle_{idő}$
- Ergodikus hipotézis:
$$\langle A \rangle_{idő} = \langle A \rangle_{sokaság}$$

„elég” hosszú idejű MD – megfelelő mintavétel

23

Erőtér

- Molekula mechanika
 - „Klasszikus”
 - Egyszerű, gyorsan számítható
 - Paramétereket tartalmaz
 - a pereméter illesztés terében alkalmazható
 - kémiai reakciókra tipikusan nem jó
- Kvantum mechanika
 - pontos
 - számításigényes

24

Molekula mechanika

$$E = E_{\text{str}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{tors}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{el}} + E_{\text{cross}}$$

intramolekuláris

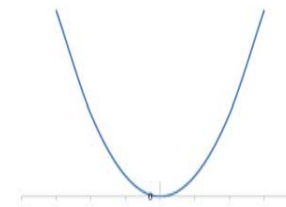
intermolekuláris

25

Kötésnyújtási energia

$$E_{\text{str}} = k(r - r_0)^2$$

$$F_{\text{str}} = -2k(r - r_0)$$

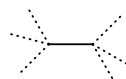


r_0 környezetében jó
 k és r_0 atomoktól függő paraméterek

26

Kötésnyújtási energia - paraméterek

$$E_{\text{str}} = k(r - r_0)^2$$



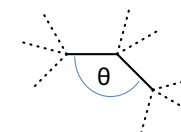
general class	atom type ¹	description
hydrogen types		
	H	amide or amine hydrogen
	HC	explicit hydrogen attached to carbon
	HO	hydrogen on hydroxyl oxygen
	HS	hydrogen attached to sulfur
	HW	hydrogen in water
	H2	amino hydrogen in NH ₂
	H3	hydrogen of lysine or arginine (positively charged)
all atom carbon types ²		
	C	sp ² carbonyl carbon and aromatic carbon with hydroxyl substituent in tyrosine
	CA	sp ² aromatic carbon in 6-membered ring with 1 substituent
	CB	sp ² aromatic carbon at junction between 5- and 6-membered rings
	CC	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring with 1 substituent and next to a nitrogen
	CK	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring between 2 nitrogens and bonded to 1 hydrogen (in purine)
	CM	sp ² same as C2 but one substituent
	CN	sp ² aromatic junction carbon in between 5- and 6-membered rings
	CO	sp ² carbon in 6-membered ring of purine between 2 HC nitrogens and bonded to 1 hydrogen
	OR	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring between 2 nitrogens and bonded to 1 H (in his)
	CT	sp ² carbon with 4 explicit substituents
	CV	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring bonded to 1 H and bonded to an explicit hydrogen
	CW	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring bonded to 1 H and bonded to an explicit hydrogen
	C*	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring with 1 substituent

Bond Stretching Potential Parameters			
Bond	used for	K, kcal mol ⁻¹ Å ⁻²	R _{eq} / Å
CT-CT	BM ¹ , EM ¹	310.0	1.526
CT-H1	BM ¹ , EM ¹	340.0	1.090
CT-HC	BM ¹ , EM ¹	340.0	1.090
CT-NA	BM ¹ , EM ¹	337.0	1.475
CR-H3	BM ¹ , EM ¹	367.0	1.080
CR-NA	BM ¹ , EM ¹	477.0	1.343
CW-H4	BM ¹ , EM ¹	367.0	1.080
CW-NA	BM ¹ , EM ¹	427.0	1.381
CW-CW	BM ¹ , EM ¹	549.0	1.350
AL-Cl	TC ¹	116.1	2.170
P-F	PF ¹	260.3	1.646
NN-ON	NO ¹	300.0	1.260

27

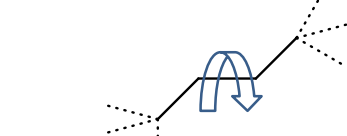
Kötéshajlítás

$$E_{\text{bend}} = k(\theta - \theta_0)^2$$



28

Torziós/dihedrális szög

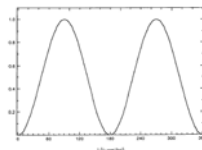
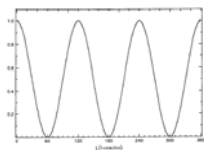


$$E_{tors} = \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)]$$

V_n – gát magasság
n - periodicitás

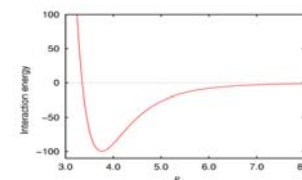
Dihedral angle (atom types)				V_n , kcal/mol	n	ϕ_0	comments
C	CT1	NH1	C	0.2000	1	180.00	! backbone phi
NH1	C	CT1	NH1	0.6000	1	0.00	! backbone ksi
CT1	C	NH1	CT1	1.6000	1	0.00	! backbone omega
CA	CA	CA	CA	3.1000	2	180.00	! Phe side chain
H	OH1	CT2	CT1	0.4200	3	0.00	! Ser side chain

~15000 paraméter



29

van der Waals kölcsönhatás



Közele: taszító; $\exp(-r)$; r^{-12}

Közepes: vonzó; r^{-6} ; diszperzió

Távoli: eltűnik

$$E_{vdw} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} \right] - \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

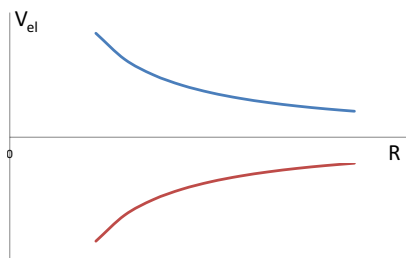
$$\sigma_{ij} = \frac{1}{2}(\sigma_i + \sigma_j) \quad \epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}$$

30

Elektrosztatikus kölcsönhatás

$$V_{el} = \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}$$

Coulomb



31

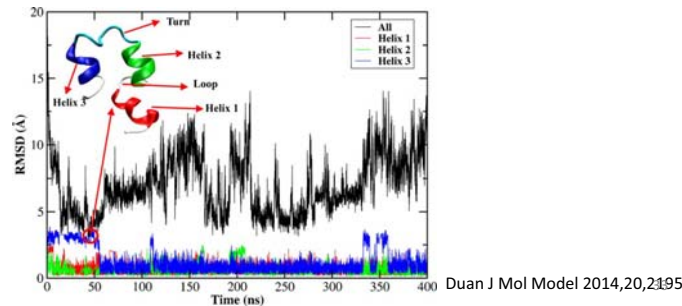
MM paraméterek meghatározása

- Kvantum mechanika számítások
- Validálás: kísérleti eredmények
 - Makromolekula szerkezet
 - NMR adatok
 - Van der Waals komplexek szerkezete és energiája
- Kiterjesztés analógia alapján
- Hiba kioltás; paraméterek kölcsönös függősége

32

MM erőter minősége

- Fehérje szerkezet
- DNS, RNS szerkezet
- Szerves molekulák konformációja
- Ligandum-fehérje kölcsönhatás
- Lipidek, membránok szerkezete és kölcsönhatásai
- ...



Néhány MM erőter

- Charmm (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics)
- AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement)
- OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations)
- GROMOS (GRoningen Molecular Simulation)
- MMFF (Merck Molecular Force Field)

34

MD algoritmus

Newtoni mechanika

$$r^N(r_1, r_2 \dots r_N) \quad p^N(p_1, p_2 \dots p_N)$$

$$U(\underline{r}) \quad K(\underline{p}) = \sum_i \frac{|p_i|^2}{2m_i}$$

$$H = K + U \quad \dot{r}_i = \frac{p_i}{m_i} \quad \dot{p}_i = f_i$$

35

Verlet algoritmus

$$p_i(t), r_i(t) \rightarrow p_i(t + \delta t), r_i(t + \delta t)$$

$$\rightarrow f_i(t)$$

$$p_i\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = p_i(t) + \frac{1}{2}\delta t \cdot f_i(t)$$

$$r_i(t + \delta t) = r_i(t) + \frac{\delta t \cdot p_i\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right)}{m_i}$$

$$\rightarrow f_i(t + \delta t)$$

$$p_i(t + \delta t) = p_i\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) + \frac{1}{2}\delta t \cdot f_i(t + \delta t)$$

Tipikus δt biokémiai rendszerek szimulációjánál: 1-4 fs

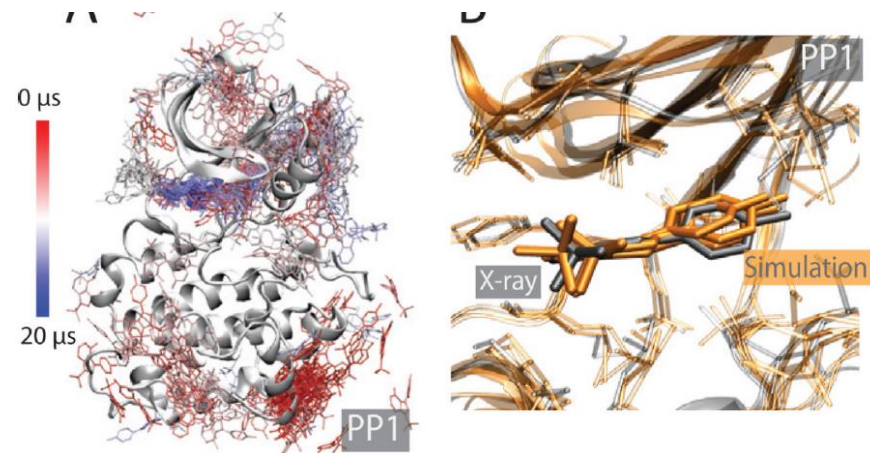
36

Alkalmazások

1. dinamika

37

Példa – ligandum kötés folyamata



PP1 molekula 15μs szimuláció alatt megtalálja a Src kináz kötőzsebét

JACS 2011 133 9181

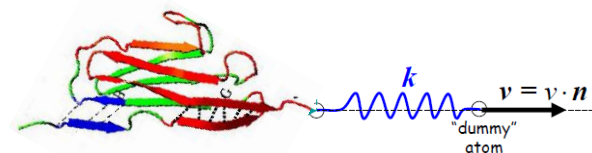
MD alkalmazások

2. erővezérelt molekula dinamika

39

Erővezérelt MD

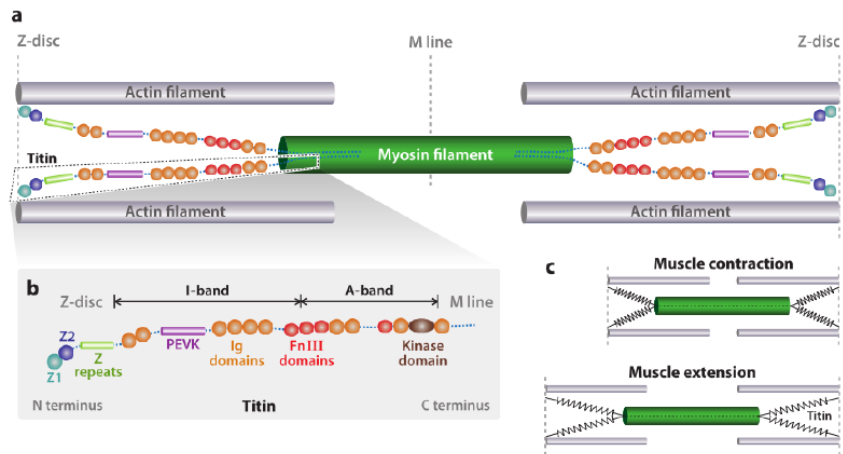
- Állandó sebességű húzás



$$U = \frac{1}{2} k [vt - (\vec{r} - \vec{r}_0) \cdot \vec{n}]^2$$

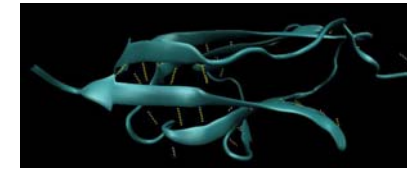
- Állandó erővel való húzás

Titin szerkezet - funkció

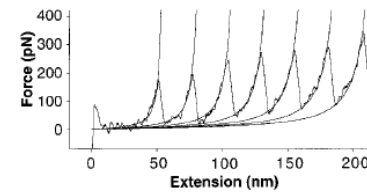


41

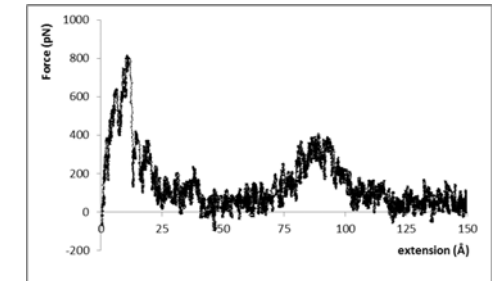
Kigombolyodás és erő



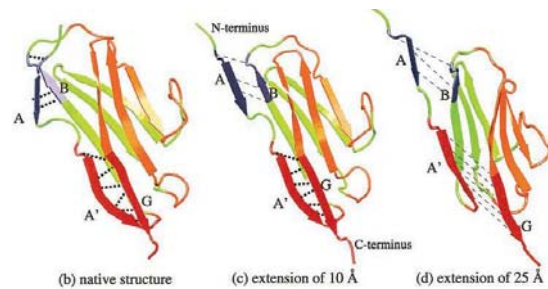
titin Ig27



Rief et al. (1997 Science 276 1109)



Kigombolyodás és szerkezet

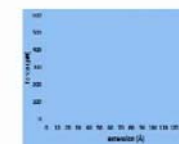


Lu, H., and Schulten, K. (2000).. Biophys. J. 79, 51–65

Titin Fn domén kitekeredés mechanizmusa 1.



A78
 $v=1\text{Å/ns}$



MD lehetőségek és korlátok

- Lehetőségek
 - Szerkezet vizsgálat/finomítás
 - Dinamika
 - Konformációs viszonyok, Ligandum-fehérje kötődés, erővezérelt folyamatok,...
 - Termodinamika
 - Szabadentalpia változás
 - oldódás, ligandum-fehérje kötődés,...
- Korlát
 - Mintavétel mértéke
 - Erőtér pontossága
 - Kémiai változás általában nem vizsgálható