

Fehérje-ligandum kölcsönhatás kvantitatív jellemzése számítógépes modellezéssel

1. rész

Ferenczy György

MTA-SE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport

ferenczy.gyorgy@med.semmelweis-univ.hu

2012.10.18

1

Vázlat

- Célkitűzés, témák
- Alapösszefüggések
- Számítás-mérés
- Víz szerepe
- Ligandum-fehérje kötés „lépései”
- Termodinamikai mennyiségek és ligandum méret
- Számítási módszerek; 1 rész

2012.10.18

2

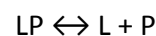
Célkitűzés/témák

- Biokémiai folyamatok
 - kvantitatív jellemzése számítógépes modellezéssel
 - megértése
 - befolyásolása
 - gyógyszertervezés
- termodinamika
- (kinetika)

2012.10.18

3

Alapösszefüggések



$$K_d = \frac{[L][P]}{[LP]}$$

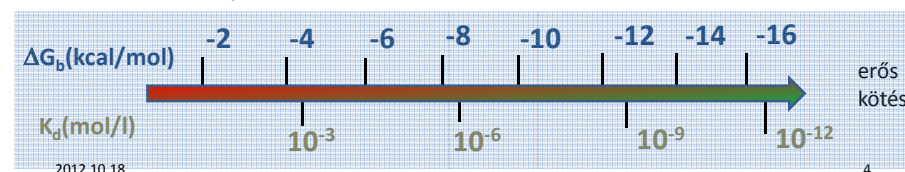
$$\Delta G_{\text{bind}} = RT \ln K_d$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{tipikus kísérli körülmények}$$

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

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

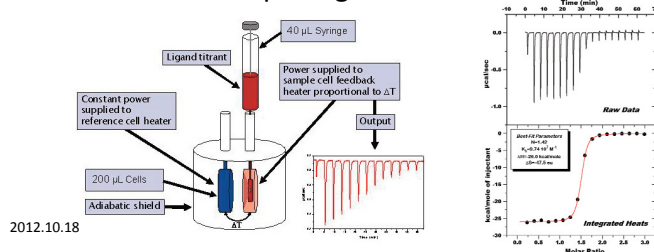
$$Z = \sum_i e^{-\frac{E_i}{k_B T}} \text{ - csak egyszerű rendszerekre számítható}$$



4

Kötési termodinamika mérése

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

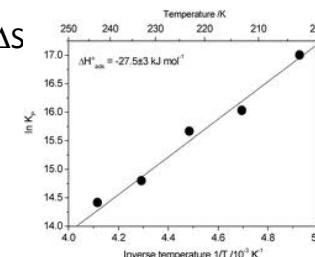


2012.10.18

5

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



2012.10.18

6

Hidrofób effektus

- Hidrofób effektus:
 - Apoláris vegyület átvitele apoláris oldatából vízbe
 - Apoláris kölcsönhatások megszűnése
 - Üres hely betöltése az apoláris közegben
 - Üreg kialakítása vízben
 - Apoláris vegyület behelyezése
 - Oldott anyag – oldószer kölcsönhatás létrejötte
 - Vízszerkezet átrendeződése

hidrofób
hidratáció

ΔG pozitív

2012.10.18

7

Hidrofób effektus

- Hidrofób effektus:
 - ΔG nő
 - 20°C: ΔH és $T\Delta S$ csökken, $T\Delta S$ változás dominál
 - Magasabb T – ΔG alig változik, de
 - ΔH nő és dominál – energetikailag kedvezőtlen (kölcsönhatást feláldoz a rendezetlenség növelésért)
 - Magyarázat: hidrofób hidratáció lépésire koncentráll

2012.10.18

8

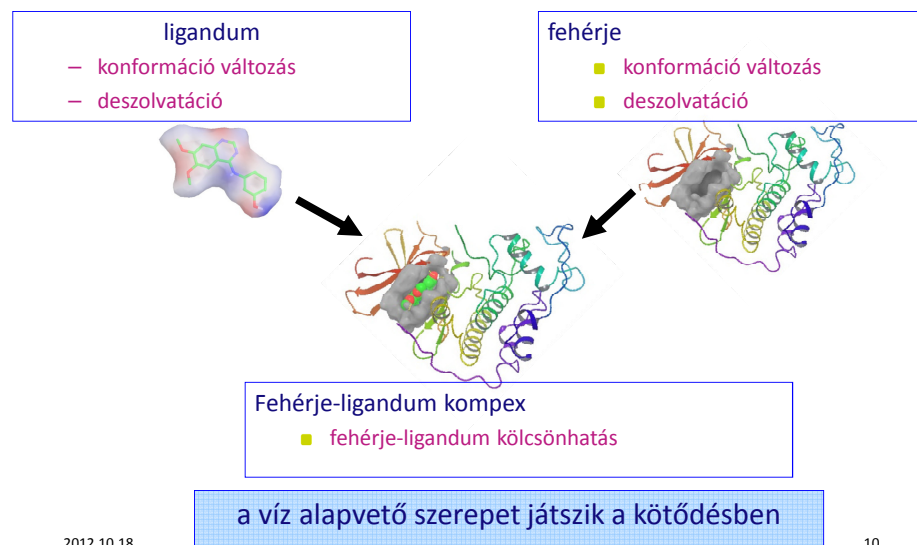
Hidrofób hidratáció

- Kulcstényezők:
 - Vízmolekula kis mérete
 - Üreg képződés – negatív entrópia
 - H-híd kötés az oldott molekulák közelében
 - Erősebb H-hidak – jéghegy modell
 - Erősebb, de kevesebb H-híd
- Milyen mértékben felelősek a fentiek ΔH és $T\Delta S$ változásért?
- Nincs általánosan érvényes modell

2012.10.18

9

Fehérje-ligandum kötődés „lépései”



2012.10.18

10

Kötődés kvalitatív termodinamikája

- Deszolvatáció (ligandum+fehérje)
 - kedvező ΔS
 - kedvezőtlen ΔH
- Konformáció változás (ligandum+fehérje)
 - kedvezőtlen ΔH
- Fehérje-ligandum kölcsönhatás
 - kedvezőtlen ΔS
 - kedvező ΔH

ΔG több ellentétes hatású tag összege

2012.10.18

11

Kötődés kvalitatív termodinamikája

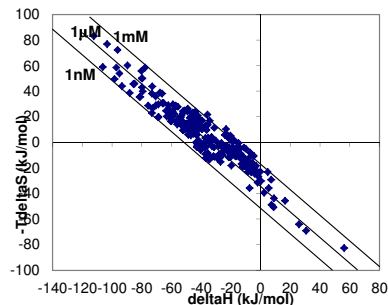
- ΔG , ΔH , ΔS szerkezeti elemekhez rendelése elvileg helytelen
 - additivitás problémája
- ΔG , ΔH , ΔS tényleges lépésekhez rendelhető - állapotfüggvények

2012.10.18

12

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



2012.10.18

13

Affinitás és molekula méret

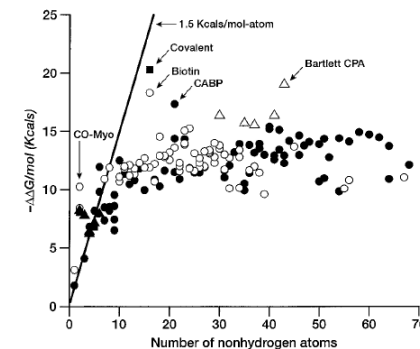
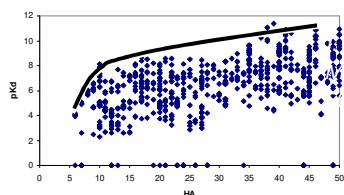


Fig. 1. Free energy of binding (in kcal/mol) for ligands and enzyme inhibitors plotted as a function of the number of nonhydrogen atoms in the ligand. See Table 1. A line with slope of 1.5 kcal/mol and an intercept of 0 is included as a visual aid to analysis. Δ , Metal ions or metalloenzymes; Δ , small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

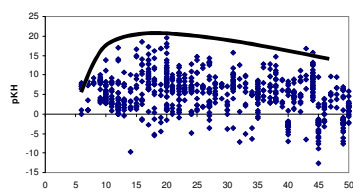
PNAS 1999, 96, 9997

14

Affinitás, entalpia és molekula méret



Vegyületek elérhető kötődési szabadentalpiája (aktivitása, pK_d) előbb meredeken nő, majd *kismértékben nő* a molekulamérettel (HA)



Vegyületek elérhető kötődési entalpiája ($pK_H = -\Delta H / 2.303RT$) előbb meredeken nő, majd *kismértékben csökken* a molekulamérettel (HA)

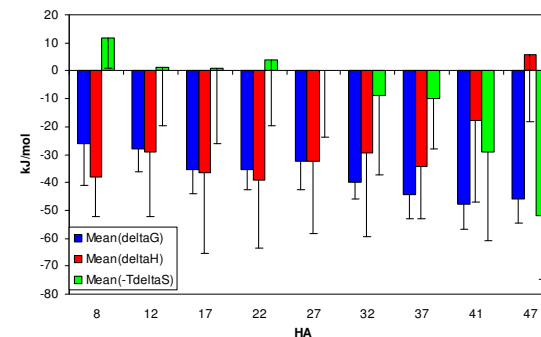
Az entalpia növelésének korlátja van
A molekulamérettel a korlát csökken

A molekulamérettel az affinitás és az entalpia korlátja ellentétesen változik

2012.10.18

15

Affinitás, entalpia, entrópia és molekula méret

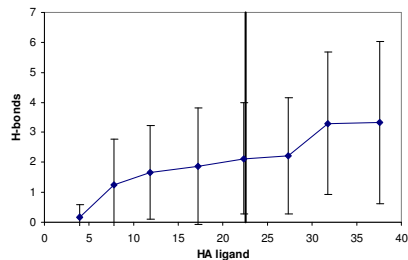


Nagyméretű molekula kötődésénél entrópia dominál

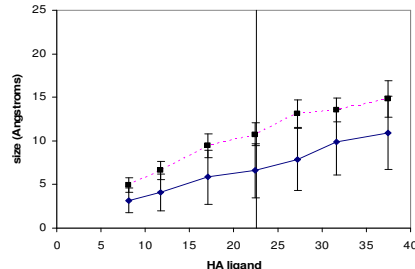
2012.10.18

16

H-kötés és molekula méret



Number of strong H-bonds in protein-ligand complexes as a function of the number of ligand heavy atoms. Vertical bars represent standard deviations. Vertical line indicates fragment limit.



H-bonding size (straight line) and ligand size (dotted line) in protein-ligand complexes as a function of the number of ligand heavy atoms. Vertical bars represent standard deviations. Vertical line indicates fragment limit.

~2 optimális („közeli”) H-kötés – ΔH – kis molekula méret függés

2012.10.18

17

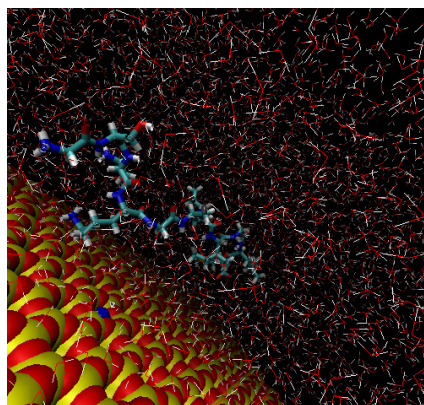
Termodinamika és molekula méret - összegzés

- ΔG – mérettel előbb gyorsan, majd lassan csökken (kedvező)
- ΔH – mérettel előbb gyorsan csökken (kedvező), majd lassan nő (kedvezőtlen)
- Mérettel entrópia szerepe növekszik, entalpiáé csökken
- A kötés entalpiikus komponense jellemzően néhány (~2) H-kötésre és térben kis részre összpontosul – „hot spot”

2012.10.18

18

Számítási módszerek



2012.10.18

19

Szabadenergia - Mintavétel

SZABADENERGIA SZÁMÍTÁS NEHÉZSÉGE

A szabadenergia képlete

$$A = -kT \ln \left[\int \int \exp(-E/kT) dp dr \right] \quad (1)$$

Elosztva $1 = \exp(-E/kT) \exp(E/kT)$ -gyel

$$A = -kT \ln \left[\frac{\int \int \exp(-E/kT) dp dr}{\int \int \exp(E/kT) \exp(-E/kT) dp dr} \right] \quad (2)$$

vagyis

$$A = +kT \ln \langle \exp(E/kT) \rangle \quad (3)$$

A nagy hozzájárulást adó tagok (nagy E) mintavételének valószínűsége alacsony;

A kis hozzájárulást adó tagok (E kicsi) mintavételének valószínűsége nagy

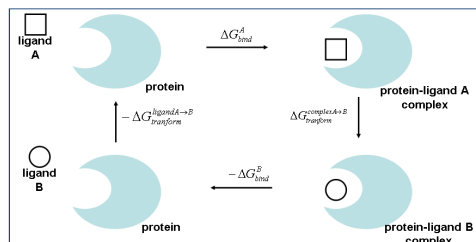
Szabadenergia számítása nehéz - túlbecsült

2012.10.18

20

Szabadenergia különbség

- Kísérlet különbséget mér
- Hogyan számíthatunk szabadenergia különbséget?
 - $\Delta G = G_B - G_A$ (A és B két állapot)
 - Fehérje-ligandum kötött és szabad állapotok nagyon különböznek!
 - Termodinamikai ciklus: hasonló ligandumok kötődésének különbsége - $\Delta\Delta G$

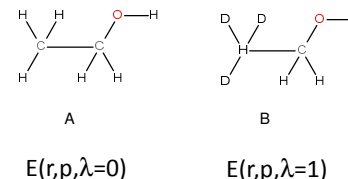


- $\Delta G(A)_{bind} - \Delta G(B)_{bind} = \Delta G(complex)_{tr} - \Delta G(ligand)_{tr}$
- „alkímiai” transzfomációk: $\Delta G(complex)_{tr}$ és $\Delta G(ligand)_{tr}$
 - 2 transzfomáció $\Delta\Delta G$ számításához

2012.10.18

21

Csatolási paraméter



Például:
 $m_\lambda = (1-\lambda) m_A + \lambda m_B$

Célszerű:
 $E_\lambda = E(r,p,\lambda) = (1-\lambda) E_A + \lambda E_B$

$$\Delta F = F_B - F_A = F(\lambda=1) - F(\lambda=0) = \int_{\lambda=0}^{\lambda=1} F'(\lambda) d\lambda = F' = \frac{d}{d\lambda} [-kT \ln Z(\lambda)] = \left\langle \frac{\partial E}{\partial \lambda} \right\rangle$$

Termodinamikai integrálás

2012.10.18

22

Termodinamikai integrálás

$$\Delta F = \int_{\lambda=0}^{\lambda=1} \left\langle \frac{\partial E}{\partial \lambda} \right\rangle_\lambda d\lambda$$

- Megvalósítás
 - Szimuláció különböző λ értékeknél
 - $\left\langle \frac{\partial E}{\partial \lambda} \right\rangle$ kiszámítása
 - Numerikus integrálás

2012.10.18

23

Szabadenergia perturbáció

A szabadenergia képlete

$$A = -kT \ln \left[\int \exp(-E/kT) dp dr \right] \quad (1)$$

Két rendszer szabadenergiájának különbsége pedig

$$A_1 - A_0 = -kT \ln \left[\frac{\int \exp(-E_1/kT) dp dr}{\int \exp(-E_0/kT) dp dr} \right] \quad (2)$$

Beírva $1 = \exp(-E_0/kT) \exp(E_0/kT)$ -t a számláló integráljába

$$A_1 - A_0 = -kT \ln \left[\frac{\int \exp(-E_0/kT) \exp(E_0/kT) \exp(-E_1/kT) dp dr}{\int \exp(-E_0/kT) dp dr} \right] \quad (3)$$

vagyis $\Delta E = E_1 - E_0$ helyettesítéssel

$$A_1 - A_0 = -kT \ln \left[\frac{\int \exp(-E_0/kT) \exp(-\Delta E/kT) dp dr}{\int \exp(-E_0/kT) dp dr} \right], \quad (4)$$

ahol az \ln mögött az $\exp(-\Delta E/kT)$ kifejezésnek a kiindulási állapot szerinti konfigurációs átlaga jelenik meg:

$$A_1 - A_0 = -kT \ln \langle \exp(-\Delta E/kT) \rangle > 0, \quad (5)$$

2012.10.18

24

Szabadenergia perturbáció

$$\Delta F = -kT \ln \left\langle \exp - \frac{E_B - E_A}{kT} \right\rangle_A$$

- A → B több szakaszra osztható (osztandó)
 - A két állapot konfigurációs tere átfedjen

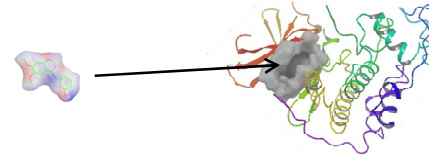
$$-A \xrightarrow{+++++} B \quad \Delta F = \sum_i -kT \ln \left\langle \exp - \frac{E(\lambda_{i+1}) - E(\lambda_i)}{kT} \right\rangle_{\lambda_i}$$

2012.10.18

25

Standard kötődési szabadentalpia számítás - 1

- LP ↔ L + P
- ΔG (nem ΔΔG) számítás
 - Ligandum tényleges kötődési folyamata



- λ reakciókoordináta mentén: „potential of mean force”
- TI vagy FEP

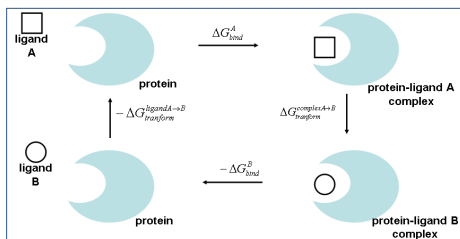
$$\Delta F = \sum_i -kT \ln \left\langle \exp - \frac{E(\lambda_{i+1}) - E(\lambda_i)}{kT} \right\rangle_{\lambda_i} \quad \Delta F = \int_{\lambda=0}^{\lambda=1} \left\langle \frac{\partial E}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda$$

2012.10.18

26

Standard kötődési szabadentalpia számítás - 2

- LP ↔ L + P
 - Kettős annihiláció; B nem hat kölcsön a környezetével



- TI vagy FEP

2012.10.18

27

Entalpia és entrópia számítása

- ΔF számítható hasonló rendszerek energiakülönbsége várhatóértékéből
- ΔH, TΔS a végállapotok energiája várható értékének különbségéből számítható
- ΔH, TΔS számítása több nagyságrenddel pontatlanabb, mint ΔF számítása

2012.10.18

28

Példa – FKBP12-ligandum

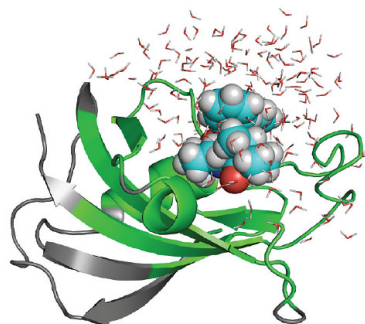


Figure 4. FKBP12 bound with ligand #8 studied previously.^{40,42} The gray parts are treated as a mean-field approximation with generalized solvent boundary potential.⁴⁰ See ref 42 for computational details.

$\Delta\Delta G_{\text{rep}}$	$\Delta\Delta G_{\text{dis}}$	$\Delta\Delta G_{\text{elec}}$	$\Delta\Delta G_{\text{c}}$	$\Delta\Delta G_{\text{i}}^{\circ}$	$\Delta\Delta G_{\text{f}}$	$\Delta G_{\text{bind}}^{\circ}$	exptl
-1.1	-21.1	-3.7	6.9	3.4	5.4	-10.2	-10.9

J. Phys. Chem. B 2009, 113, 2234

29

Példa – kötődés lizozimhez

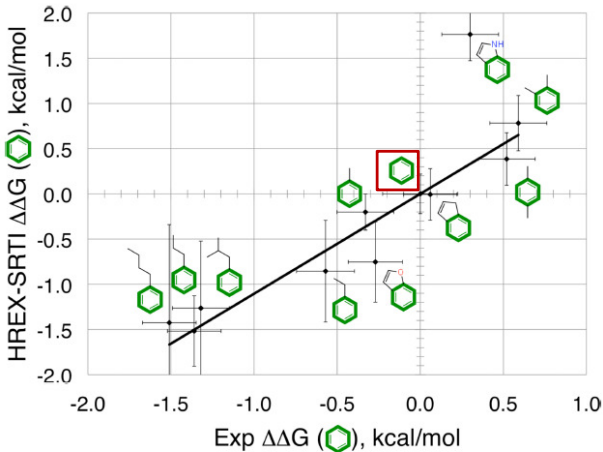


Figure 6. Comparison of the HREX-SRTI relative binding free energy predictions to experiment

J. Chem. Theor. Comput. 2011, 7 3001

30

Példa – neuraminidáz gátlók 1

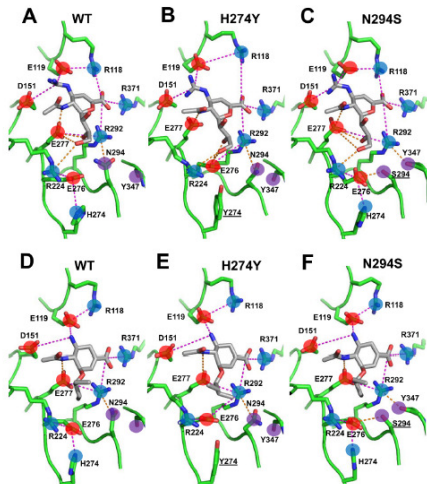


Figure 2. Representative structures for zanamivir (A, B and C) and oseltamivir (D, E and F) bound to WT and mutant NAs from the SIGMA-HREX simulations. Salt bridges and hydrogen bonds are depicted as magenta and orange dashed lines, respectively. Residues charged, negatively charged, and uncharged polar groups are noted as blue, red, and purple circles, respectively, and residues of interest are labeled. Mutated residues are underlined.
doi:10.1371/journal.pcbi.1002665.g002

31

Példa – neuraminidáz gátlók 2

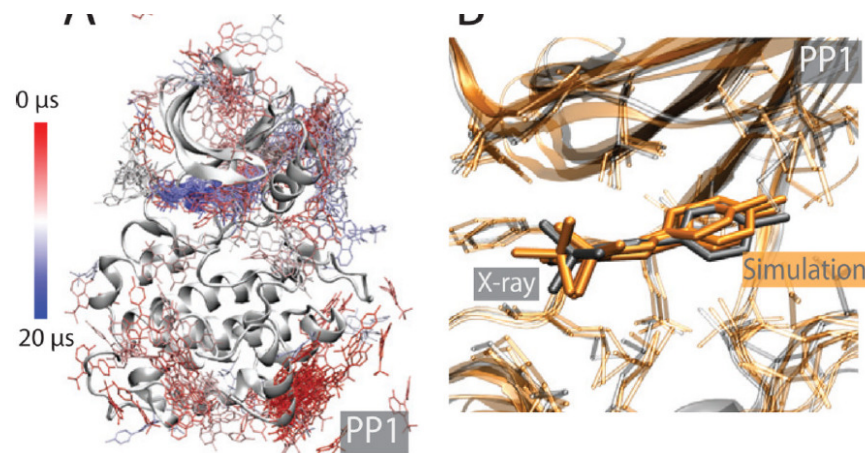
Table 1. Comparison of experimental $\Delta\Delta G$ in oseltamivir and zanamivir for three NA mutations with estimates obtained using different computational approaches.

Method	H274Y		N294S		Y252H		RMSE (RMSD), kcal/mol
	$\Delta\Delta G$, kcal/mol		$\Delta\Delta G$, kcal/mol		$\Delta\Delta G$, kcal/mol		
	zanamivir	oseltamivir	zanamivir	oseltamivir	zanamivir	oseltamivir	
Experimental ^a	0.4 (0.1)	3.3 (0.2)*	1.2 (0.1)*	2.6 (0.2)*	0.1 (0.2)	-1.4 (0.1)	N/A (0.2)
SBMM	-5.8 (7.4)	0.7 (7.0)	8.2 (7.3)	5.8 (8.2)	0.1 (8.7)	-0.3 (7.4)	4.2 (7.4)
SRSM	1.7 (2.9)	1.2 (3.0)	0.6 (2.0)	1.7 (1.9)	1.5 (1.7)	0.5 (1.5)	1.5 (2.2)
SRSM/HREX	1.3 (0.8)	4.1 (2.4)	2.3 (0.4)	2.2 (0.9)	0.6 (0.8)	0.7 (1.4)	1.1 (1.1)
MM-GLOSA	6.2 (8.1)	0.9 (3.0)	5.7 (6.1)	5.9 (3.0)	2.1 (2.9)	1.9 (3.0)	3.0 (3.0)
MM-PBSA	8.8 (9.0)	3.0 (3.9)	5.8 (4.3)	4.7 (5.2)	2.8 (3.1)	0.2 (2.8)	5.9 (4.6)
Rosetta	-0.4 (0.5)	0.8 (0.4)	-0.4 (0.3)	0.3 (0.2)	-0.3 (0.0)	0.0 (0.0)	1.7 (0.3)

^aValues were derived from the data reported by Collins et al [10]. Standard deviations are shown in parentheses. Root mean squared error (RMSE) and the RMS Standard Deviation (RMSD) are provided. *Indicates experimentally determined drug resistant mutation. 'N/A' stands for not applicable.
doi:10.1371/journal.pcbi.1002665.t001

32

Példa – ligandum kötés folyamata



PP1 molekula 15 μ s szimuláció alatt megtalálja a Src kináz kötőzsebét

Összefoglalás

- Fehérje-ligandum kölcsönhatás kvantitatív jellemzése – 1. rész
 - MD alapú módszerek - potenciálisan pontosak
 - Legfőbb nehézség: mintavétel
 - $\Delta\Delta G$ ($\Delta\Delta F$) számítása hatékonyabb
 - „Alkímiai” transzformációk
 - Termodinamikai integrálás
 - Szabadenergia perturbáció
 - Pontosság: ??