

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 - Ligandum-fehérje kötődés
 - kvantitatív jellemzése számítógépes modellezéssel
 - megértése
 - termodinamikája
 - (kinetikája)
 - befolyásolása
 - gyógyszertervezés

2013.11.28

2

Vázlat

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

2013.11.28

3

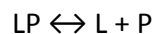
Ligandum-fehérje kötődés szerepe

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

2013.11.28

4

Néhány összefüggés



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

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

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

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

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

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

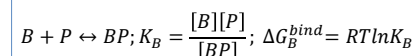
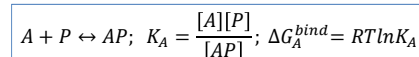
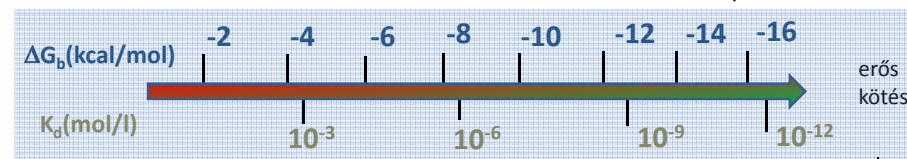
csak egyszerű rendszerekre számítható

2013.11.28

5

Szabadenergia – Egyensúlyi állandó

nem kovalens kötés tartománya



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

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

$$2.8 \text{ kcal/mol} \rightarrow \sim 100$$

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

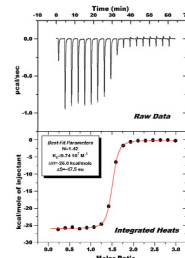
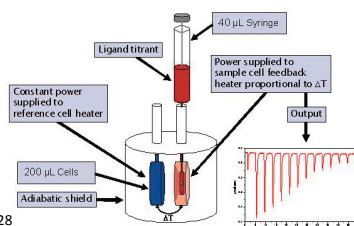
2013.11.28

6

Kötési termodinamika mérése

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

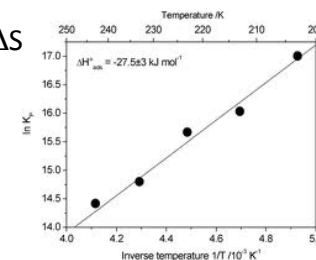
2013.11.28



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 ($\Delta S: 1/T=0$)



2013.11.28

8

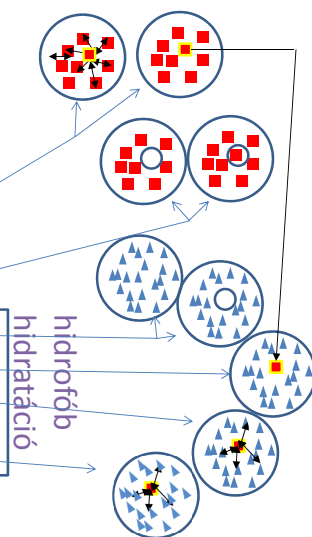
Hidrofób effektus

- Hidrofób effektus:

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

Analógia: 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

2013.11.28

9

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 növeléséért)

– Magyarázat: hidrofób hidratáció lépésire koncentrál

2013.11.28

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

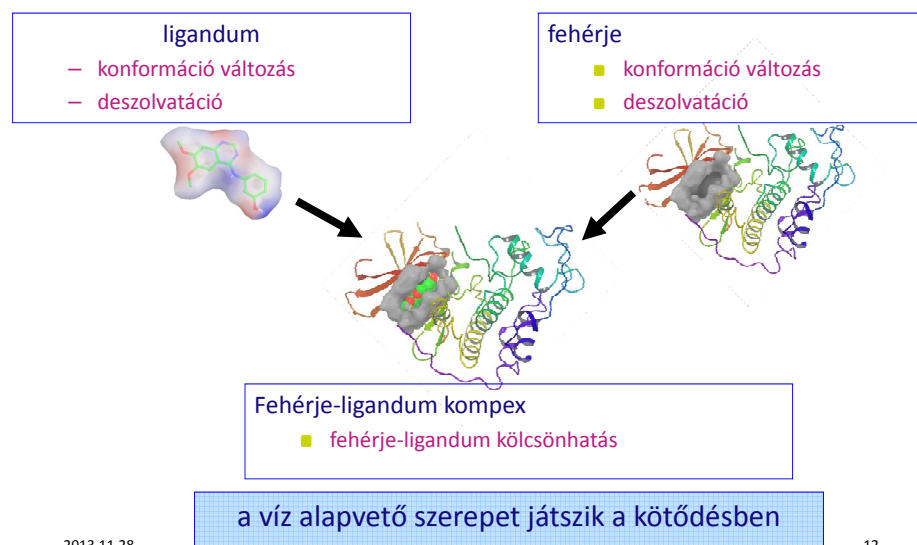
- Milyen mértékben felelősek a fentiek ΔH és $T\Delta S$ változásért?

- Nincsen általános érvényű kvantitatív modell!

2013.11.28

11

Fehérje-ligandum kötődés „lépései”



2013.11.28

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

2013.11.28

13

Kötődés kvalitatív termodinamikája

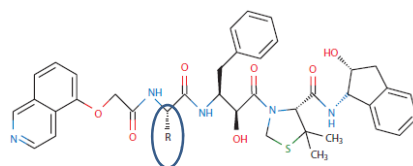
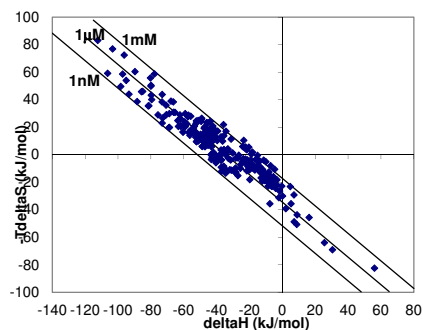
- ΔG , ΔH , ΔS szerkezeti elemekhez rendelése elvileg helytelen
 - additivitás problémája
 - ΔH additivitás jó közelítés
 - ΔS additivitása rossz közelítés
- ΔG , ΔH , ΔS tényleges lépésekhez rendelhető - állapotfüggvények

2013.11.28

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

2013.11.28

15

Affinitás és molekula méret

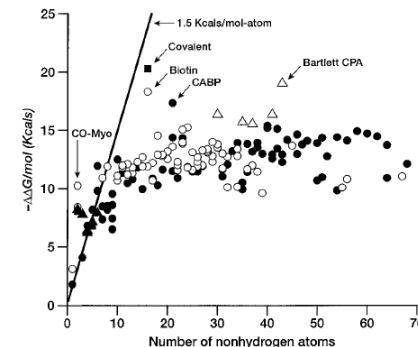


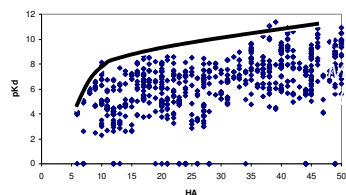
FIG. 1. Free energy of binding (in kcal/mol) for ligands and enzyme inhibitors plotted as a function of the number of nonhydrogen atoms in the ligand. See Table 1. A line with slope of 1.5 kcal/mol and an intercept of 0 is included as a visual aid to analysis. Δ , Metal ions or metalloenzymes; \blacktriangle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

PNAS 1999, 96, 9997

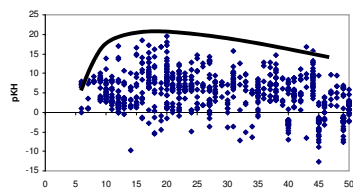
2013.11.28

16

Affinitás, entalpia és molekula méret



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



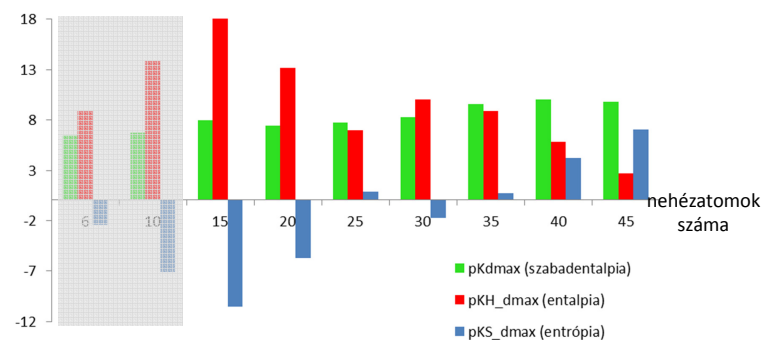
Vegyületek elérhető kötődési entalpiája ($pK_H = -\Delta H/2.303RT$) előbb meredeken nő, majd *kismértékben csökken* a molekulamérettel (HA)

Az entalpia növelésének korlátja van
A molekulamérettel a korlát csökken
A molekulamérettel az affinitás és az entalpia korlátja ellentétesen változik

2013.11.28

17

Affinitás, entalpia, entrópia és molekula méret



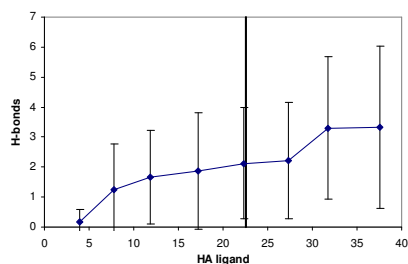
$$pK_d = -\log K_d = pK_H + pK_S \quad pK_H = \frac{-\Delta H}{2,303 \cdot RT} \quad pK_S = \frac{\Delta S}{2,303 \cdot R}$$

Nagyméretű molekula kötődésénél entrópia dominál

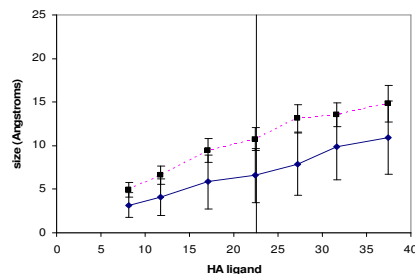
2013.11.28

18

H-kötés és molekula méret



Erős H-kötések száma fehérje-ligandum komplexekben a ligandum nehézatomszám függvényében. Függőleges szakaszok jelölik a standard deviációt. A függőleges vonal a fragmens határhoz tartozik.



H-kötés méret (folytonos vonal) és ligandum méret (pontozott vonal) fehérje-ligandum komplexekben a ligandum nehézatomszám függvényében. Függőleges szakaszok jelölik a standard deviációt. A függőleges vonal a fragmens határhoz tartozik.

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

2013.11.28

19

Gyógyszerkutatási következmények

- Gyógyszerjelölt vegyületek affinitás növelése általában a molekula méretének növekedésével jár
 - új kémiai csoportok bevitel miatt
- Nagyobb molekulánál az affinitás növekedése döntően az apoláris deszolvatáció növekvő hozzájárulásának a következménye
- Így az affinitás (=kötődési szabadentalpia) javulása
 - a molekula apolaritásának irányába hat
 - entrópius eredetű
- Az apolaritás kedvezőtlen tulajdonságok forrása:
 - promiszkuitás (mellékhatások), metabolizmus, ...
- Az affinitás növelésénél a fentiek figyelembe veendőek:
 - Kiegyensúlyozott affinitás vs. molekulaméret és apolaritás

2013.11.28

20

Termodinamika és molekula méret - összegzés

- ΔG_{\max} – mérettel előbb gyorsan, majd lassan csökken (kedvező)
- ΔH_{\max} – mérettel előbb gyorsan csökken (kedvező), majd lassan nő (kedvezőtlen)
- Mérettel entrópia szerepe növekszik, entalpiáé csökken
- A kötés entalpikus komponense jellemzően néhány (~2) H-kötésre és térben kis részre összpontosul – „hot spot”
- Gyógyszerkutatásban a molekula affinitása, valamint mérete és apolaritása kiegyensúlyozott optimálást igényel