

# Fehérje-ligandum kötődés számítógépes modellezése II. Termodinamikai mennyiségek becslése közelítő módszerekkel

Ferenczy György

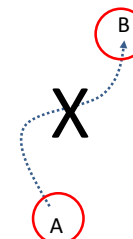
Semmelweis Egyetem  
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

ferenczy.gyorgy@med.semmelweis-univ.hu

2014.12.11

## Vázlat

- Kötődési szabadentalpia számítása „végpont” módszerekkel
  - Lineáris kölcsönhatási energia módszer; LIE (Linear Interaction Energy)
  - MM-PBSA (Molecular Mechanics Poisson – Boltzmann Surface Area)
  - Dokkolás-pontozás pontozófüggvénnyel (docking-scoring)



2014.12.11

2

## LIE

### Lineáris Kölcsönhatási Energia Módszere

2014.12.11

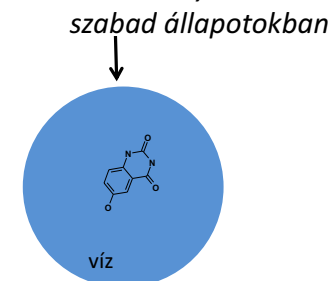
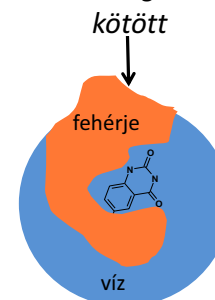
3

## LIE

$$\Delta G = \alpha(\langle E_{cmplx}^{vdw} \rangle - \langle E_{solv}^{vdw} \rangle) + \beta(\langle E_{cmplx}^{el} \rangle - \langle E_{solv}^{el} \rangle) + X$$

$$(\langle E_{cmplx} \rangle - \langle E_{solv} \rangle)$$

Kölcsönhatási energia különbség a ligandum és a környezete között



külön skálázva a van der Waals és az elektrosztatikus komponest

# LIE

$$\Delta G = \alpha(\langle E_{cplx}^{vdw} \rangle - \langle E_{solv}^{vdw} \rangle) + \beta(\langle E_{cplx}^{el} \rangle - \langle E_{solv}^{el} \rangle) + X$$

- $\langle E \rangle$  energia várható érték – molekuladinamika (esetleg energia minimálás)  
várható értékek különbsége! (v.ö. TI, FEP)
- $\alpha$  illesztendő paraméter
- $\beta$  ½ - elektrosztatikus lineáris válasz közelítés  
vagy illesztendő paraméter
- $X$  különböző közelítések:
  - 0 – eredeti
  - $X = \gamma(\langle E_{cplx}^{cav} \rangle - \langle E_{solv}^{cav} \rangle)$  – felület nagysága
- Lineáris válasz:  $\Delta G = 1/2 E^{el}$
- QSAR típusú egyenlet

2014.12.11

5

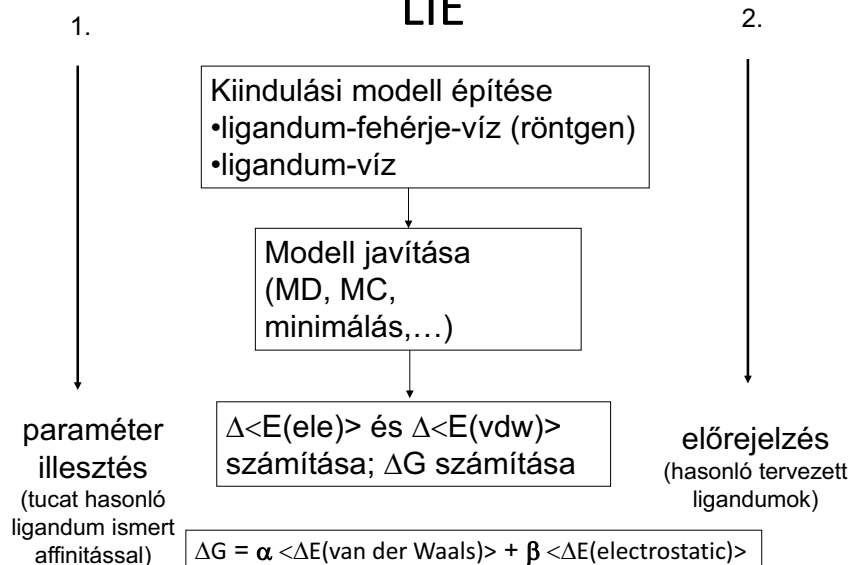
# LIE

- Alkalmazás feltételei:
  - A kötémód (közelítőleg) ismert
  - Néhány (~10) ligandum kötési állandója ismert –  
paraméter illesztés
  - Ligandumok hasonlóak (v.ö. FEP, TI)

2014.12.11

6

# LIE

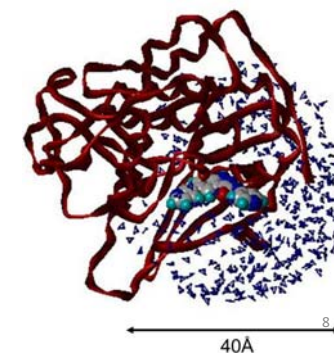


2014.12.11

7

# LIE

- Számítás néhány paramétere:
  - Explicit ↔ implicit víz
  - MM erőter (töltések)
  - Minimálás, dinamika
    - egyensúly, mintavétel (30ps, 50ps)



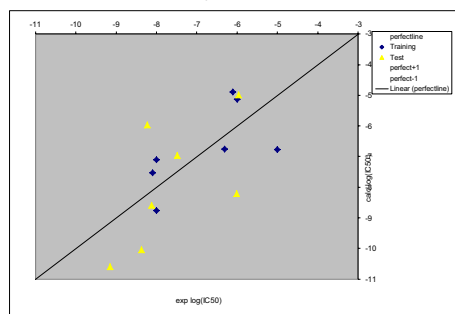
2014.12.11

8

# LIE

CDK2 ligandumok (AM1 töltés)

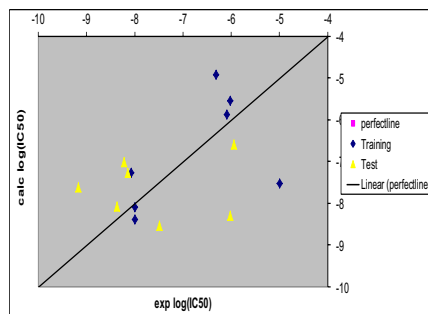
OPLS explicit víz, dinamika



$\Delta G = 0.30E(\text{ele}) + 0.56 E(\text{vdw})$   
 RMS(logIC50)=1.02 (training)  
 RMS=(logIC50)1.52 (test)  
 RMS=(logIC50)1.30 (total)

2014.12.11

OPLS\_AA implicit (GB) víz, minimálás



$\Delta G = 0.19E(\text{ele}) + 0.24 E(\text{vdw})$   
 RMS(logIC50)=1.16 (training)  
 RMS=(logIC50)=1.28 (test)  
 RMS=(logIC50)=1.22 (total)

9

# MM-PBSA

## Molecular Mechanics – Poisson-Boltzmann Surface Area

2014.12.11

10

# MM-PBSA

- MM-PBSA: Molecular Mechanics – Poisson-Boltzmann Surface Area
- $\Delta G = G_{\text{komplex}} - G_{\text{ligandum}} - G_{\text{fehérje}}$
- Abszolúte kötődési szabadentalpia!
- $G = E_{\text{MM}} + G_{\text{PB}} + G_{\text{SA}} - TS_{\text{MM}}$ 
  - $E_{\text{MM}}$ : MM energia (minimálás vagy szimuláció) oldószer nélkül
  - $G_{\text{PB}}$ : poláris szolvatációs szabadentalpia Poisson-Boltzmann egyenletből
  - $G_{\text{SA}}$ : nem poláris szolvatációs szabadentalpia molekulafelszínből
  - $S_{\text{MM}}$ : oldott molekula entrópiája normál mód (vagy kvázi-harmonikus) analízisből

2014.12.11

11

# MM-PBSA

$$G = E_{\text{MM}} + G_{\text{PB}} + G_{\text{SA}} - TS_{\text{MM}}$$

## – Számítás 2 lépésben

- Szerkezetek generálása
  - rövid molekula dinamikai szimuláció
    - » Külön dinamika fehérje-ligandum komplexre, fehérjére és ligandumra
    - » dinamika komplexre és abból kivett fehérje és ligandum
      - egyetlen trajektória
      - kötött és szabad molekula azonos geometriával közelítve
  - dinamika alternatívája: minimálás
  - explicit/implicit víz
- Energiatagok ( $E_{\text{MM}}$ ,  $G_{\text{PB}}$ ,  $G_{\text{SA}}$ ,  $TS_{\text{MM}}$ ) számítása a víz eltávolításával kapott szerkezetekre

2014.12.11

12

## MM-PBSA

$$G = E_{MM} + G_{PB} + G_{SA} - TS_{MM}$$

- $E_{MM} = E_{\text{kötés}} + E_{\text{szög}} + E_{\text{torz}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{elek}}$

– Egyetlen trajektória

- előnye:

- intramolekuláris  $E_{MM}$  kioltás, numerikus hiba csökken
- Kevesebb számítás

- hátránya:

- Mintavételi hiba lehetősége

2014.12.11

13

## MM-PBSA

$$G = E_{MM} + G_{PB} + G_{SA} - TS_{MM}$$

- Poisson-Boltzmann egyenlet

- Poisson: összefüggés a töltéssűrűség és az elektrosztatikus potenciál között
- Boltzmann: összefüggés az ionkoncentráció (töltéssűrűség) és az elektrosztatikus potenciál között

– Poláris molekula ionokat tartalmazó vízben (oldószerben)

– Oldószer kontinuum – dielektromos állandó

– Numerikus megoldás:

- Elektrosztatikus potenciál rácsponatokban
- Oldódást kísérő energiaváltozás (elektrosztatika)

- Alternatíva: Általánosított Born (GB) modell (MM-GBSA)

- PB közelítése
- Kevesebb számítás

2014.12.11

14

## MM-PBSA

$$G = E_{MM} + G_{PB} + G_{SA} - TS_{MM}$$

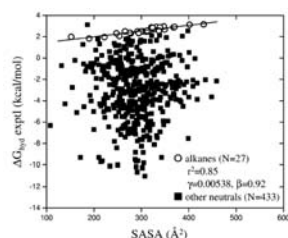
- $G_{SA}$

–  $G_{SA} = \gamma SA + \beta$

- $\gamma$ ,  $\beta$  állandók

- SA (surface area): oldószer által hozzáférhető felszín nagysága

- Hidrofób hidratáció



JCTC 2006 2 128

Figure 2. Experimental free energies of hydration vs total molecular solvent-accessible surface area (SASA). The best fit line to the 27 linear and branched alkanes (○) yields a correlation coefficient  $R^2 = 0.85$ ,  $\gamma = 0.00538$ , and  $\beta = 0.92$ . Other compounds are represented as filled squares (■).

2014.12.11

15

## MM-PBSA

$$G = E_{MM} + G_{PB} + G_{SA} - TS_{MM}$$

- $S_{MM}$

– Molekula rezgések hozzájárulnak a szabadenergiához

– Kis frekvenciájú rezgések entrópia hozzájárulása lényeges  $\Delta G$  számításához

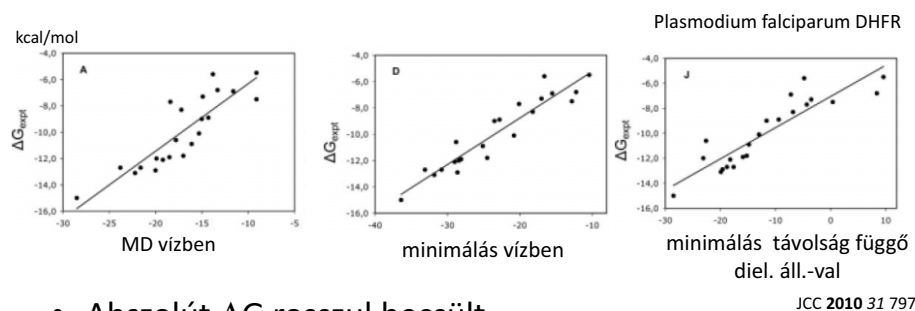
– Normál mód analízis

- Energia minimált szerkezet
- Erőállandó mátrix diagonalizálása
- Számításigényes – néhány „snapshot”-ra
- Hiányosságok
  - anharmonicitás
  - oldószerhatás

2014.12.11

16

## MM-PBSA

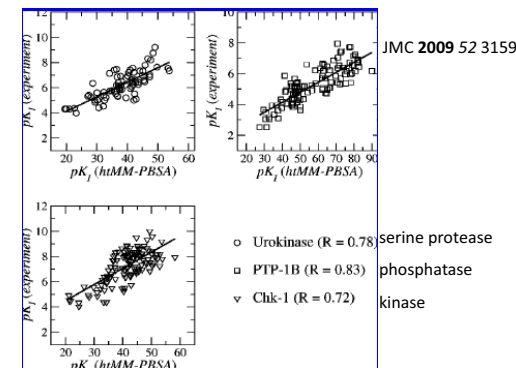


- Abszolút  $\Delta G$  rosszul becsült
- $\Delta G_{\text{exp}}$  és  $\Delta G_{\text{calc}}$  korrelál
- Mintavételtől kevésbé függ (?)

2014.12.11

17

## MM-PBSA



- Abszolút  $\Delta G$  rosszul becsült
- $\Delta G_{\text{exp}}$  és  $\Delta G_{\text{calc}}$  korrelál
- Regressziós paraméterek fehérjétől függenek

2014.12.11

18

## Pontozófüggvény és dokkolás

- Fehérje-ligandum komplex kötődési szabadentalpiájának *erősen közelítő* becslése
- Szabadentalpia vs. pontozás (scoring)
- Nagyon gyors – másodperc/ligandum
- Általában egyetlen konfiguráció leírása
- Dokkolással párosítva
  - Komplex szerkezetek generálása - minimális előzetes szerkezeti információból!

2014.12.11

19

2014.12.11

20

## Pontozó függvény

- Típusai
  - Erőtér alapú
    - Molekula-mechanikai erőter
  - Tapasztalati (empirical)
    - Lokalizált kölcsönhatások összege
  - Tudásalapú
    - Adatbázisok elemzésére épül
  - Vegyes
    - Előzőek kombinációja

2014.12.11

21

## Erőtér alapú pontozófüggvény

- Gáz-fázisú energia számítás  
( $\leftrightarrow$  oldatbeli szabadenergia)
- Fehérje tere előre kiszámítható egy térháló pontjain  
→ számítási sebesség növekszik
- Lehetővé tesz szerkezet optimalizálást
- Kiegészíthető
  - oldószer hatás
  - entrópia (?)

2014.12.11

22

## Tapasztalati pontozófüggvények

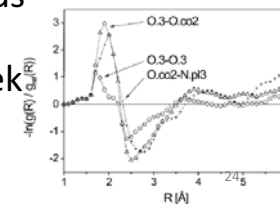
- Kölcsönhatási tagok intuitív válogatása
  - Hidrogén-kötés
    - Típus szerint súlyozott összeg
  - Ionos kölcsönhatás
  - Hidrofób kölcsönhatás
    - Arányos az érintkező felszín nagyságával
- Kísérleti affinitásokhoz illesztett paraméterek
- Csak a modellben szereplő tagokat „látja”
- Lokális kölcsönhatások

2014.12.11

23

## Tudásalapú pontozófüggvények

- Komplexek kísérleti adatainak statisztikai analíziséből
  - $E_i = -kT \ln(p_i)$  – energia tag  $\sim$  előfordulás valószínűsége
- Protein Data Bank: 95999 szerkezet 2013. december 3-án
- Kötődési adat nem szükséges
- Nagy távolságú mintavétel – oldószer hatás is
- Kis távolságú mintavétel – specifikus kölcsönhatások hangsúlyozása
- Taszító kölcsönhatások nem teljese



2014.12.11

## Dokkolás - pontozás

- Ligandum-fehérje komplex szerkezetek generálása és rangsorolása
  - Egyetlen ligandum-fehérje pár esetén
    - kötési mód meghatározása
  - Több ligandum és egyetlen fehérje esetén
    - Virtuális szűrés
      - kötési módok meghatározása
      - Ligandumok pontozás (affinitás/kötődési szabadentalpia) szerinti rangsorolása
- Komplexre vonatkozó előzetes szerkezeti információ nélkül (elvileg)
- Gyógyszerkutatási alkalmazásokat lásd később

2014.12.11

25

## Dokkolás-pontozás közelítései

Néhány fontosabb:

- Fehérje flexibilitás
- Protonáltsági fok
- Vízszerkezet
- Kötést közvetítő vízmolekulák
- Entrópia
- Hőmérséklet
- ...

2014.12.11

26

## Fehérje flexibilitás – dokkolás-pontozás

- Fehérje flexibilitás szerepe a ligandum kötődéskor
  - Kötéshez kedvező fehérje konformáció kiválasztása
    - Populáltság eltolódás
  - Indukált illeszkedés
    - Korábban jelen nem lévő fehérje konformációhoz való kötődés
  - Nincsen éles határ a fenti két mechanizmus között

2014.12.11

27

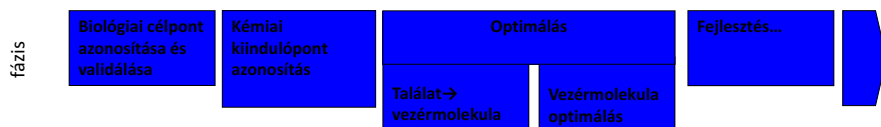
## Fehérje flexibilitás – dokkolás-pontozás

- Dokkolás fehérje flexibilitás figyelembe vételével
  - Több statikus fehérje szerkezet használata
    - Kísérleti szerkezetek – komplexek különböző ligandumokkal, NMR
    - Számítással (MD, MC) generált szerkezetek
    - Több számítást igényel
  - „Puha” („soft”) fehérje szerkezet
    - több szerkezetből egy átlagos, tompított kölcsönhatásokat tartalmazó szerkezet
      - Nagy mozgások nem tud leírni
      - Megnövekedett kötőzseb
      - Egymást kizáró kötőhelyek egyszerre
  - Fehérje konformáció dokkoláskor alakul (pl. MD)

2014.12.11

28

## Dokkolás-pontozás alkalmazásai

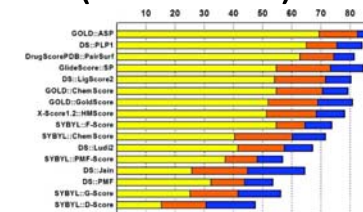


- Virtuális szűrés
  - Kémiai kiindulópont azonosítása fázis
- Dokkolás - Kötődési mód meghatározás
  - Találat → vezérmolekula fázis

2014.12.11

29

## Kötésmód meghatározás (Dokkolás)



rmsd < 1.0 Å (yellow bars),  
< 2.0 Å (orange bars),  
< 3.0 Å (blue bars)  
J. Chem. Inf. Model. 2009, 49, 1079–1093

- Fehérje szerkezet
  - röntgen kristallográfia
  - homológia modell
- Ligandum szerkezet
  - Modell
- Komplex szerkezet
  - Ligandumnak a fehérje kötőzsebébe illesztése - dokkolás
  - Ligandum különböző pozícióinak rangsorolása pontozófüggvénnyel
    - Korlátozott fehérje flexibilitás
    - Ligandum konformációs terének hatékony feltérképezése
- Dokkolt ligandum szerkezet RMSD < 2Å – esetek 70-80%-a kedvező esetben

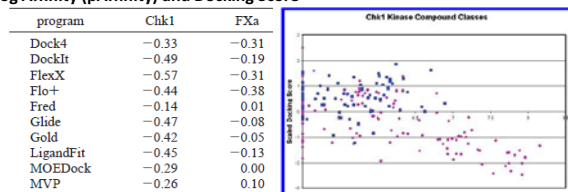
2014.12.11

30

## Rangsorolás

- Molekulák dokkolása és pontozófüggvény szerinti rangsorolása
- Gyakran hasonló szerkezetű, tervezett molekulákat vizsgálunk – vezérmolekula optimálás
- Gyenge korreláció a pontozófüggvény és a kísérleti affinitás között
- **A pontozófüggvény szerinti rangsor gyengén korrelál a kísérleti affinitás szerinti rangsorral**

Best Correlation Coefficient  $r$  between the  
-log Affinity (pAffinity) and Docking Score



2014.12.11

J. Med. Chem. 2006, 49, 5912

Correlation Between the Scores and  
Experimental Binding Affinities

method	Pearson R	Spearman $\rho$
code 1	0.76 (0.80–0.71)	0.74 (0.79–0.68)
code 2	0.72 (0.77–0.66)	0.73 (0.78–0.67)
code 3	0.67 (0.72–0.60)	0.68 (0.74–0.61)
code 4	0.64 (0.70–0.58)	0.64 (0.70–0.56)
code 5	0.63 (0.69–0.56)	0.64 (0.71–0.57)
code 6	0.62 (0.68–0.55)	0.61 (0.68–0.53)
code 7	0.62 (0.68–0.55)	0.61 (0.68–0.53)
code 8	0.61 (0.67–0.54)	0.59 (0.66–0.51)
code 9	0.61 (0.67–0.53)	0.60 (0.67–0.52)
code 10	0.60 (0.66–0.52)	0.60 (0.67–0.52)
code 11	0.59 (0.66–0.52)	0.57 (0.64–0.49)
code 12	0.57 (0.63–0.49)	0.57 (0.65–0.49)
code 13	0.56 (0.63–0.48)	0.60 (0.67–0.52)
code 14	0.56 (0.63–0.48)	0.54 (0.62–0.45)
code 15	0.56 (0.63–0.48)	0.56 (0.63–0.47)
code 16	0.53 (0.60–0.45)	0.53 (0.61–0.44)
code 17	0.35 (0.44–0.25)	0.37 (0.46–0.27)

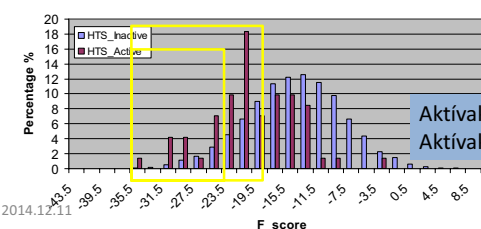
J. Chem. Inf. Model. 2011, 51, 2115

31

## Virtuális szűrés

- Kémiai kiindulópont azonosítás
- Számítás menete:
  - Nagy számú, szerkezetileg szerteágazó, létező molekula dokkolása
  - Kapott komplexek pontozása

- „Legjobb” kísérleti tesztelése



Aktív és inaktív részleges elválasztása  
Aktív feldúsulnak az alacsony pontúak között

2014.12.11

32



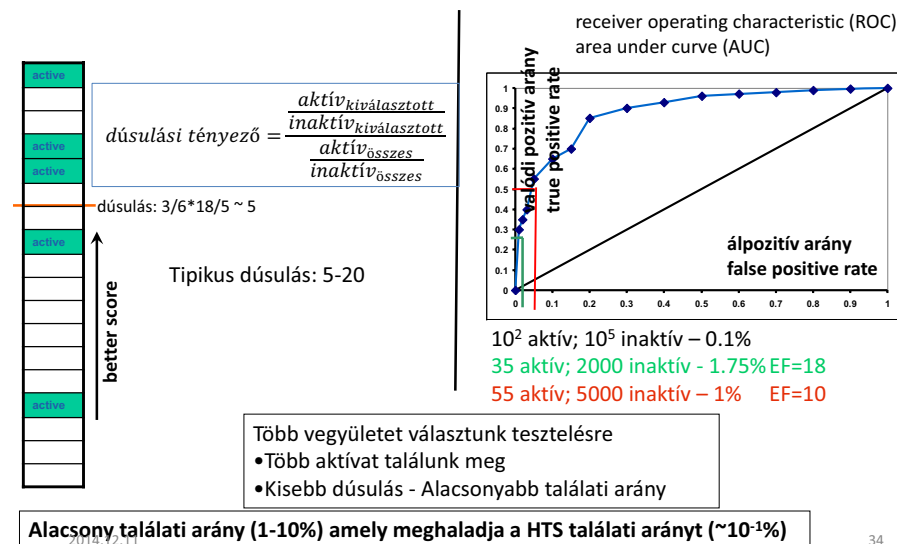
## Kémiai kiindulópont azonosítás és virtuális szűrés

- Nagy áteresztőképességű szűrés (HTS) - kísérleti
  - Adott célponton (gyenge) hatást mutató vegyületek megtalálása
  - Biokémiai/biofizikai módszerek
    - receptor kötődés
    - enzim gátlás
    - ...
  - $10^5$ - $10^6$  vegyület kísérletes tesztelése
  - Találatok száma:  $\sim 10^2$
  - találati arány: 0.1% ( $10^2/10^5$ )
- Virtuális szűrés
  - Cél a HTS találati arány javítása a vegyületek előszűrésével
  - $\sim 10^6$  molekula dokkolása és pontozása
  - Legjobb  $\sim 10^3$  molekula kísérleti tesztelése; tipikus találati arány néhány %

2014.12.11

33

## Virtuális szűrés hatékonysága



34

## Összefoglalás

- Végpont módszerek - Közelítő eljárások  $\Delta G$  becslésére
  - LIE
    - gyors
    - korlátozott pontosság
  - MM-PBSA
    - gyors (kevésbé)
    - esetenként jó korreláció kísérleti értékekkel
    - virtuális szűrés eredményének finomítására is alkalmazható
  - Dokkolás - Pontozás
    - Nagyon gyors
    - Kötésmód jó előrejelzése
    - Pont és kísérleti affinitás között gyenge korreláció
    - Virtuális szűrés előnyösen támogatja a kísérleti szűrést
    - Széleskörű gyógyszerkutatói alkalmazás

2014.12.11

35