

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

2

Vázlat

- Alapok
- Számítás-mérés
- Víz szerepe
- Ligandum-fehérje kötés „lépései”
- Termodinamikai mennyiségek és ligandum méret

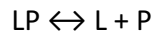
3

Ligandum-fehérje kötődés szerepe

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

4

Néhány összefüggés



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

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

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

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

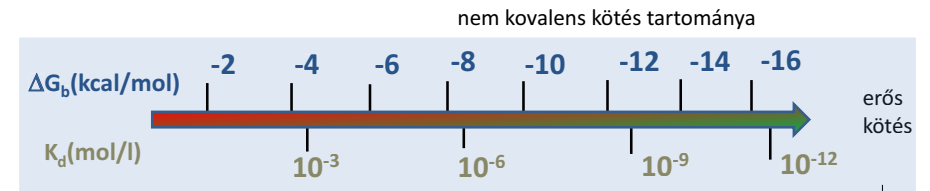
$$F = -k_B T \ln Z,$$

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

csak egyszerű rendszerekre számítható

5

Szabadenergia – Egyensúlyi állandó



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

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

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

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

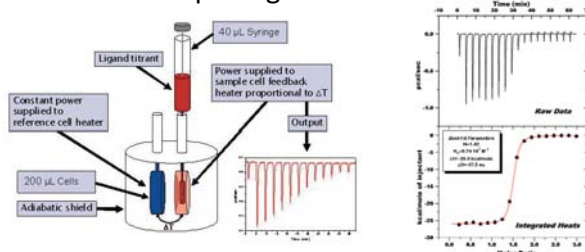
$$2.8 \text{ kcal/mol} \rightarrow \frac{[B]}{[BP]} / \frac{[A]}{[AP]} \sim 100$$

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

6

Kötési termodinamika mérése

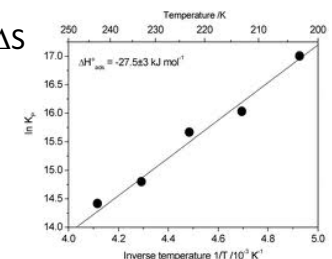
- Izotermális titráló kalorimetria
 - n , K_d , ΔH $\rightarrow \Delta G$, ΔS
 - korlátok:
 - oldatban
 - fehérje mennyiség (10-100 μg)
 - áteresztőképesség



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

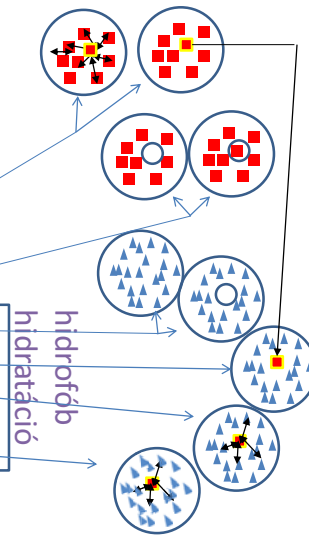
Hidrofób effektus

- Hidrofób effektus:

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

Analógia: 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 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 koncentrálnál

10

Hidrofób hidratáció

- Kulcstényezők az entrópia csökkenéshez:

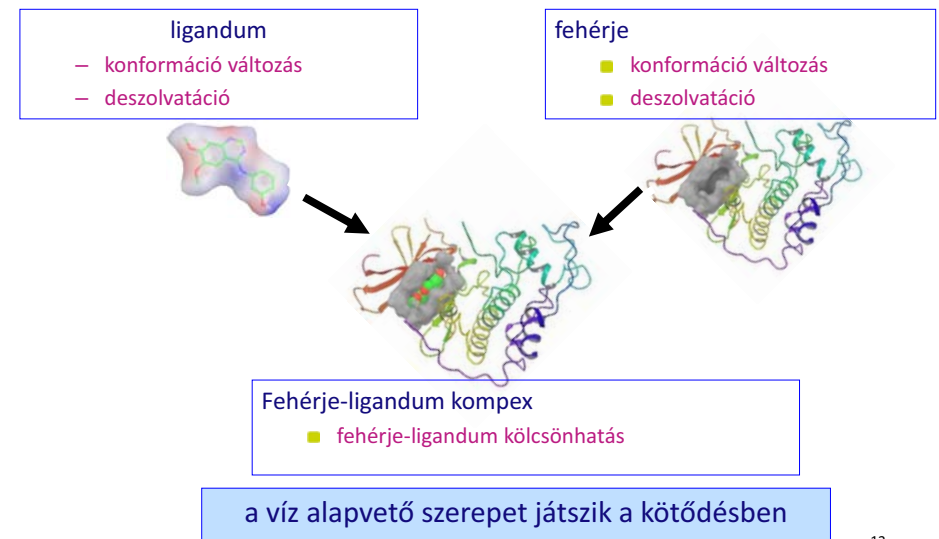
- Víz molekula kis mérete - üreg képződés
- H-híd kötés az oldott molekulák közelében
 - Erősebb és több H-híd – jéghegy modell
 - ⇕
 - Erősebb, de kevesebb H-híd – „two-state” modell

- 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

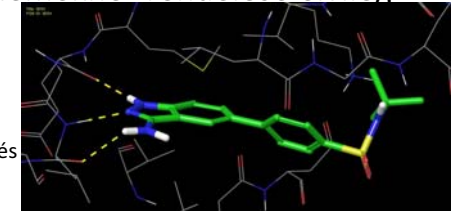
13

Kötődés kvalitatív termodinamikája

- ΔG , ΔH , ΔS szerkezeti elemekhez rendelése elvileg problémás

– Additivitás korlátozott

- ΔH additivitás jó közelítés
- ΔS additivitása rossz közelítés

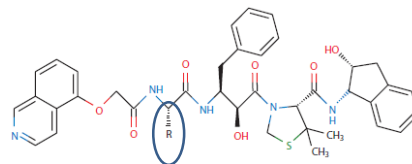
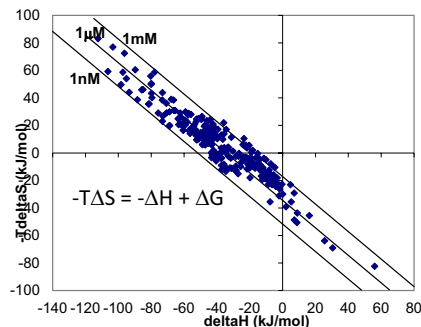


- ΔG , ΔH , ΔS tényleges lépésekhez rendelhető - állapotfüggvények

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

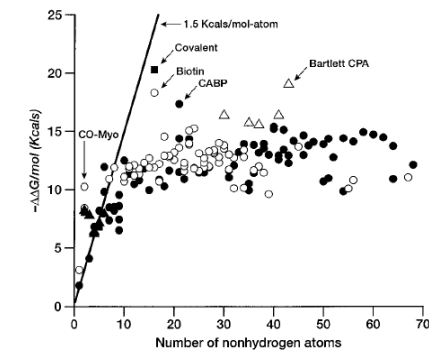
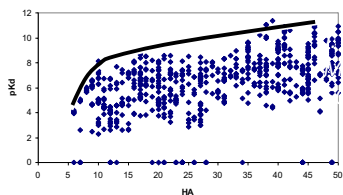


FIG. 1. Free energy of binding (in kcal/mol) for ligands and enzyme inhibitors plotted as a function of the number of nonhydrogen atoms in the ligand. See Table 1. A line with slope of 1.5 kcal/mol and an intercept of 0 is included as a visual aid to analysis. Δ , Metal ions or metalloenzymes; \blacktriangle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

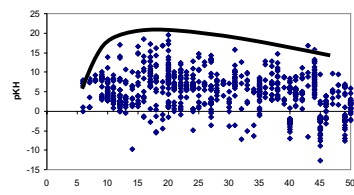
PNAS 1999, 96, 9997

16

Affinitás, entalpia és molekula méret



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

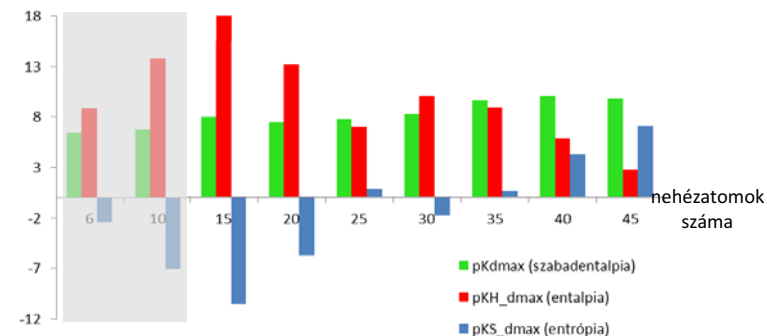


Vegyületek elérhető kötődési entalpiája ($pK_H = -\Delta H / 2.303RT$) előbb meredeken nő, majd *kismértékben csökken* a molekulamérettel (HA)

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

17

Affinitás, entalpia, entrópia és molekula méret

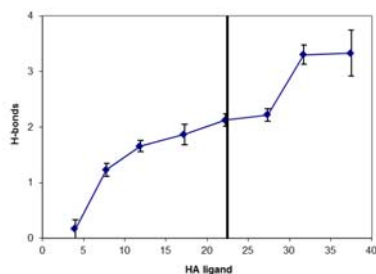


$$pK_d = -\log K_d = pK_H + pK_S \quad pK_H = \frac{-\Delta H}{2,303 \cdot RT} \quad pK_S = \frac{\Delta S}{2,303 \cdot R}$$

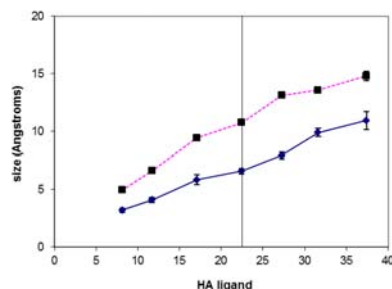
Nagyméretű molekula kötődésénél entrópia dominál

18

H-kötés és molekula méret



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

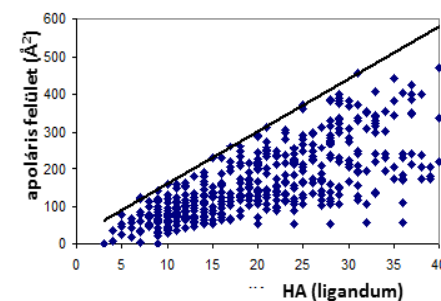


H-kötés méret (pontosított vonal) és ligandum méret (pontosított vonal) fehérje-ligandum komplexekben a ligandum nehézatomszám függvényében. Függőleges szakaszok jelölik a standard hibát. A függőleges vonal a fragmens határhoz tartozik.

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

19

Apoláris felszín és molekula méret



- Molekulák méretével az elérhető apoláris felszín lineárisan növekszik
- A ligandum-fehérje kötődéskor a vízből kikerülő apoláris felszín nagyságával arányos az entrópiás eredetű szabadentalpia nyereség – apoláris deszolvatáció

20

Gyógyszerkutatási következmények

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

21

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
 - Mérettel entrópia szerepe növekszik, entalpiáé csökken
- Gyógyszerkutatásban a molekula affinitása, valamint mérete és apolaritása kiegyensúlyozott optimalást igényel

22