

# Fehérje-ligandum kötődés számítógépes modellezése I. Termodinamikai mennyiségek számítása

Ferenczy György

Semmelweis Egyetem  
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

ferenczy.gyorgy@med.semmelweis-univ.hu

## Tartalom

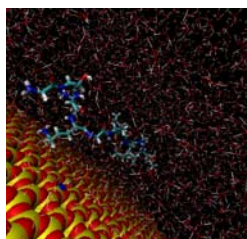
- Molekuladinamika
- Mintavétel molekuladinamikában
- Termodinamikai mennyiségek számítása az „átalakulási úton”
  - Szabadenergia számítási technikák:
    - Termodinamikai integrálás
    - Szabadenergia perturbáció
    - Átlagos erő potenciálja
    - Nem egyensúlyi munka
  - Standard szabadenergia
  - Entalpia és entrópia
  - Példák



2

## Molekuladinamika (MD)

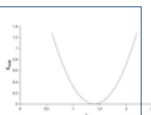
- Kapcsolat mikroszkopikus és makroszkopikus mennyiségek között
  - atomok mozgását szimuláljuk
  - mintát veszünk
  - nyomás, hőmérséklet, szabadenergia,... számítható



- Klasszikus molekula dinamika:

- atomok közötti potenciál  $E_{MM} = E_{kötés} + E_{szög} + E_{torz} + E_{vdw} + E_{elek}$
- atomok sebességei

- Newton mozgásegyenletei:  $-\frac{dU}{d\mathbf{r}} = m \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2}$



3

## Szabadenergia - Mintavétel

$$F = -kT \ln \left[ h^{-3N} \iint \exp \left( -\frac{E(\mathbf{r}, \mathbf{p})}{kT} \right) d\mathbf{p} d\mathbf{r} \right] \quad (1) \text{ szabadenergia képlete}$$

Szabadenergia számítása MD mintavétellel nehéz  
(1)-ben fázistér nem teljes : integrál pozitív; ln függvény monoton nő  
-> negatív hozzájárulás hiányzik -> F túlbecsült

4

## Szabadenergia - Mintavétel

$$F = -kT \ln \left[ h^{-3N} \iint \exp \left( -\frac{E}{kT} \right) dp dr \right] \quad (1) \text{ Szabadenergia képlete}$$

$$F = -kT \ln \left[ \int \exp \left( -\frac{E}{kT} \right) dr \right] + \left( \text{ideális gáz} \right) \quad (2) \text{ Impulzus szerint integrálva}$$

$$F' = -kT \ln \left[ \frac{\int \exp \left( -\frac{E}{kT} \right) dr}{\int \exp \left( -\frac{E}{kT} \right) \exp \left( +\frac{E}{kT} \right) dr} \right] \quad (3) \text{ Térfogati integrállal osztva}$$

$$F' = kT \ln \left[ \frac{\int \exp \left( +\frac{E}{kT} \right) \exp \left( -\frac{E}{kT} \right) dr}{\int \exp \left( -\frac{E}{kT} \right) dr} \right] = kT \ln \left\langle \exp \left( \frac{E}{kT} \right) \right\rangle \quad (4) \text{ előző egyenlet várható érték alakban}$$

(4)-ben a nagy energiájú tagok hozzájárulása F-hez számottevő, de mintavételének valószínűsége kicsi

5

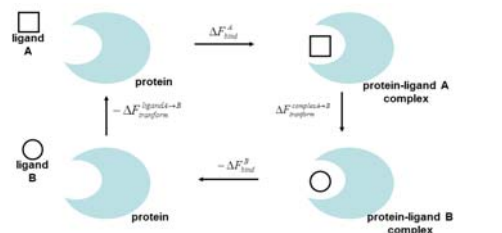
## Szabadenergia - Mintavétel

Idő skála (s)	Amplitúdó (Å)	Jellemzés	MD lépésszám (lépés ~ fs)
$10^{-15}$ - $10^{-12}$	0.001-0.1	kötés megnyúlás, kötésszög torzulás	1-1000
$10^{-12}$ - $10^{-9}$	0.1-10	fehérje oldallánc, hurok, kollektív mozgások	$10^3$ - $10^6$
$10^{-9}$ - $10^{-6}$	1-100	kisméretű fehérjék feltekeredése;	$10^6$ - $10^9$
$10^{-6}$ - $10^{-1}$	10-100	fehérje feltekeredés, ligandum-fehérje kötődés	$10^9$ - $10^{14}$

6

## Szabadenergia különbség

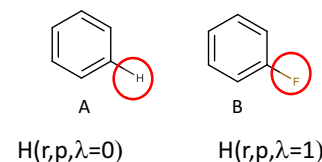
- A mintavételezés részlegessége nehezíti F és  $\Delta F = F_B - F_A$  számítását
- Hasonló rendszerek  $\Delta F = F_B - F_A$  (A hasonló B-hez) számítására speciális technikák (lásd később)
- Termodinamikai ciklus: 2 hasonló ligandum kötődési szabadenergia különbségének ( $\Delta \Delta F$ ) számítását visszavezeti hasonló rendszerek szabadenergia különbségének számítására



- $\Delta F(A)_{bind} - \Delta F(B)_{bind} = \Delta F(complx)_{tr} - \Delta F(ligand)_{tr}$
- „alkímiai” transzformációk:  $\Delta F(complx)_{tr}$  és  $\Delta F(ligand)_{tr}$ 
  - 2 transzformáció  $\Delta \Delta F$  számításához

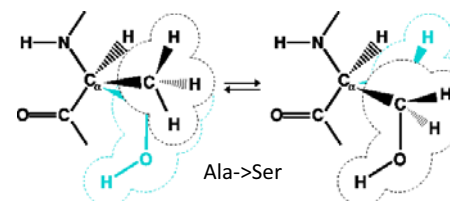
7

## Alkímiai transzformáció - csatolási paraméter



$$H_\lambda = H(r,p,\lambda) = (1-\lambda) H_A + \lambda H_B$$

$\lambda$  – csatolás paraméter  
 $H_\lambda$   $\lambda$ -nak más függvénye is lehet  
 $H_A, H_B$  is függhet  $\lambda$ -tól



<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.6/ug/node36.html>

8

## MD technikák $\Delta F$ számítására

- Termodinamikai integrálás (TI)
- Szabadenergia perturbáció (FEP)
- Átlagos erő potenciálja (PMF)
- Nem egyensúlyi munka (Jarzynski egyenlet)

9

## Termodinamikai integrálás

$$\Delta F = F_B - F_A = F(\lambda=1) - F(\lambda=0) = \int_{\lambda=0}^{\lambda=1} F'(\lambda) d\lambda$$

$$F' = \frac{d}{d\lambda} [-kT \ln Z(\lambda)] = \left\langle \frac{\partial E}{\partial \lambda} \right\rangle$$

$$F' = \left\langle \frac{\partial E}{\partial \lambda} \right\rangle \rightarrow \frac{dF(x, \lambda)}{d\lambda} = \frac{d \left( -kT \ln \int e^{-\frac{E(x, \lambda)}{kT}} dx \right)}{d\lambda}$$

$$= -kT \frac{1}{\int e^{-\frac{E(x, \lambda)}{kT}} dx} \int e^{-\frac{E(x, \lambda)}{kT}} \left( -\frac{1}{kT} \frac{dE(x, \lambda)}{d\lambda} \right) dx = \left\langle \frac{dE(x, \lambda)}{d\lambda} \right\rangle$$

Pl.:  $E(x, \lambda) = (1-\lambda) E_A(x) + \lambda E_B(x)$ ;  
 $dE/d\lambda = E_B - E_A$

10

## Termodinamikai integrálás

### • Megvalósítás

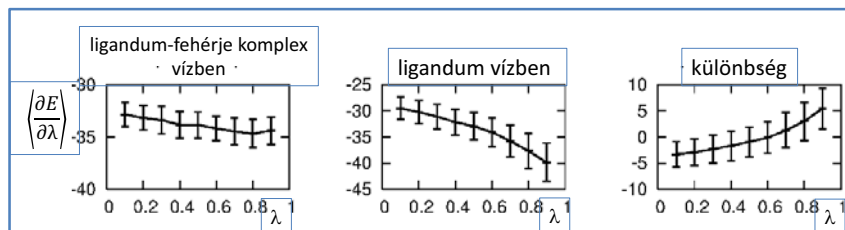
1.  $\lambda$  időben változik
2. Szimuláció különböző rögzített  $\lambda$  értékeknél

- $\left\langle \frac{\partial E}{\partial \lambda} \right\rangle$  kiszámítása

– T.f.:  $\frac{\partial E}{\partial \lambda} = E_B - E_A \rightarrow \langle E_B - E_A \rangle_\lambda$   $\lambda$ -tól függ; általában bonyolultabb  $\frac{\partial E}{\partial \lambda}$

- Numerikus integrálás – „sima”  $F(\lambda)$  szükséges

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



11

## Szabadenergia perturbáció

$$F = -kT \ln \left[ \int \exp \left( -\frac{E}{kT} \right) dr \right] \quad (1) \text{ szabadenergia képlete}$$

$$F_B - F_A = -kT \ln \left[ \frac{\int \exp \left( -\frac{E_B}{kT} \right) dr}{\int \exp \left( -\frac{E_A}{kT} \right) dr} \right] \quad (2) \text{ két rendszer szabadenergia különbsége}$$

$$F_B - F_A = -kT \ln \left[ \frac{\int \exp \left( -\frac{E_A}{kT} \right) \exp \left( \frac{E_A}{kT} \right) \exp \left( -\frac{E_B}{kT} \right) dr}{\int \exp \left( -\frac{E_A}{kT} \right) dr} \right] \quad (3) 1 = \exp \left( -\frac{E_A}{kT} \right) \exp \left( \frac{E_A}{kT} \right)$$

$$F_B - F_A = -kT \ln \left[ \frac{\int \exp \left( -\frac{E_A}{kT} \right) \exp \left( -\frac{\Delta E}{kT} \right) dr}{\int \exp \left( -\frac{E_A}{kT} \right) dr} \right] \quad (4) \Delta E = E_B - E_A$$

$$F_B - F_A = -kT \ln \left[ \left\langle \exp \left( -\frac{\Delta E}{kT} \right) \right\rangle_A \right] \quad (5) \text{ előző kifejezés várható érték alakban}$$

12

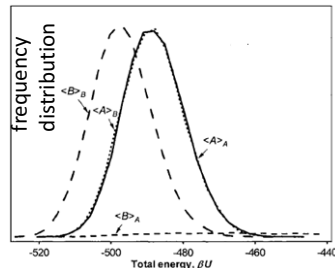
## Szabadenergia perturbáció

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

- A → B több szakaszra osztható (osztandó)

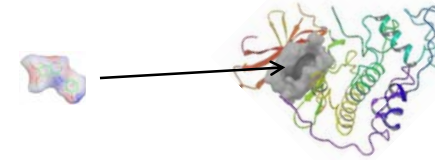
- A két állapot konfigurációs tere átfedjen

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



13

## Átlagos erő potenciálja (PMF)



$\underline{x}$  – intermolekuláris koordináták  
 $\underline{y}$  – intramolekuláris koordináták

$$F = -RT \ln \left[ \int \exp \left( -\frac{E(\underline{x}, \underline{y})}{RT} \right) d\underline{x} d\underline{y} \right] \quad \text{szabadenergia}$$

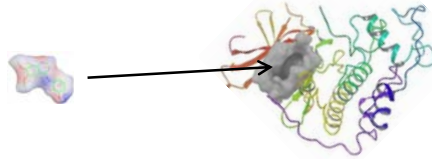
$$F(\underline{x}) = -RT \ln \left[ \int \exp \left( -\frac{E(\underline{x}, \underline{y})}{RT} \right) d\underline{y} \right] \quad \text{átlagos erő potenciálja}$$

magyarázat

$$\frac{dF(\underline{x})}{d\underline{x}} = \frac{\int \frac{dE(\underline{x}, \underline{y})}{d\underline{x}} e^{-\frac{E(\underline{x}, \underline{y})}{RT}} d\underline{y}}{\int e^{-\frac{E(\underline{x}, \underline{y})}{RT}} d\underline{y}} = -\langle \varphi(\underline{x}) \rangle_y \quad F - \text{potenciál}; \varphi - \text{erő}$$

14

## Átlagos erő potenciálja (PMF)



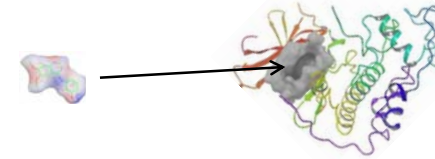
$\underline{x}$  – intermolekuláris koordináták  
 $\underline{y}$  – intramolekuláris koordináták

$$P(\underline{x}) = \int P(\underline{x}, \underline{y}) d\underline{y} = \frac{\int e^{-\frac{E(\underline{x}, \underline{y})}{RT}} d\underline{y}}{\int \int e^{-\frac{E(\underline{x}, \underline{y})}{RT}} d\underline{x} d\underline{y}} = \frac{e^{-\frac{F(\underline{x})}{RT}}}{\int e^{-\frac{E(\underline{x}, \underline{y})}{RT}} d\underline{x} d\underline{y}} \quad P(\underline{x}) - \underline{x} \text{ valószínűsége}$$

$$F(\underline{x}) - F_{\text{Ref}} = -RT \ln \frac{P(\underline{x})}{P(\text{Ref})}$$

15

## Átlagos erő potenciálja



$\underline{x}$  – intermolekuláris koordináták  
 $\underline{y}$  – intramolekuláris koordináták

Számítás:

1.  $\langle \varphi(\underline{x}) \rangle$  számítása rögzített  $\underline{x}$ -k mentén

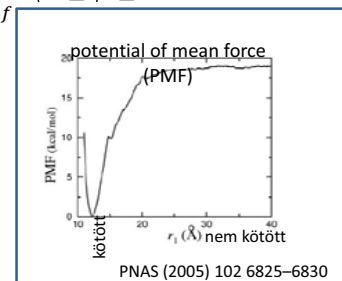
$$F(\underline{x}') - F(\text{ref}) = \int_{\text{ref}}^{\underline{x}'} \frac{dF(\underline{x})}{d\underline{x}} d\underline{x} = \int_{\text{ref}}^{\underline{x}'} -\langle \varphi(\underline{x}) \rangle d\underline{x}$$

2.  $P(\underline{x})$  számítása  $\underline{x}$  mentén

$$F(\underline{x}) - F_{\text{Ref}} = -RT \ln \frac{P(\underline{x})}{P(\text{Ref})}$$

$$F(\underline{x}) = -RT \ln P(\underline{x}) + \text{konst.}$$

Alkalmas mintavétel szükséges!



16

## Nem egyensúlyi munka

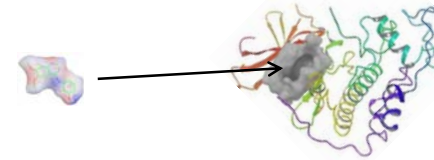
$$\Delta F = F_2 - F_1 = -kT \ln \left\langle \exp \left( -\frac{W}{kT} \right) \right\rangle \quad (\text{Jarzynski})$$

- Nem egyensúlyi úton végzett munkából ( $W$ ) számolt várható érték
- Gyors transzformáció is lehetséges a két állapot között
- Mintavételezési probléma
- Jelenlegi eljárások nem hatékonyabbak, mint az egyensúlyi módszerek

17

## Standard kötődési szabadentalpia számítás - 1

- $LP \leftrightarrow L + P$
- $\Delta G$  (nem  $\Delta\Delta G$ ) számítás
  - Ligandum tényleges kötődési folyamata

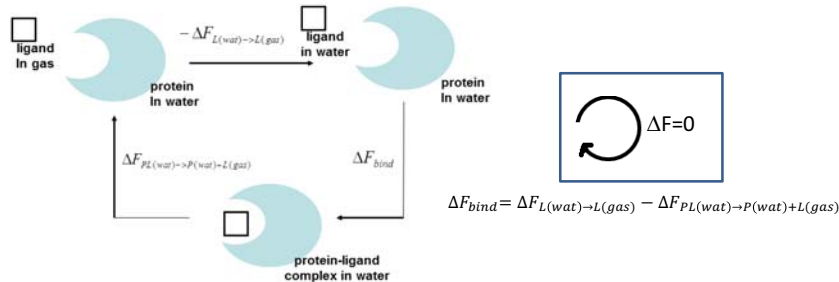


- $\lambda$  reakciókoordináta mentén: átlagos erő potenciálja (PMF)

18

## Standard kötődési szabadentalpia számítás - 2

- $LP \leftrightarrow L + P$ 
  - Kettős lecsatolás („double decoupling”);  $L$  nem hat kölcsön a környezetével



- TI vagy FEP

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

19

## Entalpia és entrópia számítása

- $\Delta F$  számítható hasonló rendszerek energiakülönbsége várható értékéből
  - v.ö. TI és FEP
- $\Delta H$ ,  $T\Delta S$  a végállapotok állapotfüggvényei várható értékének különbségéből számítható
- $\Delta H$ ,  $T\Delta S$  számítása több nagyságrenddel pontatlanabb, mint  $\Delta F$  számítása

20

## Példa – FKBP12-ligandum

Standard kötődési szabadentalpia  
Kettős lecsatolás  
FEP  
Energia komponensek is

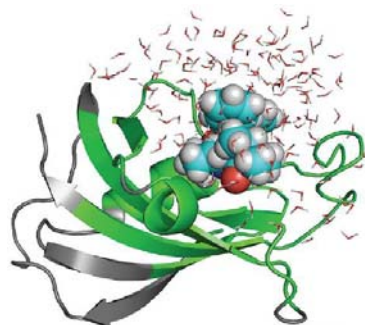


Figure 4. FKBP12 bound with ligand #8 studied previously.<sup>40,42</sup> The gray parts are treated as a mean-field approximation with generalized solvent boundary potential.<sup>40</sup> See ref 42 for computational details.

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

konf

transz

rot

<sup>21</sup>  
*J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 2234

## Példa – kötődés lizozimhez

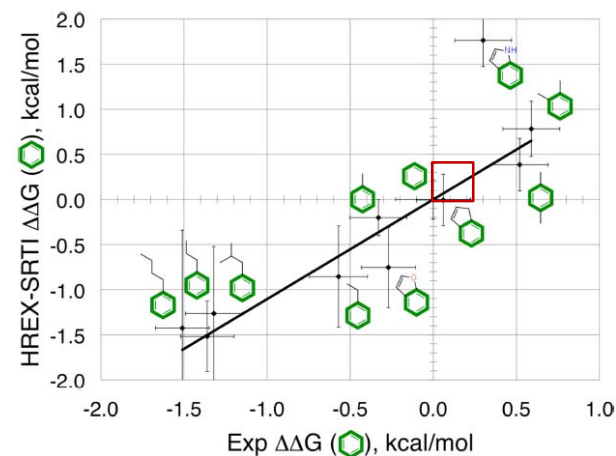


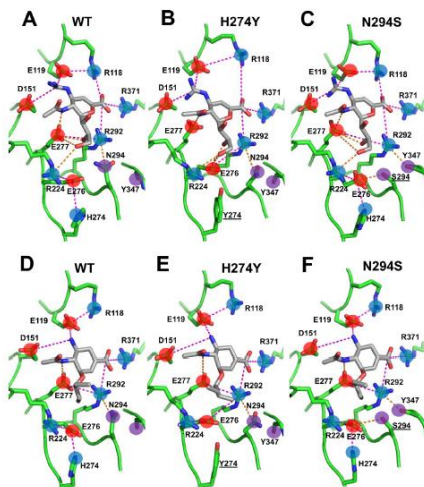
Figure 6. Comparison of the HREX-SRTI relative binding free energy prediction to experiment

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

- $\Delta\Delta G$
- termodinamikai integrálás
- kis szerkezeti változások

22

## Példa – neuraminidáz gátlók 1



- 2 ligandum
- 3 fehérje: vad típus + 2 mutáns

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

*PLOS Comp Biol* **2012**, *8* e1002665

23

## 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 <sup>a</sup>	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)
SRMM	-5.8 (7.4)	0.7 (7.0)	8.2 (7.7)	5.8 (6.2)	-0.1 (8.7)	-0.9 (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-GBSA	6.2 (8.1)	0.9 (3.8)	5.7 (6.1)	-3.9 (3.6)	2.1 (2.9)	-1.9 (3.0)	4.8 (4.6)
MM-PBSA	8.4 (10.1)	3.0 (3.9)	5.8 (4.5)	-4.7 (3.2)	2.8 (3.1)	0.2 (2.6)	5.0 (4.6)
Rosetta	-0.4 (0.3)	0.8 (0.4)	-0.4 (0.3)	0.3 (0.2)	-0.1 (0.4)	0.0 (0.0)	1.7 (0.3)

<sup>a</sup>Values 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

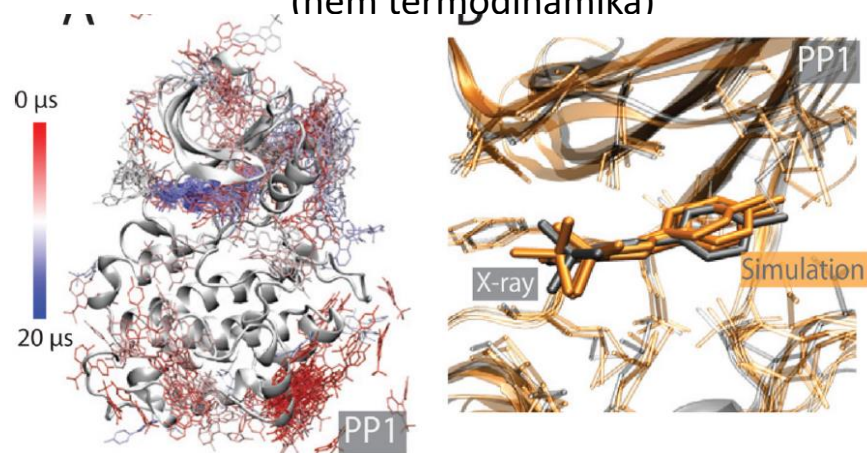
*PLOS Comp Biol* **2012**, *8* e1002665

- A különböző mutánsokhoz való kötődés erősségének sorrendje helyes mindkét ligandum esetében

- $\Delta\Delta G$ ; TI
- Vad típus/mutáns
- Kísérleti/számított
- Standard deviáció is
- Kísérleti és számított  $\Delta\Delta G$  különbség esetenként nagyobb mint stan. dev.

24

## Példa – ligandum kötés folyamata (nem termodinamika)



PP1 molekula 15μs szimuláció alatt megtalálja a Src kináz kötőzsebét

JACS 2011 133 9181

25

## Összefoglalás

- Fehérje-ligandum kölcsönhatás számítógépes modellezése – 1. rész
  - MD alapú módszerek - potenciálisan pontosak
  - Legfőbb nehézség: mintavétel
  - $\Delta\Delta F$  ( $\Delta\Delta G$ ) számítása hatékony; „Alkímiai” transzformációk
  - Technikák  $\Delta F$  számítására (hasonló állapotok között)
    - Termodinamikai integrálás
    - Szabadenergia perturbáció
    - Átlagos erő potenciálja
    - Nem egyensúlyi munka
  - Standard kötődési szabadentalpia is számítható
  - Entalpia és entrópia változás számítása fokozottan pontatlan
  - Nem rutinszerű alkalmazás; változó pontosság

26