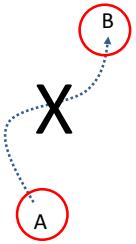
Fehérje-ligandum kötődés számítógépes modellezése II. Termodinamikai mennyiségek becslése közelítő módszerekkel

Ferenczy György

Semmelweis Egyetem
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

ferenczy.gyorgy@med.semmelweis-univ.hu

Vázlat



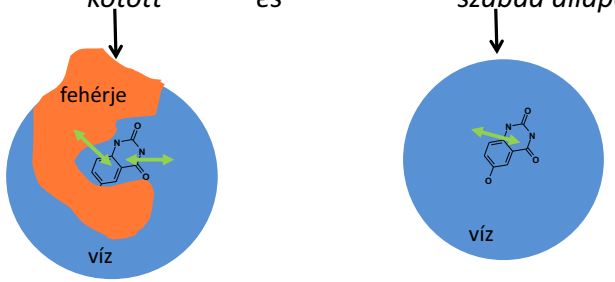
- Kötődési szabadentalpia számítása „végpont” módszerekkel
- $\Delta G=G_b-G_A$
  - G nem számítható pontosan
  - Közelítő módszer szükséges:
    - Lineáris kölcsönhatási energia módszer; LIE (Linear Interaction Energy)
    - MM-PBSA (Molecular Mechanics Poisson – Boltzmann Surface Area)
    - Dokkolás-pontozás pontozófüggvénnyel (docking-scoring)

LIE

Lineáris Kölcsönhatási Energia Módszere

LIE

Kölcsönhatási energia különbség a ligandum és a környezete között kötött és szabad állapotokban



külön skálázva a van der Waals és az elektrosztatikus komponenst

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

LIE

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

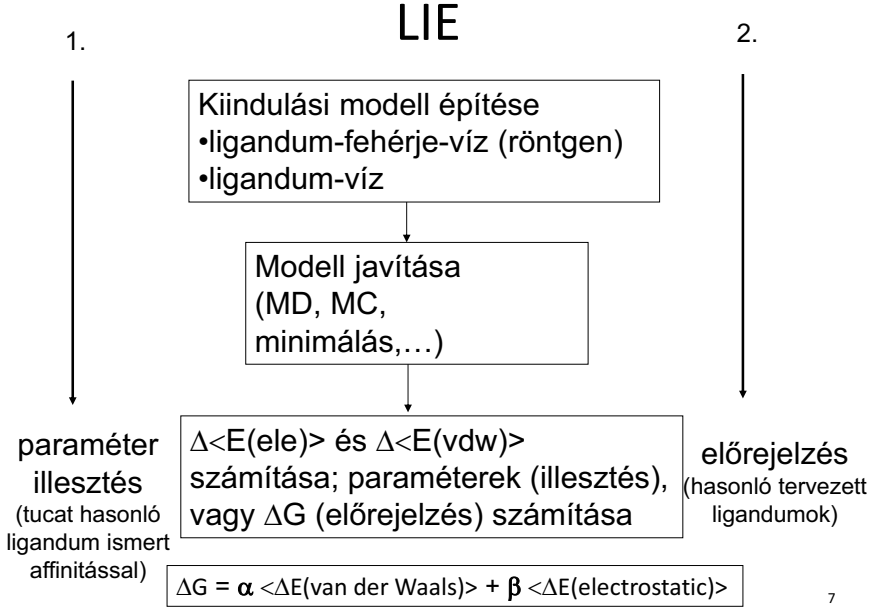
- $\langle E \rangle$ energia várható érték – molekuladinamika (esetleg energia minimálás) várható értékek különbsége! (v.ö. TI, FEP)
- α illesztendő paraméter
- β ½ - elektrosztatikus lineáris válasz közelítés vagy illesztendő paraméter
- X különböző közelítések:
  - 0 – eredeti
  - $X = \gamma\left(\langle E^{cav}_{cmplx}\rangle - \langle E^{cav}_{solv}\rangle\right) \quad - felület\ nagysága$

- Lineáris válasz: $\Delta G = 1/2\ E^{el}$; E->G
- QSAR típusú egyenlet

LIE

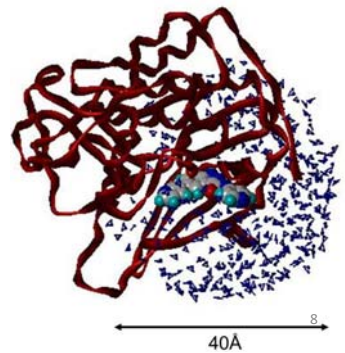
- Alkalmazás feltételei:
  - A kötésmód (közelítőleg) ismert
  - Néhány (~10) ligandum kötési állandója ismert – paraméter illesztés
  - Ligandumok hasonlóak (v.ö. FEP, TI)
    - hibakompenzáció

LIE



LIE

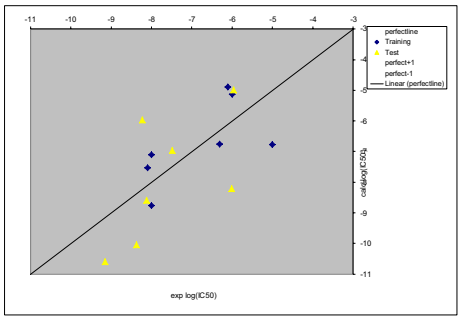
- Számítás néhány jellemzője:
  - Explicit ↔ implicit víz
  - MM erőtér (töltések)
  - Minimálás, dinamika
    - egyensúly, mintavétel (30ps, 50ps)



LIE

CDK2 ligandumok (AM1 töltés)

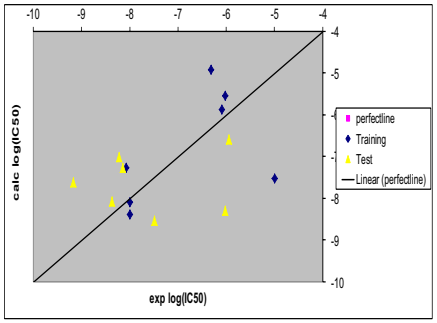
OPLS explicit víz, dinamika



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

lényegesen több számítás

OPLSA_AA implicit (GB) víz, minimálás



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

lényegesen kevesebb számítás

MM-PBSA

Molecular Mechanics – Poisson-Boltzmann Surface Area

MM-PBSA

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

MM-PBSA

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

- 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_{MM} , G_{PB} , G_{SA} , TS_{MM}) számítása a víz eltávolításával kapott szerkezetekre

MM-PBSA

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

- $E_{MM}=E_{kötés}+E_{szög}+E_{torz}+E_{vdw}+E_{elek}$
  - Egyetlen trajektória
    - előnye:
      - intramolekuláris E_{MM} kioltás, numerikus hiba csökken
      - Kevesebb számítás
    - hátránya:
      - Mintavételi hiba lehetősége

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 rácspontokban
    - Oldódást kísérő energiaváltozás (elektrosztatika)
- Alternatíva: Általánosított Born (GB) modell (MM-GBSA)
  - PB közelítése
  - Kevesebb számítás

MM-PBSA

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

- G_{SA}
  - $G_{SA}=\gamma SA+\beta$
    - γ, β állandók
    - SA (surface area): oldószer által hozzáférhető felszín nagysága
    - Hidrofób hidratáció

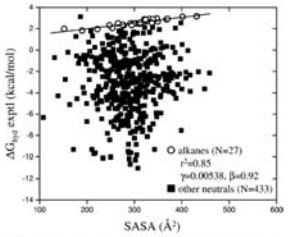


Figure 2. Experimental free energies of hydration vs total molecular solvent-accessible surface area (SASA). The best fit line to the 27 linear and branched alkanes (○) yields a correlation coefficient $r^2 = 0.85$, $\gamma = 0.005\,38$, and $\beta = 0.92$. Other compounds are represented as filled squares (■).

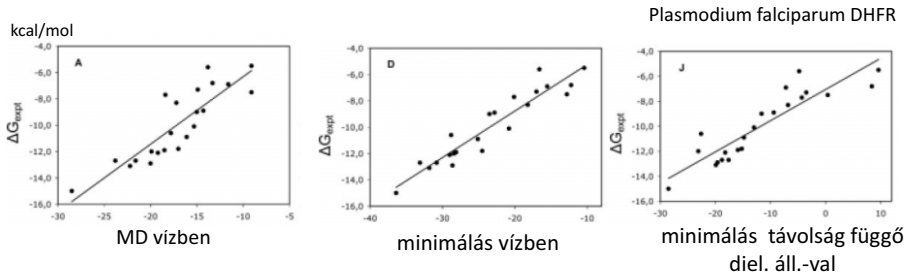
JCTC **2006** *2* 128

MM-PBSA

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

- S_{MM}
  - Molekula rezgések hozzájárulnak a szabadenergiához
  - Kis frekvenciájú rezgések entrópia hozzájárulása lényeges ΔG számításához
  - Normál mód analízis
    - Energia minimált szerkezet
    - Erőállandó mátrix diagonalizálása
    - Számításigényes – néhány „snapshot”-ra
    - Hiányosságok
      - anharmonicitás
      - oldószerhatás

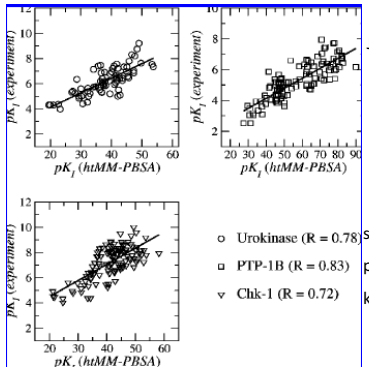
MM-PBSA



JCC **2010** *31* 797

- Abszolút ΔG rosszul becsült
- ΔG_{exp} és ΔG_{calc} korrelál
- Mintavételtől kevéssé függ (?)

MM-PBSA



JMC **2009** *52* 3159

- Abszolút ΔG rosszul becsült
- ΔG_{exp} és ΔG_{calc} korrelál
- Regressziós paraméterek fehérjétől függnek

Pontozófüggvény és dokkolás

Pontozó függvény

- 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!

Pontozó függvény

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

Erőtér alapú pontozófüggvény

- Gáz-fázisú energia számítás
  (↔ oldatbeli szabadenergia)
- Fehérje tere előre kiszámítható egy térháló pontjain
  –> számítási sebesség növekszik
- Lehetővé tesz szerkezet optimálást
- Kiegészíthető
  - oldószer hatás
  - entrópia (?)

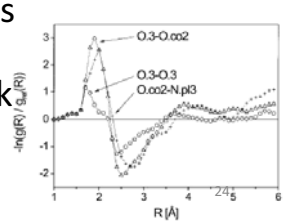
Tapasztalati pontozófüggvények

- 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

Tudásalapú pontozófüggvények

- Komplexek kísérleti adatainak statisztikai analíziséből
  - $E_i = -kT\ln(p_i)$ – energia tag ~ előfordulás valószínűsége
- Protein Data Bank: több mint 123000 szerkezet 2016. októberében
- Kötődési affinitás adat nem szükséges
- Nagy távolságú mintavétel – oldószer hatás is
- Kis távolságú mintavétel – specifikus kölcsönhatások hangsúlyozása
- Taszító kölcsönhatások nem teljesek



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

Dokkolás-pontozás közelítései

Néhány fontosabb:

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

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

Fehérje flexibilitás – dokkolás-pontozás

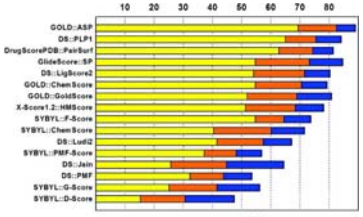
- Dokkolás fehérje flexibilitás figyelembe vételével
  - Több statikus fehérje szerkezet használata
    - Kísérleti szerkezetek – komplexek különböző ligandumokkal, NMR
    - Számítással (MD, MC) generált szerkezetek
    - Több számítást igényel
  - „Puha” („soft”) fehérje szerkezet
    - több szerkezetből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

Dokkolás-pontozás alkalmazásai



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

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

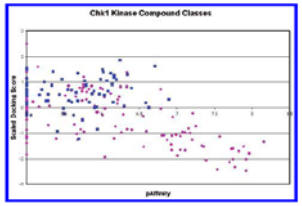
- Fehérje szerkezet
  - röntgen krisztallográfia
  - homológia modell
- Ligandum szerkezet
  - Modell
- Komplex szerkezet
  - Ligandumnak a fehérje kötőzsebébe illesztése - dokkolás
  - Ligandum különböző pozícióinak rangsorolása pontozófüggvénnyel
    - Korlátozott fehérje flexibilitás
    - Ligandum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

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

program	Chk1	FXa
Dock4	−0.33	−0.31
DockIt	−0.49	−0.19
FlexX	−0.57	−0.31
Flo+	−0.44	−0.38
Fred	−0.14	0.01
Glide	−0.47	−0.08
Gold	−0.42	−0.05
LigandFit	−0.45	−0.13
MOEDock	−0.29	0.00
MVP	−0.26	0.10



J. Med. Chem. 2006, 49, 5912

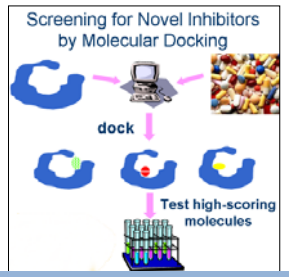
Correlation Between the Scores and Experimental Binding Affinitiesa

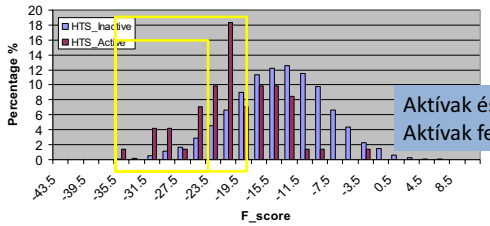
method	Pearson *R*	Spearman *ρ*
code 1	0.76 (0.80−0.71)	0.74 (0.79−0.68)
code 2	0.72 (0.77−0.66)	0.73 (0.78−0.67)
code 3	0.67 (0.72−0.60)	0.68 (0.74−0.61)
code 4	0.64 (0.70−0.58)	0.64 (0.70−0.56)
code 5	0.63 (0.69−0.56)	0.64 (0.71−0.57)
code 6	0.62 (0.68−0.55)	0.61 (0.68−0.53)
code 7	0.62 (0.68−0.55)	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

Virtuális szűrés

- Kémiai kiindulópont azonosítás
- Számítás menete:
  - Nagy számú, szerkezetileg szerteágazó, létező molekula dokkolása
  - Kapott komplexek pontozása
- „Legjobbak” kísérleti tesztelése





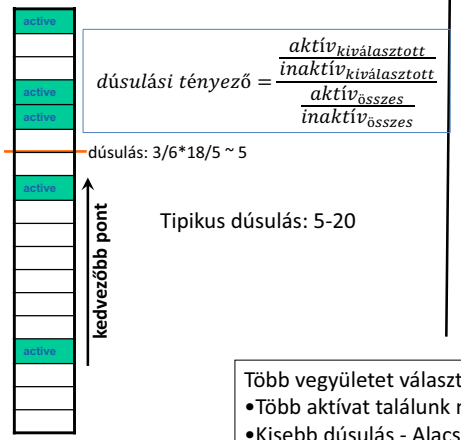
Aktívak és inaktívak részleges elválasztása
Aktívak feldúsulnak az alacsony pontúak között

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: ~10^2
  - *találati arány: 0.1%* ($10^2/10^5$)

- Virtuális szűrés
  - Cél a HTS találati arány javítása a vegyületek előszűrésével
  - ~10^6 molekula dokkolása és pontozása
  - Legjobb ~10^3 molekula kísérleti tesztelése; tipikus találati arány néhány %

Virtuális szűrés hatékonysága

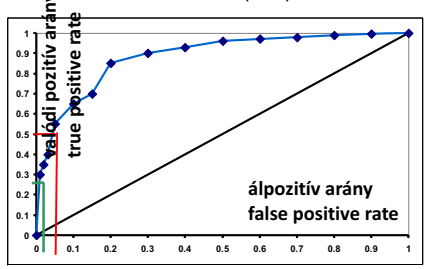


$$\text{dúsulási tényező} = \frac{\frac{\text{aktív}_{\text{kiválasztott}}}{\text{inaktív}_{\text{kiválasztott}}}}{\frac{\text{aktív}_{\text{összes}}}{\text{inaktív}_{\text{összes}}}}$$

dúsulás: 3/6*18/5 ~ 5

Tipikus dúsulás: 5-20

receiver operating characteristic (ROC)
area under curve (AUC)



10^2 aktív; 10^5 inaktív – 0.1%
35 aktív; 2000 inaktív - 1.75% EF=18
55 aktív; 5000 inaktív – 1% EF=10

Több vegyületet választunk tesztelésre
•Több aktívat találunk meg
•Kisebb dúsulás - Alacsonyabb találati arány

Alacsony találati arány (1-10%) amely meghaladja a HTS találati arányt (~10^{-1}%)

Összefoglalás

- Végpont módszerek - Közelítő eljárások ΔG 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 gyógyszerkutatási alkalmazás