

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, elsősorban ligandum-fehérje kötődés
 - kvalitatív és kvantitatív jellemzése
 - termodinamikája (és kinetikája)
 - befolyásolása, gyógyszertervezés
 - molekuladinamika
 - Kvantitatív jellemzés eszköze
 - Kitekintés más alkalmazásokra

2

Vázlat

- Alapok
- Számítás-mérés
- Víz szerepe
- Ligandum-fehérje kötés „lépései”
- Számítás – Molekuladinamika

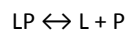
3

Ligandum-fehérje kötődés szerepe

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

4

Néhány összefüggés



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

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

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

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

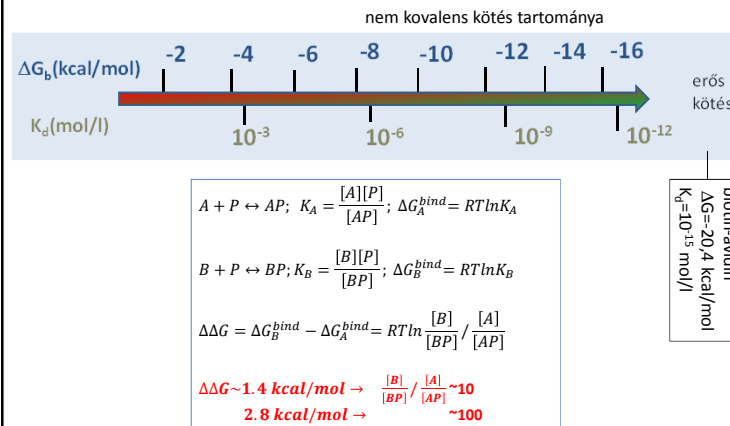
$$F = -k_B T \ln Z,$$

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

csak egyszerű rendszerekre számítható

5

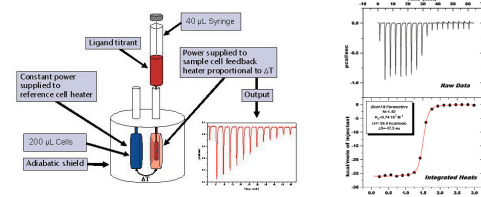
Szabadenergia – Egyensúlyi állandó



6

Kötési termodinamika mérése

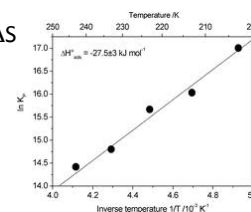
- Izotermális titráló kalorimetria
 - $n, K_d, \Delta H \rightarrow \Delta G, \Delta S$
 - korlátok:
 - oldatban
 - fehérje mennyiség (10-100 μg)
 - áteresztőképeség



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



8

Hidrofób effektus

- Hidrofób effektus:

Apoláris vegyület átvitele apoláris oldatából vízbe
(szénhidrogén \rightarrow vízbe)

Analogia (inverz): deszolvatáció ligandum-fehérje kötődéskor
apoláris részek: oldat \rightarrow kölcsönhatás egymással

- Apoláris kölcsönhatások megszűnése

- Üres hely betöltése az apoláris közegben

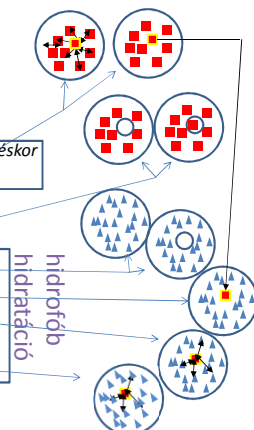
- Üreg kialakítása vízben

- Apoláris vegyület behelyezése

- Oldott anyag – oldószer kölcsönhatás létrejötte

- Vízszerkezet átrendeződése

ΔG pozitív



9

Hidrofób effektus

- Hidrofób effektus:

ΔG nő

20°C: ΔH (kedvező) és $T\Delta S$ (kedvezőtlen) 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

\updownarrow

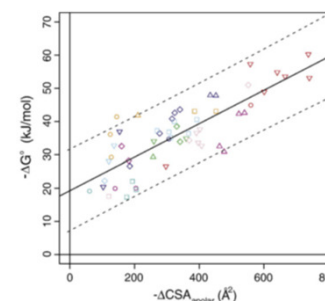
- Erősebb, de kevesebb H-híd – „two-state” modell

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

- Nincsen általános érvényű kvantitatív modell!

11

Apoláris felszín és kötődési szabadenergia

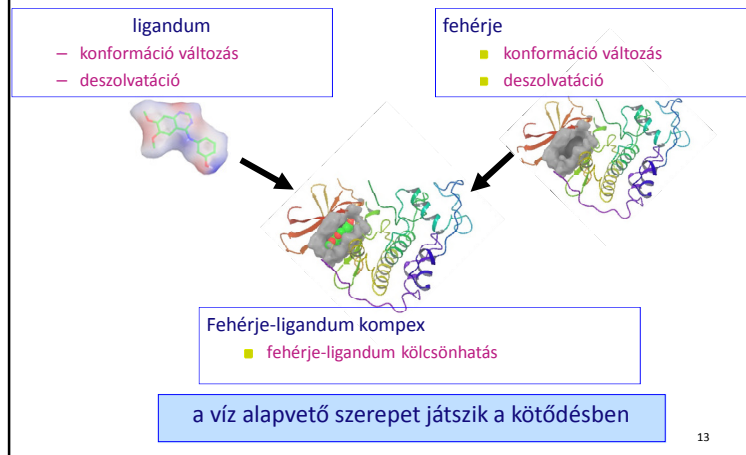


Protein-ligandum kötődési szabadentalpia korrelál a kötődés során eltemetett apoláris felszínnel ($R^2=0.65$).

Olsson et al. J. Mol. Biol. (2008) 384, 1002

12

Fehérje-ligandum kötődés „lépései”



13

Kötődés kvalitatív termodinamikája

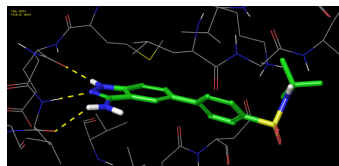
- Deszolvatáció (ligandum+fehérje)
 - kedvező ΔS (vízszerkezet változás)
 - kedvezőtlen ΔH
- Konformáció változás (ligandum+fehérje)
 - kedvezőtlen ΔH (kötés előtt optimális)
- Fehérje-ligandum kölcsönhatás
 - kedvezőtlen ΔS (korlátozott mozgás)
 - kedvező ΔH (poláris és van der Waals kölcsönhatások)

ΔG több ellentétes hatású tag összege

14

Kötődés kvalitatív termodinamikája

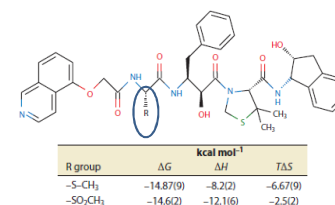
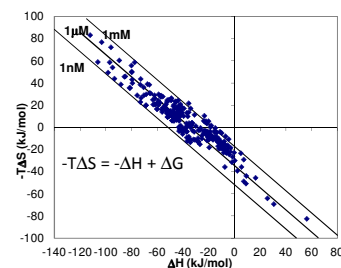
- ΔG , ΔH , ΔS szerkezeti elemekhez rendelése elvileg problémás
 - Additivitás korlátozott
 - ΔH additivitás jó közelítés
 - ΔS additivitása rossz közelítés
- ΔG , ΔH , ΔS tényleges lépésekhez rendelhető - állapotfüggvények



15

Entalpia-entrópia kompenzáció

- Fehérje-ligandum rendszer kis szerkezeti változása tipikusan nagy és ellentétes irányú $\Delta\Delta H$ és $\Delta(T\Delta S)$ 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

16

Affinitás és molekula méret

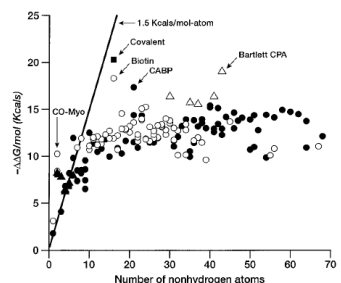


FIG. 1. Free energy of binding (in kcal/mol) for ligands and enzyme inhibitors plotted as a function of the number of nonhydrogen atoms in the ligand. See Table 1. A line with slope of 1.5 kcal/mol and an intercept of 0 is included as a visual aid to analysis. Δ , Metal ions or metalloenzymes; \blacktriangle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

PNAS 1999, 96, 9997

17

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/közel állandó

18

Molekuladinamika

2015.10.08

19

Bevezetés

- Molekula dinamika - kapcsolat mikroszkopikus és makroszkopikus mennyiségek között
 - szerkezet
 - dinamika
 - termodinamika



Fnill_10_preSMD.mpg

20

Történet

- Alder, B. J. and Wainwright, T. E.
J. Chem. Phys. **27**, 1208 (1957)

- McCammon, J. A., Gelin, B. R.,
and Karplus, M.
Nature (Lond.) **267**, 585 (1977)



21

Néhány alapfogalom

- Termodinamikai állapot
 - A rendszert néhány paraméter jellemzi; pl: T, P, N
- Mikroszkopikus állapot
 - A rendszert az atomok koordinátái és impulzus momentumai (fázistér) jellemzik
- Termodinamikai sokaság
 - Azonos termodinamikai állapotokhoz tartozó mikroszkopikus állapotok együttese
- Molekula dinamikai szimuláció
 - Egy adott sokasághoz tartozó fázistér pontjainak előállítása az idő függvényében

22

Termodinamikai sokaságok

- Mikrokanonikus – NVE (elszigetelt rendszer)
- Kanonikus – NVT (termikus egyensúly)
- Izoterm-izobar – NPT
- Nagykanonikus – μ VT (egyensúly részecsketartállyal)

23

Ergodikus hipotézis

- Mérhető mennyiségek: sokaság átlag $\langle A \rangle_{\text{sokaság}}$
- Molekuladinamika: időátlag $\langle A \rangle_{\text{idő}}$
- Ergodikus hipotézis:

$$\langle A \rangle_{\text{idő}} = \langle A \rangle_{\text{sokaság}}$$

„elég” hosszú idejű MD – megfelelő mintavétel

24

Erőter

- Molekula mechanika
 - „Klasszikus”
 - Egyszerű, gyorsan számítható
 - Paramétereket tartalmaz
 - a pereméter illesztés terében alkalmazható
 - kémiai reakciókra tipikusan nem jó
- Kvantum mechanika
 - pontos
 - számításigényes

25

Molekula mechanika

$$E = E_{\text{str}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{tors}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{el}} + E_{\text{cross}}$$

intramolekuláris

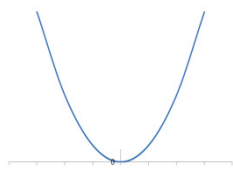
intermolekuláris

26

Kötésnyújtási energia

$$E_{\text{str}} = k(r - r_0)^2$$

$$F_{\text{str}} = -2k(r - r_0)$$



r_0 környezetében jó
 k és r_0 atomoktól függő paraméterek

27

Kötésnyújtási energia - paraméterek

$$E_{\text{str}} = k(r - r_0)^2$$



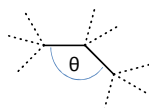
general class	atom type ¹	description
hydrogen bonds		
HI		aridic or imidic hydrogen
HC		explicit hydrogen attached to carbon
HO		hydrogen on hydroxyl oxygen
HW		hydrogen attached to water
HW		hydrogen in water
HO		aridic hydrogen in hcs
HI		hydrogen of lysine or arginine (positively charged)
all atom-carbon bonds²		
IC	sp ² carbonyl carbon and aromatic carbon with hydroxyl substituent in tyrosine	
CA	sp ² aromatic carbon in 6-membered ring with 1 substituent	
CB	sp ² aromatic carbon at junction between 5- and 6-membered rings	
OC	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring with 1 substituent and next to a nitrogen	
OK	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring between 2 nitrogens and bonded to 1 H (in purine)	
OM	sp ² same as OK but one substituent	
ON	sp ² aromatic junction carbon in between 5- and 6-membered rings	
OG	sp ² carbon in 6-membered ring of purine between 2 Ns nitrogens and bonded to 1 hydrogen	
OA	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring between 2 nitrogens and bonded to 1 H (in hcs)	
CT	sp ² carbon with a explicit substituent	
CV	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring bonded to 1 H and bonded to an explicit hydrogen	
OW	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring bonded to 1 H and bonded to an explicit hydrogen	
CI	sp ² aromatic carbon in 5-membered ring with 1 substituent	

Bond Stretching Potential Parameters			
Bond	used for	$K_s/\text{kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$	$R_{eq}/\text{\AA}$
CT-CT	BMT, EMT	310.0	1.526
CT-HI	BMT, EMT	340.0	1.090
CT-HC	BMT, EMT	340.0	1.090
CT-NA	BMT, EMT	337.0	1.475
CB-HI	BMT, EMT	367.0	1.080
CB-NA	BMT, EMT	477.0	1.343
CW-HI	BMT, EMT	367.0	1.080
CW-NA	BMT, EMT	427.0	1.381
CW-CW	BMT, EMT	549.0	1.350
AL-Cl	TCA	116.1	2.170
P-F	PF ₆	260.3	1.646
NN-ON	NO ₂	300.0	1.260

28

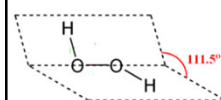
Kötéshajlítás

$$E_{bend} = k(\theta - \theta_0)^2$$



29

Torziós/dihedrális szög

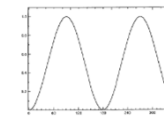
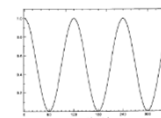


$$E_{tors} = \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)]$$

V_n – gát magasság
n - periodicitás

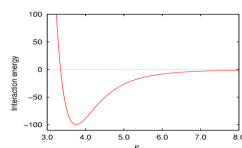
Dihedral angle (atom types)				V_n , kcal/mol	n	φ_0	comments
C	CT1	NH1	C	0.2000	1	180.00	! backbone phi
NH1	C	CT1	NH1	0.6000	1	0.00	! backbone ksi
CT1	C	NH1	CT1	1.6000	1	0.00	! backbone omega
CA	CA	CA	CA	3.1000	2	180.00	! Phe side chain
H	OH1	CT2	CT1	0.4200	3	0.00	! Ser side chain

~15000 paraméter



30

van der Waals kölcsönhatás



Közele: taszító; $\exp(-r)$; r^{-12}

Közepes: vonzó; r^{-6} ; diszperzió

Távoli: eltűnik

$$E_{vdw} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} \right] - \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad \sigma_{ij} = \frac{1}{2}(\sigma_i + \sigma_j)$$

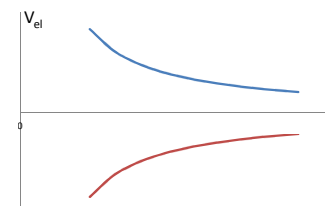
$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}$$

Pontosabb, de számításigényesebb taszító potenciál: $c * \exp\left(\frac{-r}{\sigma}\right)$

31

Elektrosztatikus kölcsönhatás

$$V_{el} = \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad \text{Coulomb}$$



32

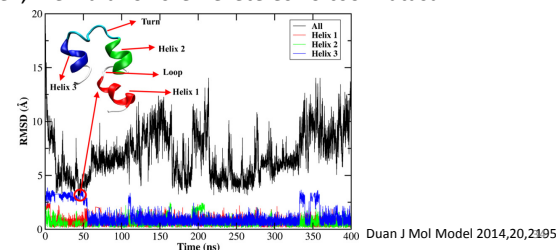
MM paraméterek meghatározása

- Kvantum mechanika számítások
- Validálás: kísérleti eredmények
 - Makromolekula szerkezet
 - NMR adatok
 - Van der Waals komplexek szerkezete és energiája
- Kiterjesztés analógia alapján
- Hiba kioltás; paraméterek kölcsönös függősége

33

MM erőter minősége

- Fehérje szerkezet
- DNS, RNS szerkezet
- Szerves molekulák konformációja
- Ligandum-fehérje kölcsönhatás
- Lipidek, membránok szerkezete és kölcsönhatásai
- ...



Duan J Mol Model 2014;20:2495

Néhány MM erőter

- Charmm (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics)
- AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement)
- OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations)
- GROMOS (GRONingen Molecular Simulation)
- MMFF (Merck Molecular Force Field)

fehérjék és/vagy ligandumok

35

MD algoritmus

Newtoni mechanika

$$r^N(r_1, r_2 \dots r_N) \quad p^N(p_1, p_2 \dots p_N)$$

$$U(\underline{r}) \quad K(\underline{p}) = \sum_i \frac{|p_i|^2}{2m_i}$$

$$H = K + U \quad \dot{r}_i = \frac{p_i}{m_i} \quad \dot{p}_i = f_i$$

36

Verlet algoritmus

$$p_i(t), r_i(t) \rightarrow p_i(t + \delta t), r_i(t + \delta t)$$

$$\rightarrow f_i(t)$$

$$p_i\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = p_i(t) + \frac{1}{2}\delta t \cdot f_i(t)$$

$$r_i(t + \delta t) = r_i(t) + \frac{\delta t \cdot p_i\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right)}{m_i}$$

$$\rightarrow f_i(t + \delta t)$$

$$p_i(t + \delta t) = p_i\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) + \frac{1}{2}\delta t \cdot f_i(t + \delta t)$$

Tipikus δt biokémiai rendszerek szimulációjánál: 1-4 fs

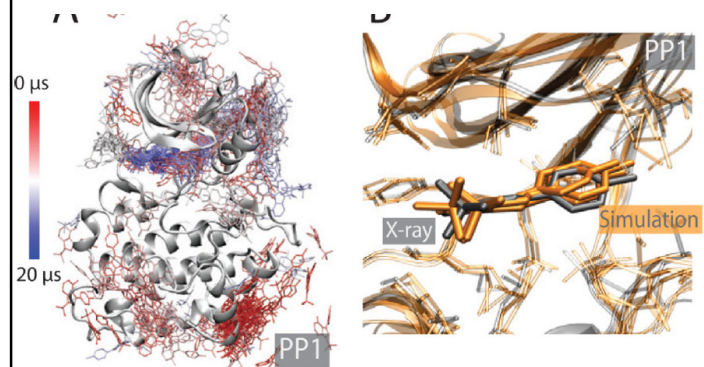
37

Alkalmazások

1. dinamika

38

Példa – ligandum kötés folyamata



PP1 molekula 15μs szimuláció alatt megtalálja a Src kináz kötőzsebét

JACS 2011 133 9181

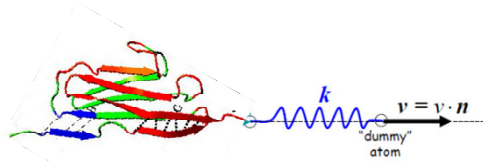
40

MD alkalmazások

2. erővezérelt molekula dinamika

Erővezérelt MD

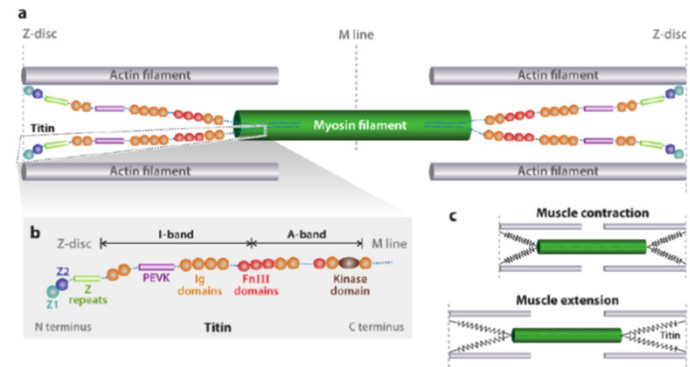
- Állandó sebességű húzás



$$U = \frac{1}{2} k [vt - (\vec{r} - \vec{r}_0) \cdot \vec{n}]^2$$

- Állandó erővel való húzás

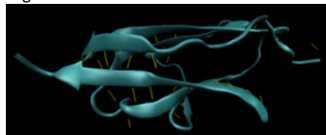
Titin szerkezet - funkció



42

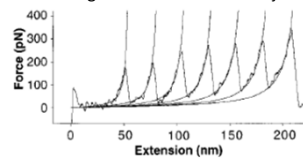
Kigombolyodás és erő

titin Ig27 domén



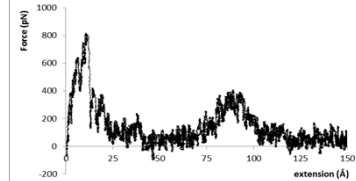
Állandó sebességű húzás

AFM - több Ig27 doménból álló fehérje

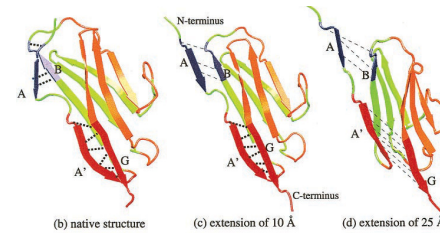


Rief et al. (1997 Science 276 1109)

SMD - Ig27 domén

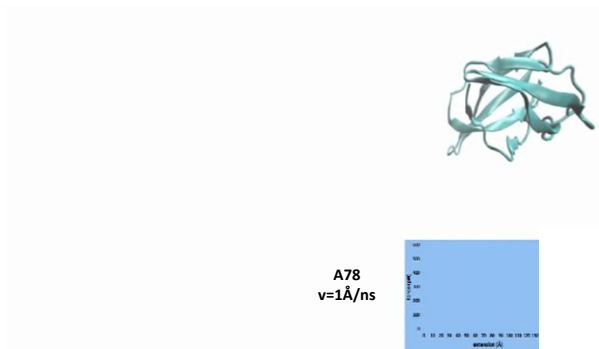


Kigombolyodás és szerkezet



Lu, H., and Schulten, K. (2000). Biophys. J. 79, 51–65

Titin Fn domén kitekeredés mechanizmusa 1.



45

MD lehetőségek és korlátok

- Lehetőségek
 - Szerkezet vizsgálat/finomítás
 - Dinamika
 - Konformációs viszonyok, Ligandum-fehérje kötődés, erővezérelt folyamatok,...
 - Termodinamika lásd később
 - Szabadentalpia változás
 - oldódás, ligandum-fehérje kötődés,...
- Korlát
 - Mintavétel mértéke lásd később
 - Erőtér pontossága
 - Kémiai változás általában nem vizsgálható