

## 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
- Mérés és számítás
- Ligandum-fehérje kötés elemzése
- Víz szerepe
- Számítás – Molekuladinamika

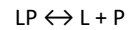
3

## Ligandum-fehérje kötődés szerepe

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

4

## Néhány összefüggés



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

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

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

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

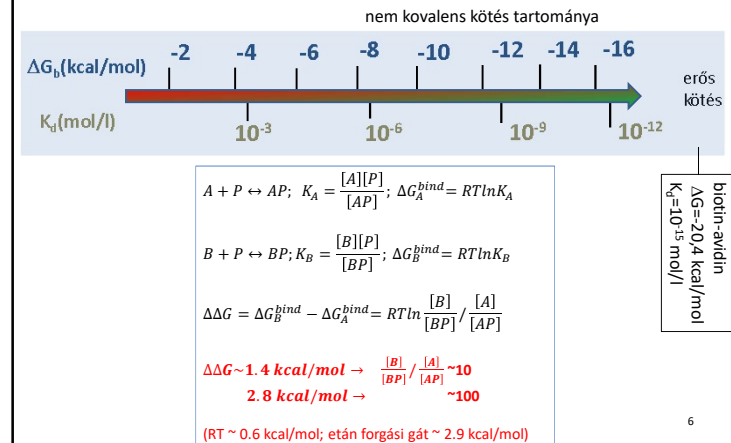
$$F = -k_B T \ln Z,$$

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

csak egyszerű rendszerekre számítható

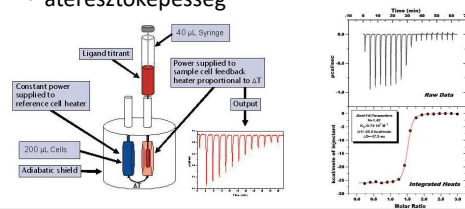
5

## Szabadenergia – Egyensúlyi állandó



## Kötési termodinamika mérése

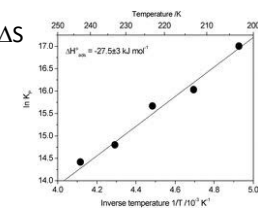
- Izotermális titráló kalorimetria
  - $n, K_d, \Delta H \rightarrow \Delta G, \Delta S$
  - korlátok:
    - oldatban
    - fehérje mennyiség (10-100  $\mu\text{g}$ )
    - áteresztőképesség



7

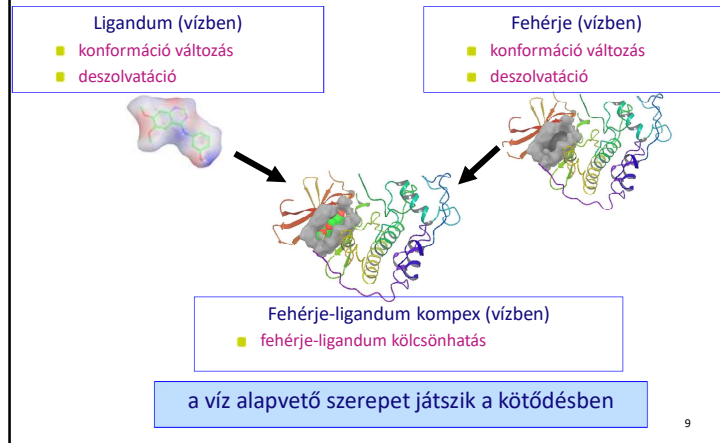
## Kötési termodinamika mérése

- Van't Hoff analízis
  - $\ln K_d = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R}$
  - $K_d$  hőmérséklet függéséből  $\Delta H$  és  $\Delta S$
  - Kísérleti technikák
    - Radioligandum leszorítás
    - Tömegspektrometria
    - Kromatográfia
    - Felületi plazmon rezonancia (SPR)
  - Korlát
    - $\Delta H$  hőmérséklet függése
    - Extrapoláció ( $\Delta S: 1/T=0$ )



8

## Fehérje-ligandum kötődés „lépései”



9

## Kötődés kvalitatív termodinamikája

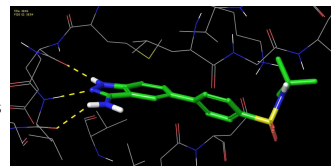
- Deszolvatáció (ligandum+fehérje)
  - kedvező  $\Delta S$  (vízszerkezet változás)
  - kedvezőtlen  $\Delta H$
- Konformáció változás (ligandum+fehérje)
  - kedvezőtlen  $\Delta H$  (kötés előtt optimális)
- Fehérje-ligandum kölcsönhatás
  - kedvezőtlen  $\Delta S$  (korlátozott mozgás)
  - kedvező  $\Delta H$  (poláris és van der Waals kölcsönhatások)

$\Delta G$  több ellentétes hatású tag összege

10

## Kötődés kvalitatív termodinamikája

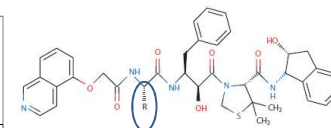
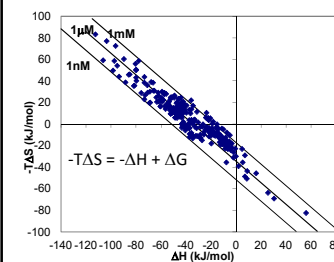
- $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  szerkezeti elemekhez rendelése elvileg problémás
  - Additivitás korlátozott
    - $\Delta H$  additivitás jó közelítés
    - $\Delta S$  additivitása rossz közelítés
- $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  tényleges lépésekhez rendelhető - állapotfüggvények



11

## 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	$\Delta G$	$\Delta H$	$-T\Delta S$
-S-CH <sub>3</sub>	-14.87(9)	-8.2(2)	-6.67(9)
-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-14.6(2)	-12.1(6)	-2.5(2)

Ann. Rev. Biophys. 2013, 42:121-42

Korlát  $\Delta G$  változtatásában

12

## Hidrofób effektus

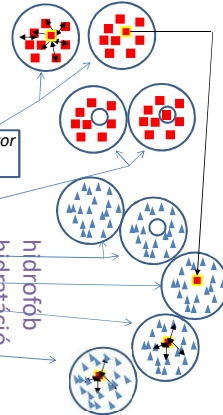
- Hidrofób effektus:

Apoláris vegyület átvitele apoláris oldatából vízbe  
(szénhidrogén → vízbe)

*Analogia (inverz): 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

**$\Delta G$  pozitív**



13

## Hidrofób effektus

- Hidrofób effektus:

$\Delta G$  nő

20°C:  $\Delta H$  (kedvező) és  $T\Delta S$  (kedvezőtlen) csökken;

$T\Delta S$  változás dominál

Magasabb T –  $\Delta G$  alig változik, de

$\Delta H$  nő és dominál – energetikailag kedvezőtlen  
(kölcsönhatást feláldoz a rendezetlenség növeléséért)

– Magyarázat: hidrofób hidratáció lépésire koncentrálnál

14

## Hidrofób hidratáció

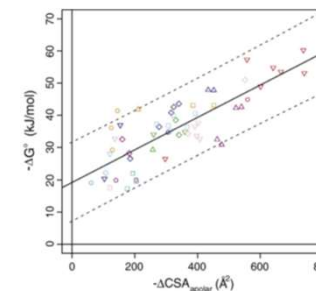
- Kulcstényezők az entrópia csökkenéshez:

- 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  $\Delta H$  és  $T\Delta S$  változásért?
- Nincsen általános érvényű kvantitatív modell!

15

## 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

16

## Affinitás és molekula méret

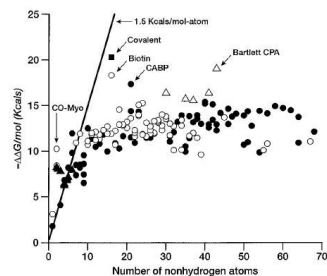


FIG. 1. Free energy of binding (in kcal/mol) for ligands and enzyme inhibitors plotted as a function of the number of nonhydrogen atoms in the ligand. See Table 1. A line with slope of 1.5 kcal/mol and an intercept of 0 is included as a visual aid to analysis.  $\Delta$ , Metal ions or metalloenzymes;  $\triangle$ , 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 az elérhető kötődési szabadentalpiát
  - $\Delta G_{\max}$  – 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



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 –  $\mu$ 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

## Erőtér

- Molekula mechanika
  - „Klasszikus”
  - Egyszerű, gyorsan számítható
  - Paramétereket tartalmaz
    - a paraméter 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

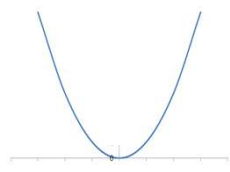
intermolekuláris

26

## Kötésnyújtási energia

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

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

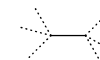


$r_0$  környezetében jó  
 $k$  és  $r_0$  atomoktól függő paraméterek

27

## Kötésnyújtási energia - paraméterek

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



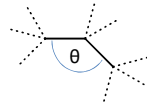
general class	atom type1	description
hydrogen types		
HA	H	amide or imine hydrogen
HC	H	explicit hydrogen attached to carbon
HO	H	hydrogen on hydroxy oxygen
HS	H	hydrogen attached to sulfur
HW	H	hydrogen on water
HA	H	amide hydrogen in H-bond
HC	H	hydrogen of lysine or arginine (positively charged)
all other carbon types		
CA	C	sp <sup>2</sup> carbon: carbon and aromatic carbon with hydroxy substituent or lysine
CA	C	sp <sup>2</sup> aromatic carbon in 5-membered ring with 1 substituent
CB	C	sp <sup>2</sup> aromatic carbon at junction between 5- and 6-membered rings
CC	C	sp <sup>2</sup> aromatic carbon in 5-membered ring with 1 substituent and next to a nitrogen
CK	C	sp <sup>2</sup> aromatic carbon in 5-membered ring between 2 nitrogens and bonded to 1 hydrogen (in purine)
CM	C	sp <sup>2</sup> amine and C that are substituted
CO	C	sp <sup>2</sup> aromatic junction carbon in between 5- and 6-membered rings
CO	C	sp <sup>2</sup> carbon in 6-membered ring of purine between 2 H-bonding and bonded to 1 hydrogen
CR	C	sp <sup>2</sup> aromatic carbon in 5-membered ring between 2 nitrogens and bonded to 1 H (in imidazole)
CT	C	sp <sup>2</sup> carbon with 4 explicit substituents
CV	C	sp <sup>2</sup> aromatic carbon in 5-membered ring bonded to 1 H and bonded to an explicit hydrogen
CV	C	sp <sup>2</sup> aromatic carbon in 5-membered ring bonded to 1 H and bonded to an explicit hydrogen
CV	C	sp <sup>2</sup> aromatic carbon in 5-membered ring with 1 substituent

Bond Stretching Potential Parameters			
Bond	used for	K, kcal mol <sup>-1</sup> Å <sup>-2</sup>	R <sub>0</sub> , Å
CT-CT	BMT, EMT	310.0	1.526
CT-H1	BMT, EMT	340.0	1.090
CT-HC	BMT, EMT	340.0	1.090
CT-NA	BMT, EMT	337.0	1.475
CR-H5	BMT, EMT	367.0	1.080
CR-NA	BMT, EMT	477.0	1.343
CW-H4	BMT, EMT	367.0	1.080
CW-NA	BMT, EMT	427.0	1.381
CW-CW	BMT, EMT	549.0	1.350
AL-CL	TF4	116.1	2.170
P-F	PF4	260.3	1.646
NN-ON	NO2	300.0	1.260

28

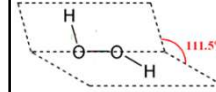
## Kötéshajlítás

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



29

## Torziós/dihedrális szög

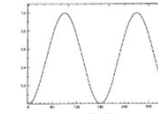
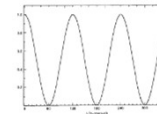


$$E_{tors} = \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \phi_0)]$$

$V_n$  – gát magasság  
n - periodicitás

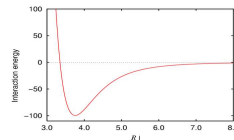
Dihedral angle (atom types)				$V_n$ , kcal/mol	n	$\phi_0$	comments
C	CT1	NH1	C	0.2000	1	180.00	! backbone phi
NH1	C	CT1	NH1	0.6000	1	0.00	! backbone ksi
CT1	C	NH1	CT1	1.6000	1	0.00	! backbone omega
CA	CA	CA	CA	3.1000	2	180.00	! Phe side chain
H	OH1	CT2	CT1	0.4200	3	0.00	! Ser side chain

~15000 paraméter



30

## van der Waals kölcsönhatás



Közel: taszító;  $\exp(-r)$ ;  $r^{-12}$

Közepes: vonzó;  $r^{-6}$ ; diszperzió

Távoli: eltűnik

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

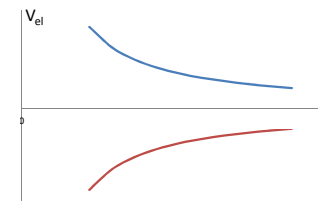
$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}$$

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



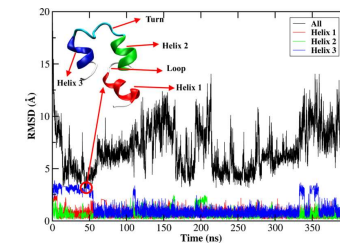
## MM paraméterek meghatározása

- Kvantum mechanika számítások
- Kísérleti adatok
- Kiterjesztés analógia alapján
- Validálás: kísérleti eredmények
  - Makromolekula szerkezet
  - NMR adatok
  - Van der Waals komplexek szerkezete és energiája
- 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
- ...



RMSDs of backbone atoms from the native structure as a function of MD simulation time

Duan J Mol Model 2014;20,2195

## 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  $\delta t$  biokémiai rendszerek szimulációjánál: 1-4 fs

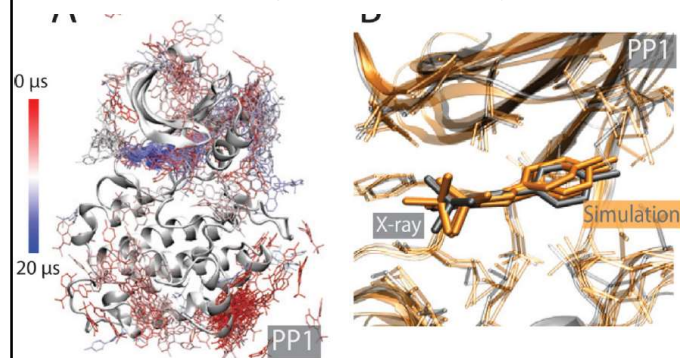
37

## Alkalmazások

### 1. dinamika

38

## Példa – ligandum kötés folyamata



PP1 molekula 15μs szimuláció alatt megtalálja a Src kináz kötőzsebét

JACS 2011 133 9181

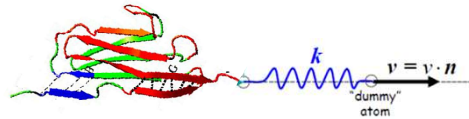
40

## MD alkalmazások

### 2. erővezérelt molekula dinamika

## Erővezérelt MD

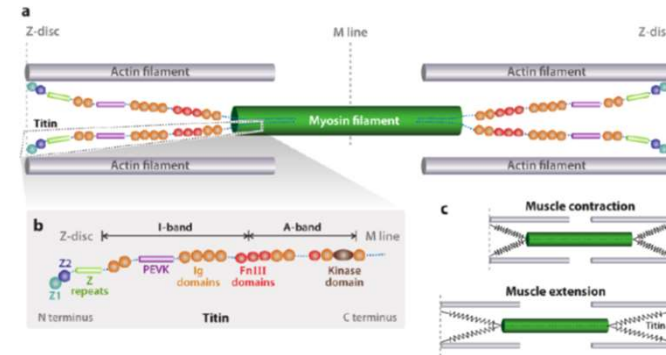
- Állandó sebességű húzás



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

- Állandó erővel való húzás

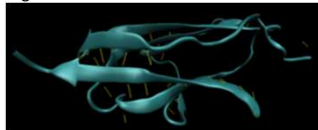
## Titin szerkezet - funkció



42

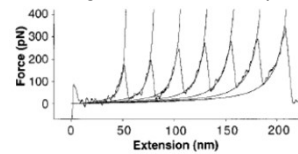
## Kigombolyodás és erő

titin Ig27 domén



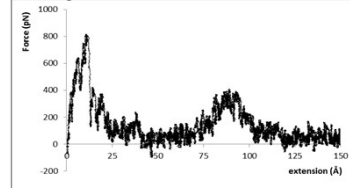
Állandó sebességű húzás

AFM - több Ig27 doménból álló fehérje

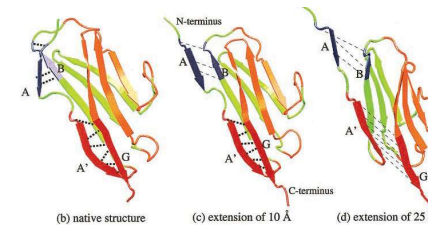


Rief et al. (1997 Science 276 1109)

SMD - Ig27 domén

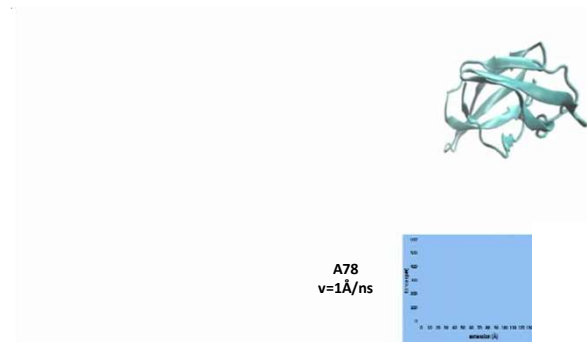


## Kigombolyodás és szerkezet



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