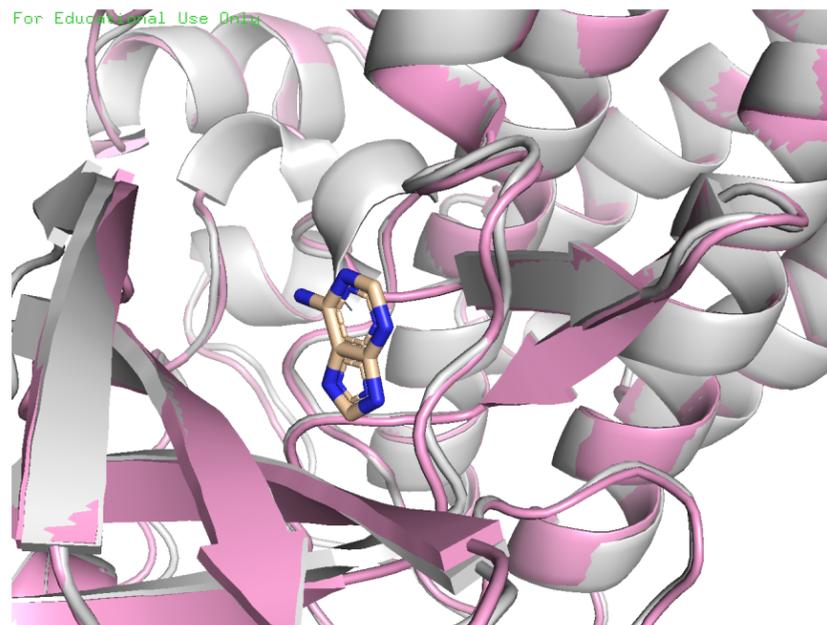


Практикум 7

Связывание лигандов. Карманы связывания. Индукционное соответствие

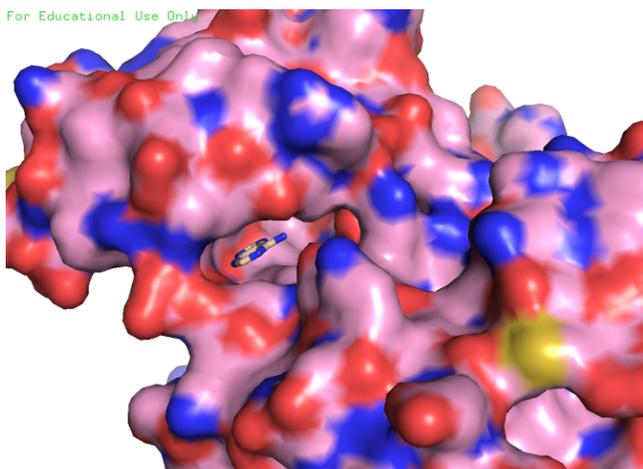
Мне дано два PDB файла, соответствующие свободной и связанной с лигандом форме некоторого белка (другие метаданные не даны). Лиганд - аденин.

Задание 1. Изменения

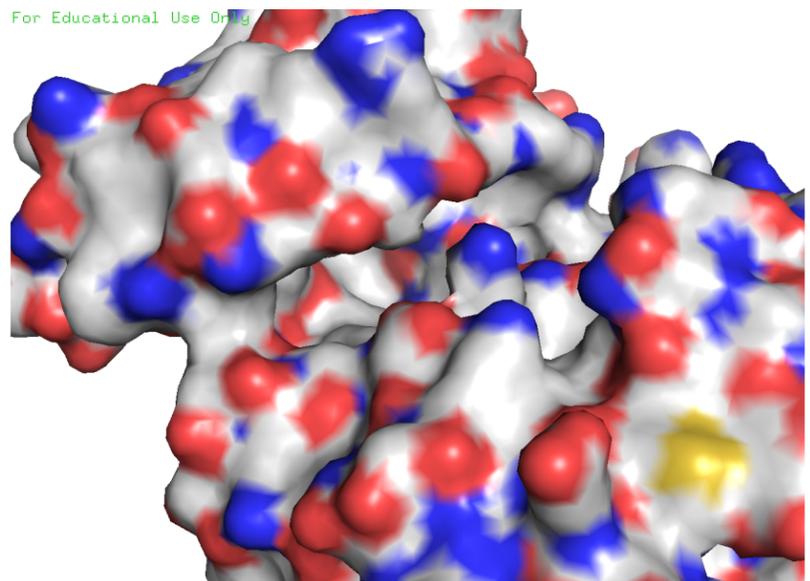


Вторичная структура в районе кармана связывания связанной (розовый) и свободной формы белка (серый).

На уровне вторичной структуры различия между связанной и свободной формами белка практически не заметны.

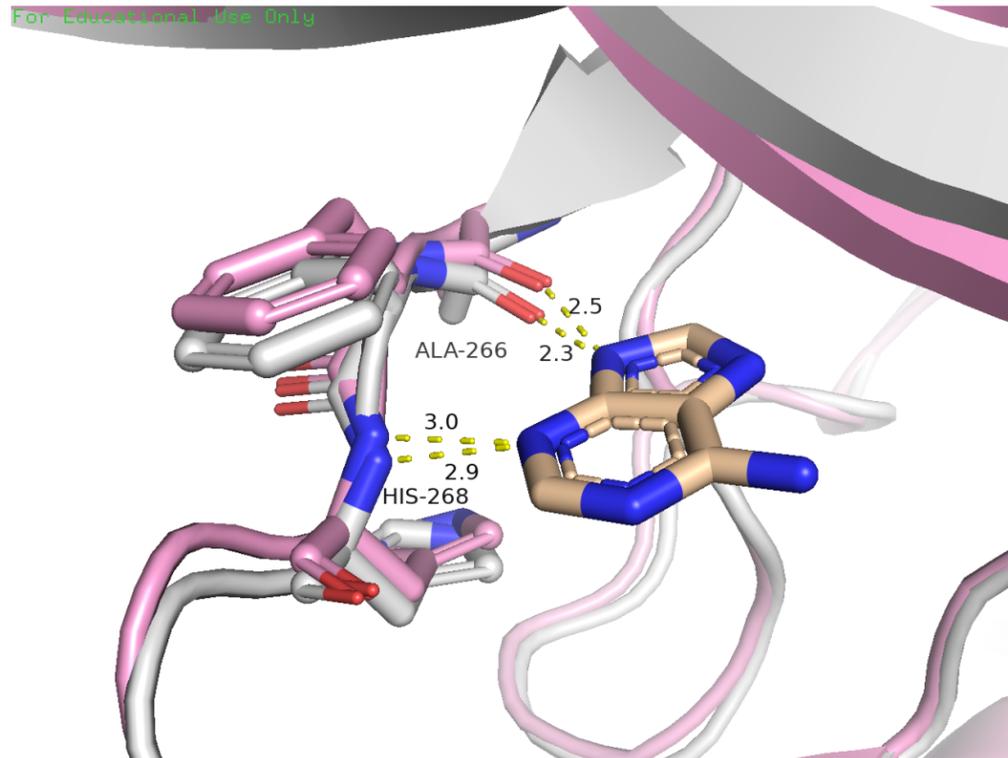


Карман связывания связанной формы



Карман связывания свободной формы

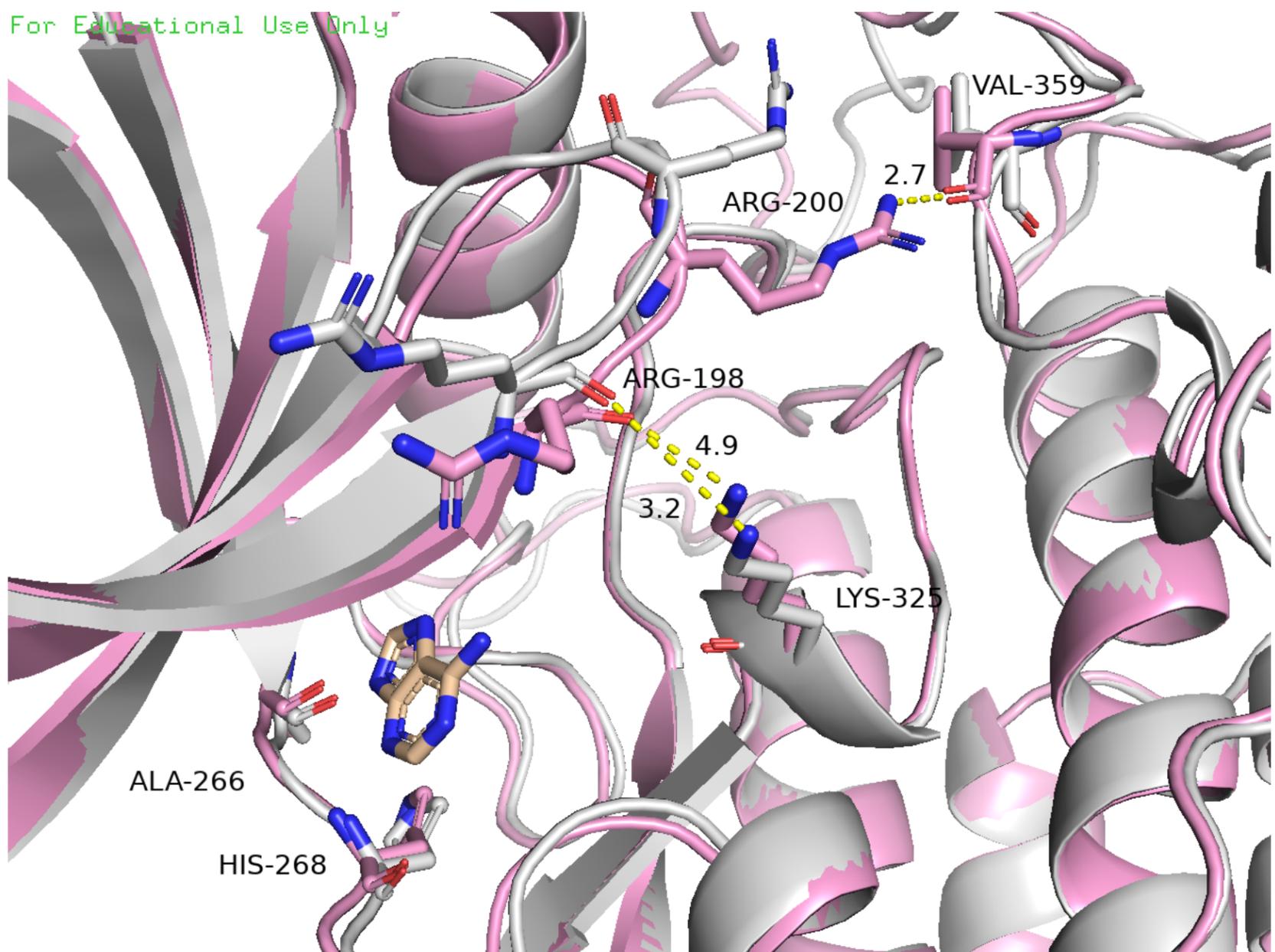
При визуализации поверхности фермента можно заметить, что при связывании аденина карман связывания немного смыкается.



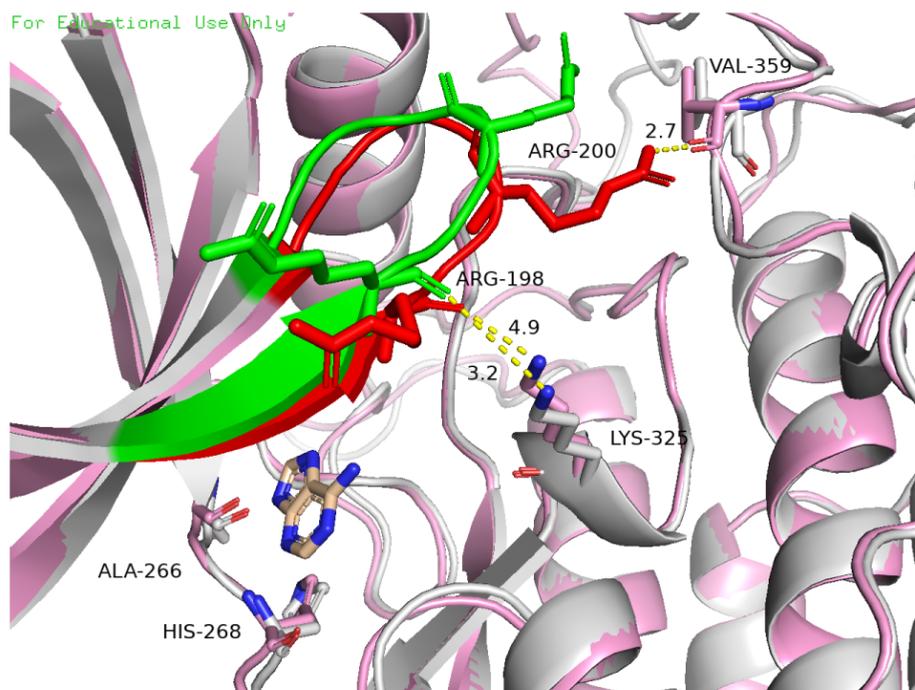
Сайт, связанный с аденином. Связь, находящаяся сверху и подписанная сверху, в обоих случаях относится к связанной форме фермента, расстояние снизу (не связь, разумеется) - к свободной форме.

Аденин связан через азоты N9 и N3 с His268 и Ala266, соответственно. Аминогруппа аденина, что интересно, в связывании не участвует. Взаимодействующие с лигандом остатки почти не меняют положение при связывании лиганда.

Можно сделать вывод, что связывание с лигандом в данном случае определяется не положением остатков в сайте связывания аденина, а конформацией кармана связывания. Так, важную роль играет движение петли 195-203: в связанной конформации в отличие от свободной наблюдаются две дополнительные водородные связи: между кислородом остова Arg198 и Lys325 и кислородом остова Val259 и Arg200. В случае с парой Arg198-Lys325 в связанной конформации расстояние сокращается от 4.9 Å до 3.2 Å. В случае с парой Val259-Arg200 обе аминокислоты радикально изменяют положение (хорошо видно на рисунке).



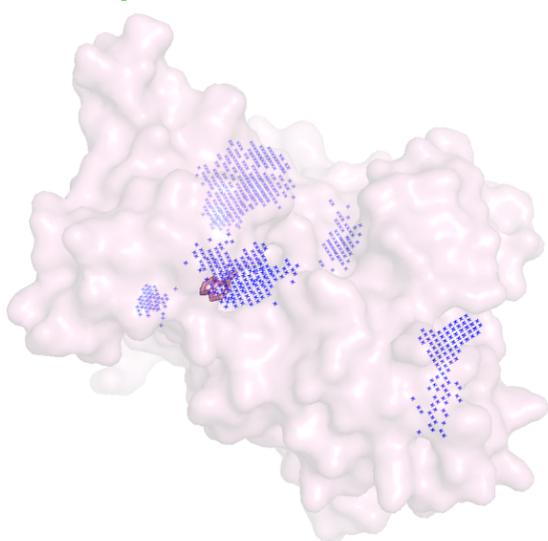
Участок петли 195-203 относительно сайта связывания аргинина.



Тот же ракурс. Для наглядности петля 195-203 покрашена в зеленый для свободной конформации и в красный для связанной конформации.

Полости, POCASA

For Educational Use Only



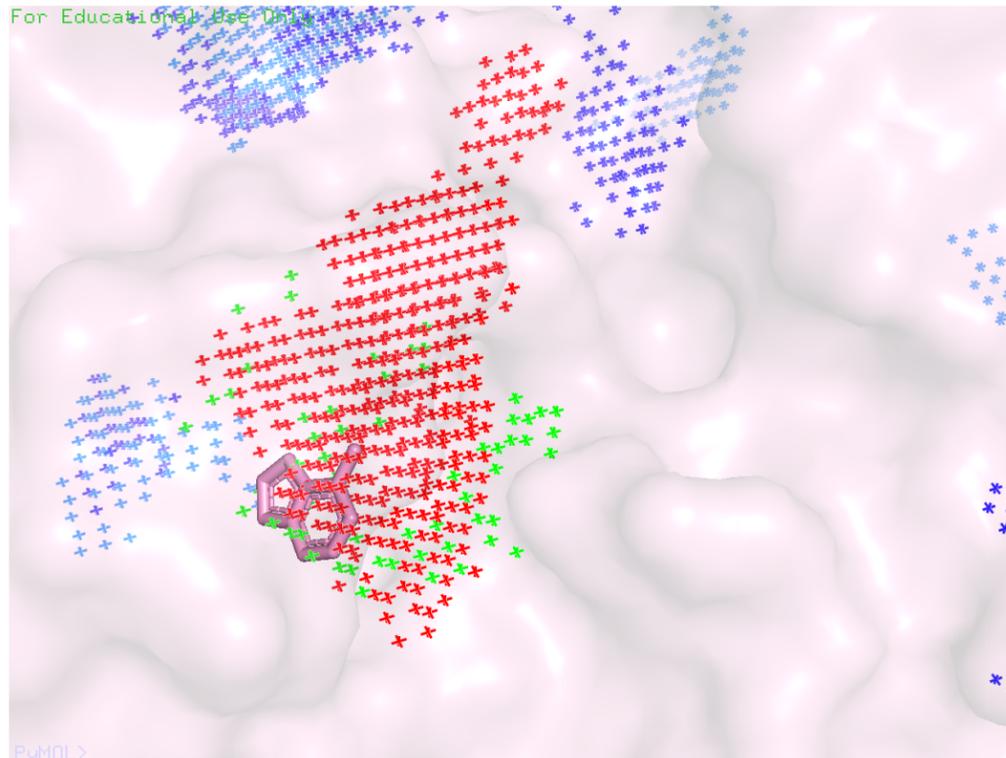
For Educational Use Only



PyMOL>_

Для связанной формы белка (лиганд был предварительно удален) сервис POCASA нашел 4 кармана и одну полость, для свободной - 5 карманов.

свободная	связанная	
386	192	active site
267	285	
60	56	
66	-	
38	-	
-	118	
-	66	



Детализация карманов в области кармана связывания лиганда, найденных POCASA для связанной (зеленый) и свободной (красный) форм фермента.

Как и предполагалось на основе общего вида поверхностей, объем кармана связывания лиганда в свободной конформации больше, чем в связанной.

"Стягивание" остатков белка лигандом, видимо, происходит, однако, что для меня неожиданно, проявляется не для непосредственно взаимодействующих с лигандом остатков (их расстояние до лиганда даже незначительно возрастает). Наоборот, стягиваются весьма отдаленные от сайта связывания аденина остатки. Возможно, такой эффект нельзя назвать именно стягиванием, и он происходит из-за общих конформационных изменений (хотя по вторичным структурам связанная и свободная формы хорошо сопоставимы). Возможно, лиганд "стягивает" остатки по дороге к сайту связывания аденина.

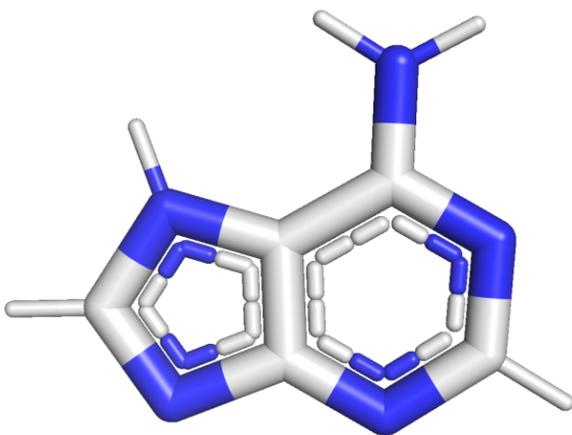
Задание 2. Протонирование, подготовка к докингу

Докинг – это метод молекулярного моделирования, применяющийся для определения позы и конформации лиганда в кармане связывания белка.

1) Подготавливаем протонированную структуру свободной формы белка с помощью веб-сервиса PDB2PQR. Скачиваем файл с разрешением `rqf`.

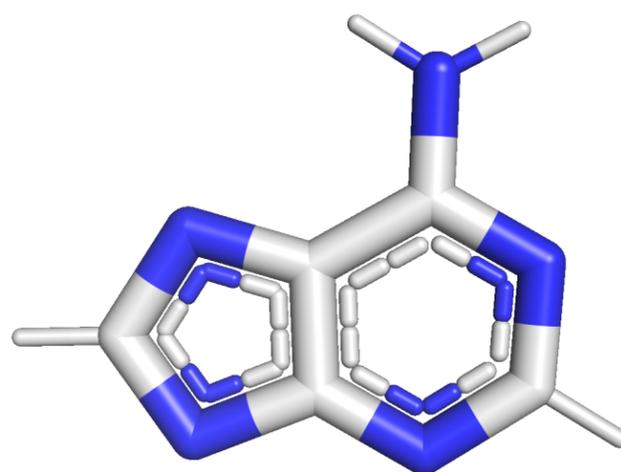
2) Подготавливаем протонированную структуру лиганда с помощью программы SPORES на кодомо или с помощью `h_add` в `pymol`.

For Educational Use Only



Аденин с водородами, добавленными SPORES

For Educational Use Only



`h_add pymol`

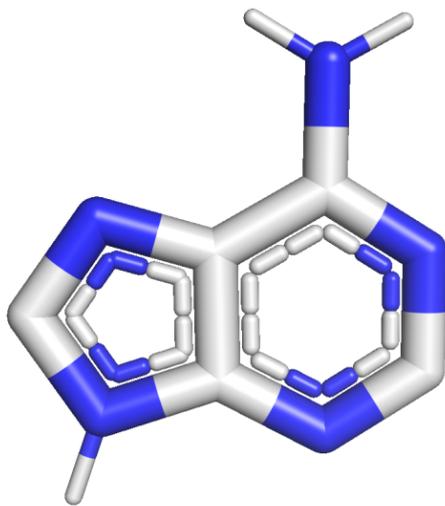
SPORES и `h_add` не угадали водороды для азота N9.



Положение водородов в аденине согласно сайту go.drugbank.com

Фиксированного варианта протонирования у этой молекулы не может быть из-за ароматичности. По наличию рядом кислорода остова Ala266 можно судить о том, что водород лучше расположить в связи с атомом N9.

For Educational Use Only

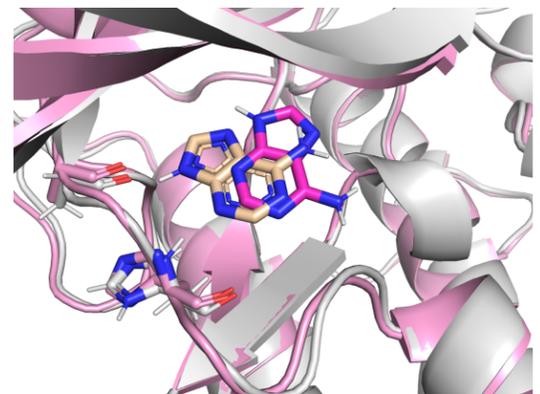
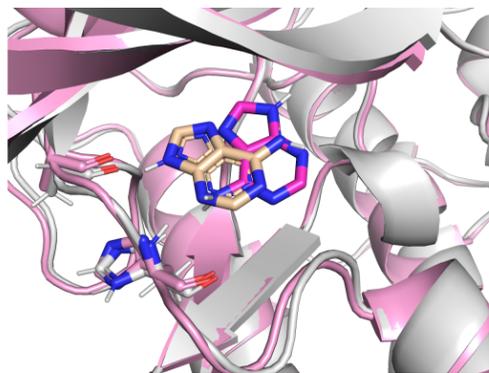
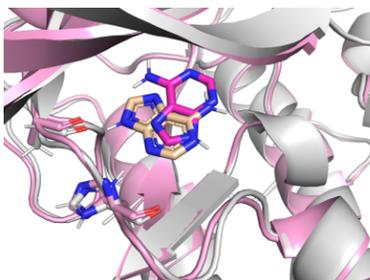


Структура аденина, использовавшегося для докинга.

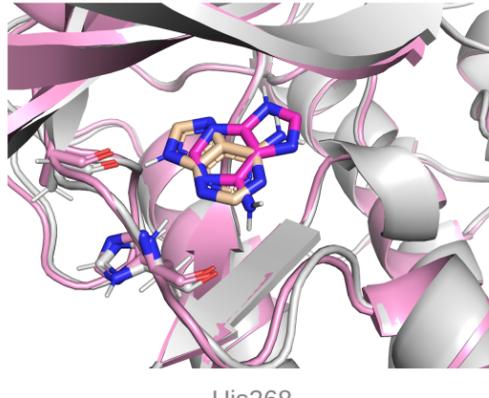
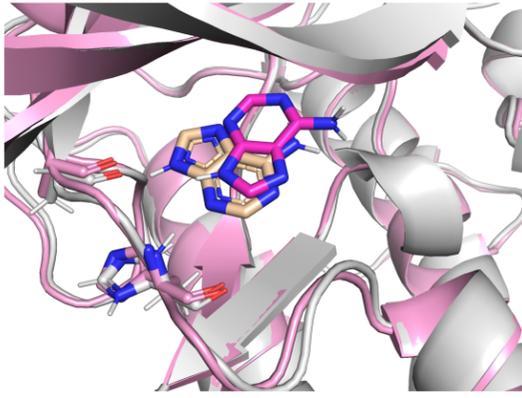
Задание 3. Докинг

Будем генерировать гипотезы о расположении лиганда при помощи инструмента для докинга Autodock Vina – [Webina](#).

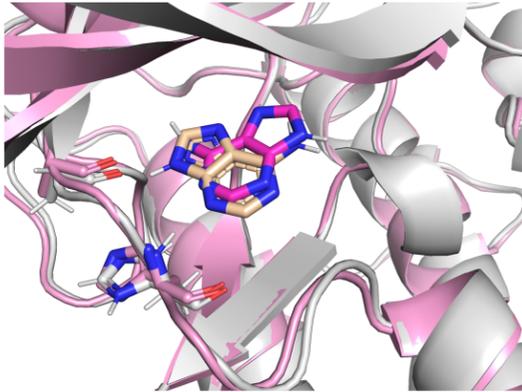
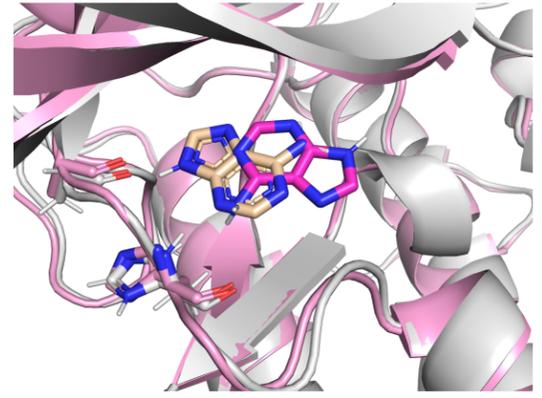
Было найдено 9 возможных положений. Все они пространственно пересекаются с истинным положением лиганда, однако ни одно из предполагаемых положений не совпадает с истинным и при последовательной визуализации видно, что предполагаемые положения как бы вращаются вокруг атома C2 аденина. Телесный цвет - истинное положение лиганда, маджента - предсказанное. Подписи к рисункам - взаимодействия, найденные при помощи [PoseView](#). Отсутствие подписи - портал не нашел взаимодействий.



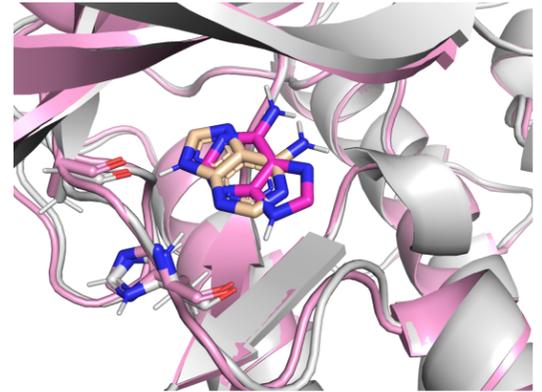
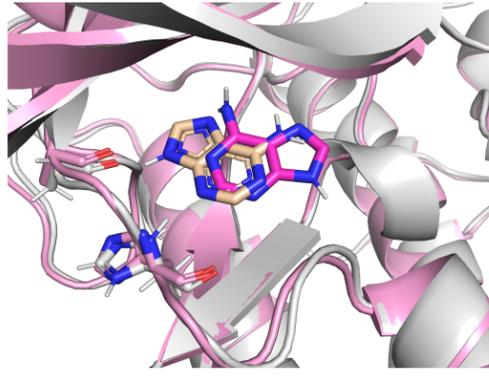
His268



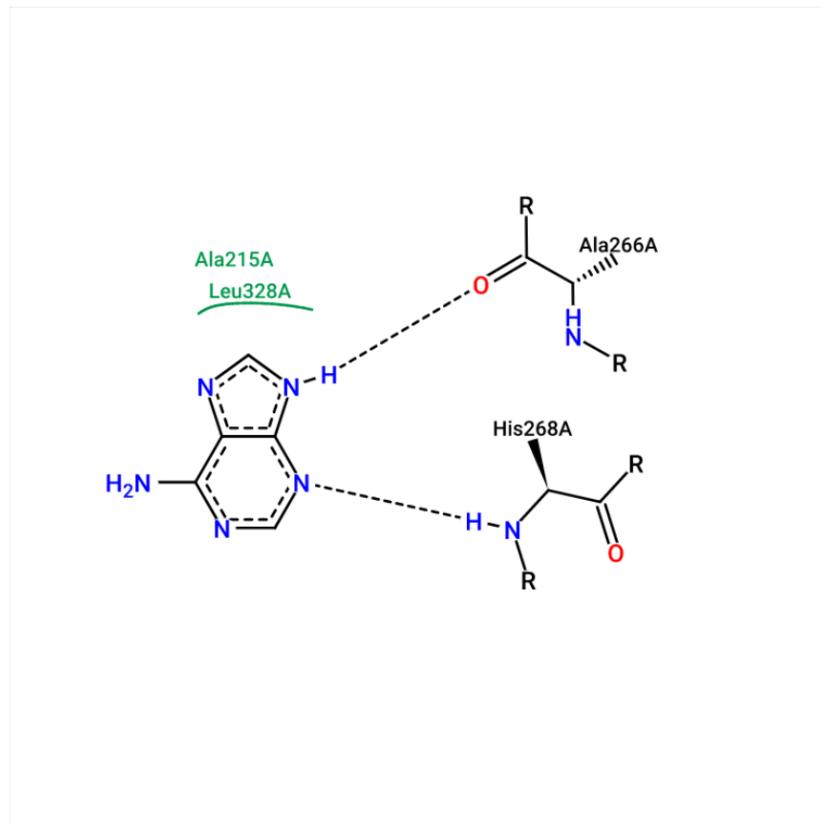
His268



Ala266

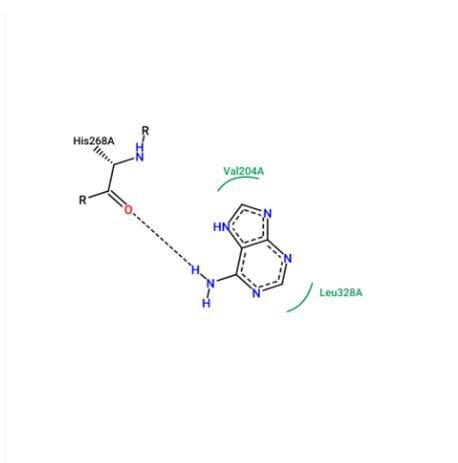


His268

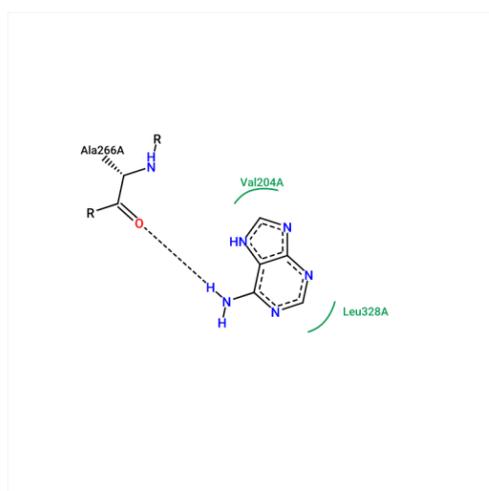


Истинная поза лиганда в связанной форме белка

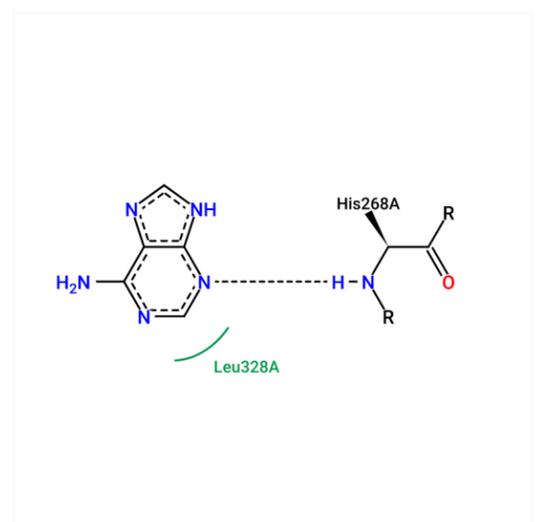
Взаимодействия, найденные PoseView:



2+5



7



9

Интересно, что взаимодействия обозначены именно для тех аминокислот (Ala266 и His268), для которых выше указывалось образование водородных связей в связанной форме.

В первых двух случаях взаимодействие происходит через аминогруппу аденина, чего в связанной форме, как указывалось выше, нет. Девятое же предположение совпало по характеру взаимодействия с His268 со связанной формой белка, однако второе взаимодействие с Ala266 не было найдено.

Если принять что докинг - это запечатление начала связывания лиганда, то можно сделать предположение о том, что молекула аденина заходит в гидрофобный карман белка, колеблется там (возможно, поэтому результаты докинга такие не однородные и не совпадают с информацией из кристалла). И в итоге этот процесс заканчивается образованием двух водородных связей с Ala266 и His268 и экспонированием аминогруппы аденина в раствор.