

Связывание лигандов. Карманы связывания. Индуцированное соответствие

Задание 1. Изменения.

Для одного и того же белка изучались две структуры: связанная с лигандом и свободная, целью было изучить к каким изменениям приводит связывание с лигандом. Белок состоит из большого количества длинных альфа-спиралей, что говорит о том, что он, скорее всего, трансмембранный. Рассмотрим как меняется структура при взаимодействии с лигандом.

Можно достаточно хорошо отследить «закрытие» кармана – для связанной с лигандом структуры многие альфа-спирали «надламываются», наоборот «выпрямляются» или просто немного меняют свое положение, чтобы произошло сближение участков белка вокруг лиганда.

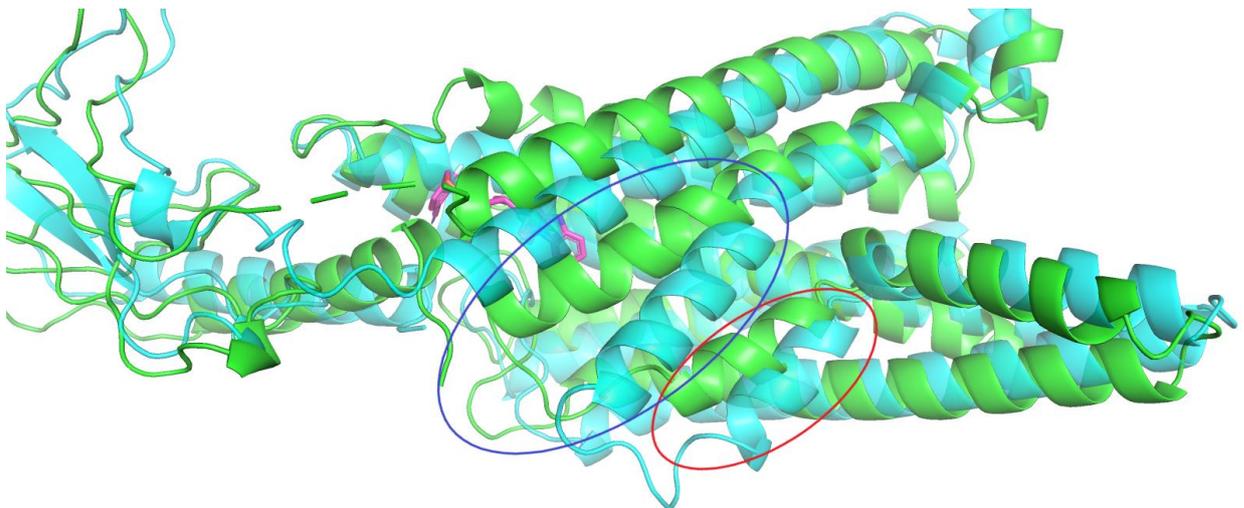


Рисунок 1. Изменения в положении альфа-спиралей при связывании с лигандом. Ракурс 1. Зеленым цветом изображена связанная форма, цианом - свободная.

На рисунке 1 альфа-спираль, обведенная синим, выпрямилась, обведенная красным – поменяла свое положение.

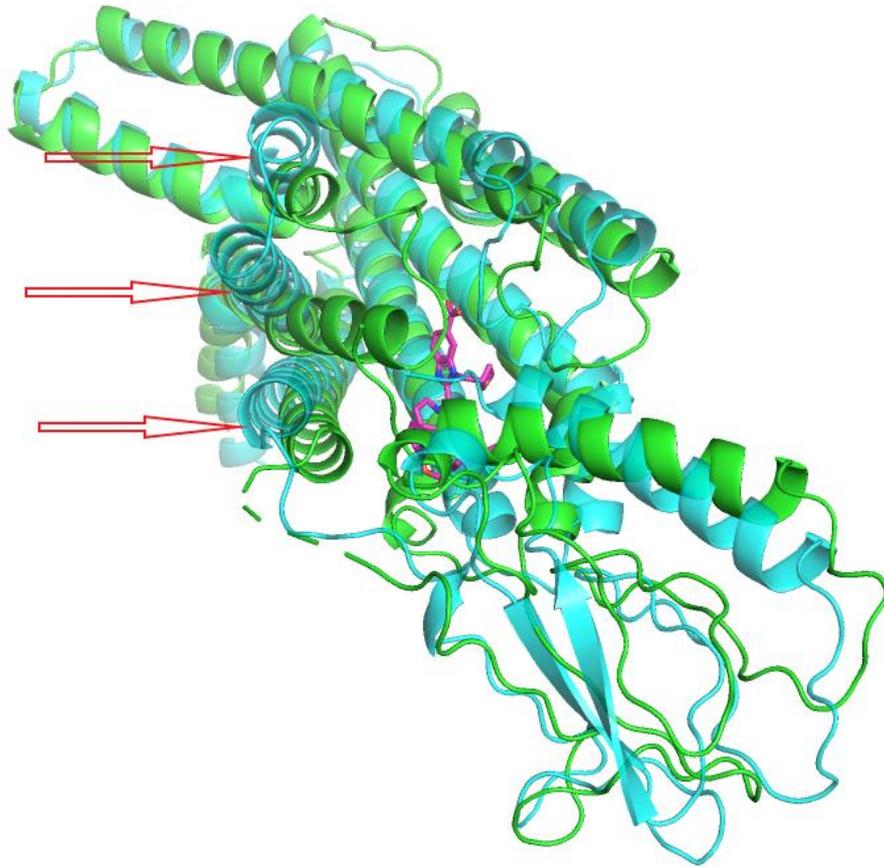


Рисунок 2 Изменения в положении альфа-спиралей при связывании с лигандом. Ракурс 2. Зеленым цветом изображена связанная форма, цианом - свободная.

На рисунке 2 видно, что альфаспиралы изогнулись, сблизившись вокруг лиганда.

Удобно следить за доступностью кармана при помощи отображения surface. На следующих двух парах картинок хорошо видно, как белок переходит в закрытую конформацию и лиганд оказывается в закрытом кармане внутри белка.

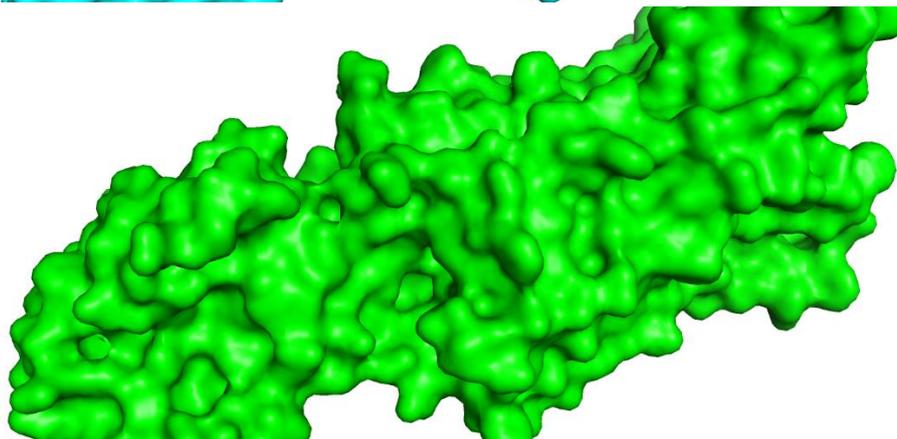
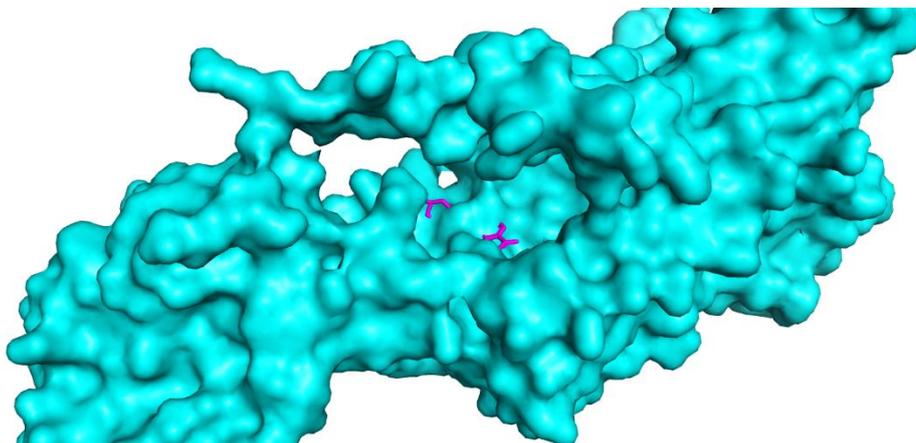


Рисунок 3. "Закрытие" кармана. Ракурс 1.

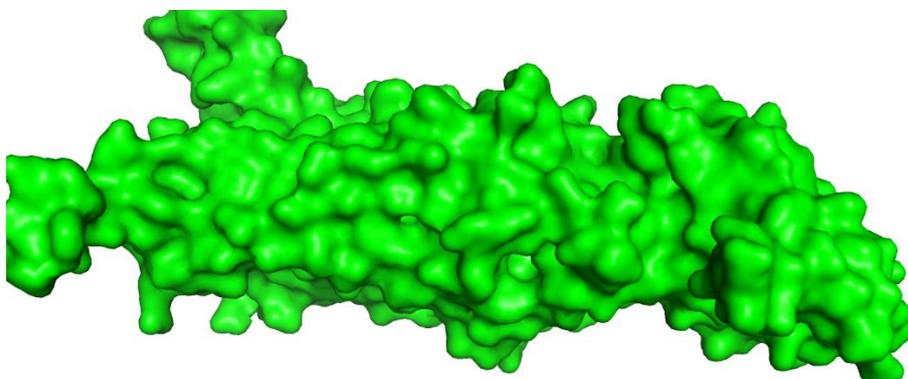
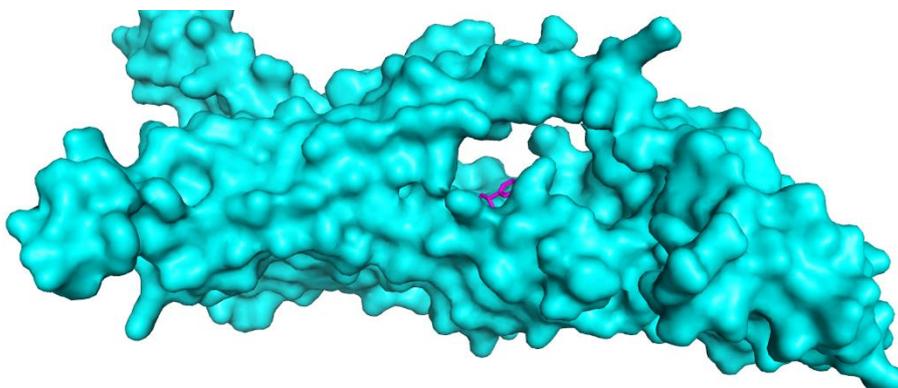


Рисунок 4. Закрытие кармана. Ракурс 2

Подробнее рассмотрим некоторые изменения на уровне взаимодействия отдельных аминокислот.

Например, две альфа-спирали изменили свое положение и сблизились, закрывая карман, и расположенные на их концах серин 31 и глутамат 138 зафиксировали это положение, образовав водородную связь.

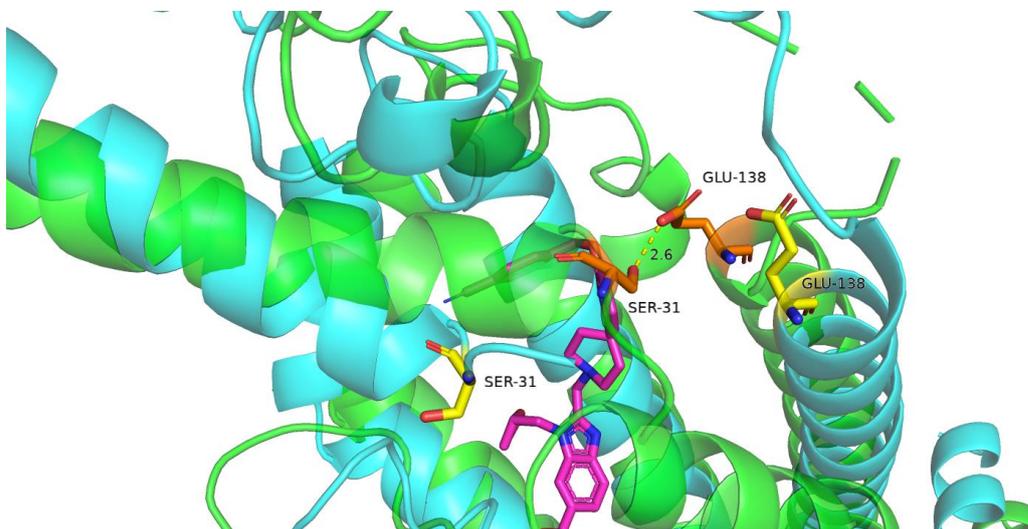


Рисунок 5. Образование водородной связи между серином 31 и глутаматом 138 при закрытии кармана. В открытой конформации эти аминокислоты покрашены в желтый, в закрытый - в оранжевый.

Похожая ситуация происходит и с другой стороны кармана. Тут находящийся на конце альфа-спирали аргинин 380 при закрытии образует водородную связь с расположенном в петле аргинином 299, стабилизируя новое положение альфа-спирали.

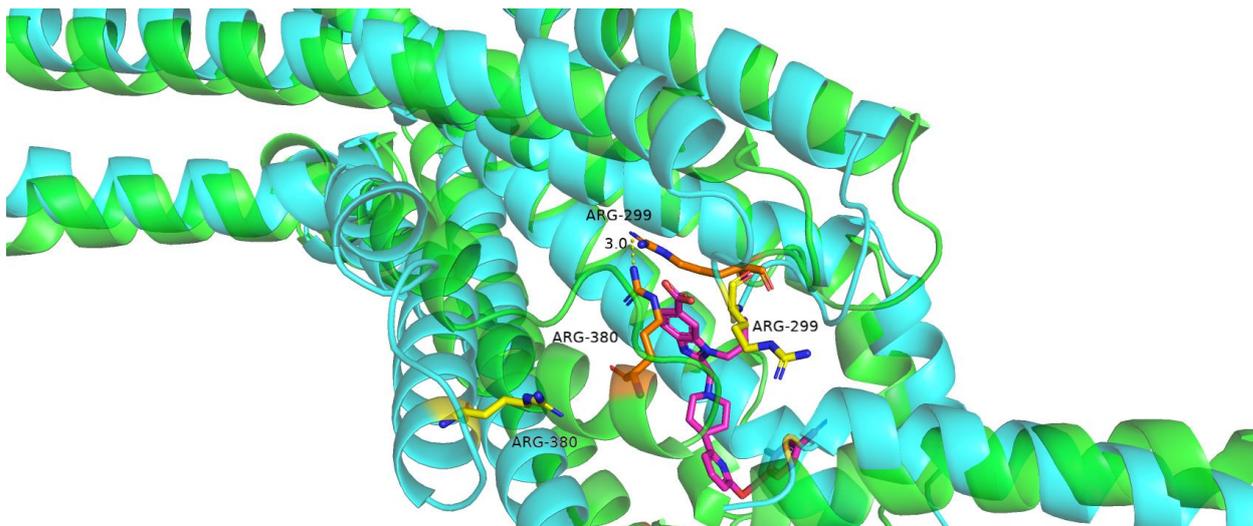


Рисунок 6. Образование водородной связи между аргинином 380 и аргинином 299 при закрытии кармана. В открытой конформации эти аминокислоты покрашены в желтый, в закрытый - в оранжевый.

Также при стяжении тех же фрагментов альфа-спиралей происходит дополнительная стабилизация за счет гидрофобных взаимодействий, например между фенилаланином 381 и триптофаном 33:

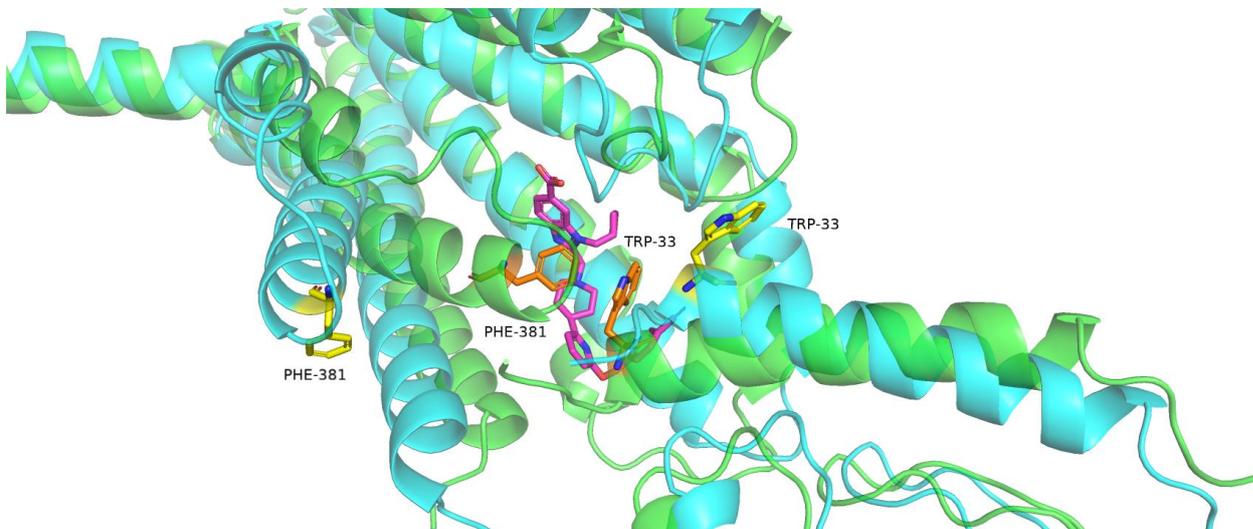


Рисунок 7. Гидрофобные взаимодействия между триптофаном 33 и фенилаланином 381 при закрытии кармана. В открытой конформации эти аминокислоты покрашены в желтый, в закрытой - в оранжевый.

Далее проводился анализ карманов в структурах при помощи сервиса POCASA. Для этого сначала был сохранен файл с «закрытой» структурой, но без лиганда, а затем этот файл и файл с «открытой» структурой загружались на сайт и запускалась программа с параметрами по умолчанию.

Для структуры с «открытой» конформацией было найдено 6 карманов, в том числе самый большой карман – в котором будет связываться лиганд

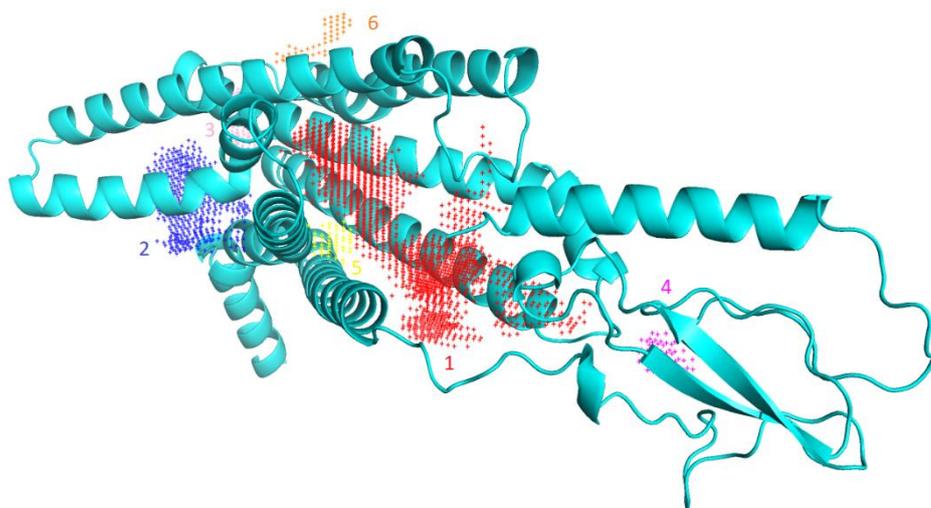


Рисунок 8. "Открытая" конформация. Карманы, обнаруженные при помощи POCASA, белок изображен в Cartoon

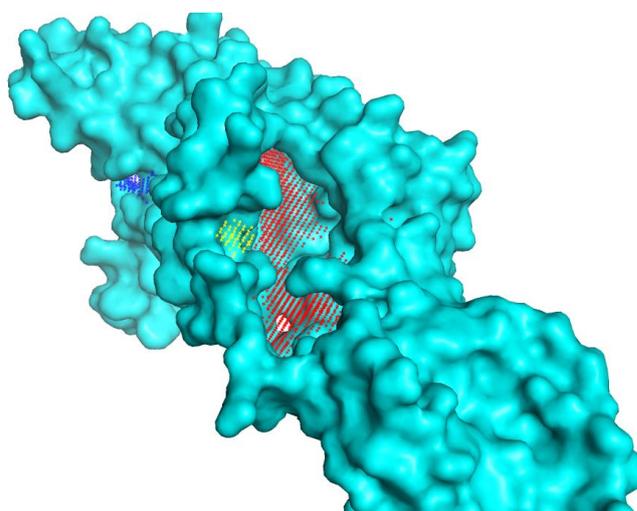


Рисунок 9. "Открытая" конформация. Карманы, обнаруженные при помощи POCASA, белок изображен в Surface

Параметры найденных карманов:

Номер кармана	Объем	«Глубина»
1	1543	4382
2	524	1248
3	118	388
4	63	148
5	50	121
6	50	115

Для «закрытой» конформации было найдено 5 карманов, также был найден карман, в котором связывается лиганд.

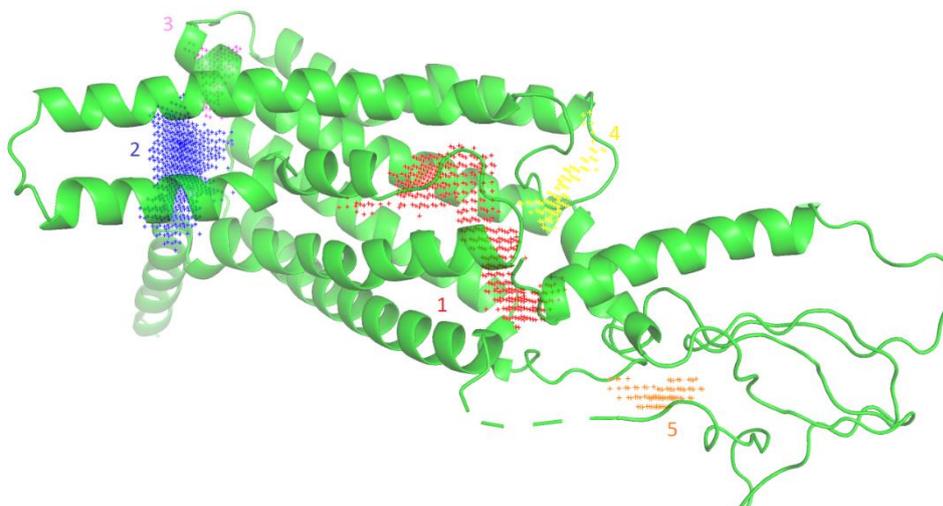


Рисунок 10. "Закрытая" конформация. Карманы, обнаруженные при помощи POCASA, белок изображен в Cartoon

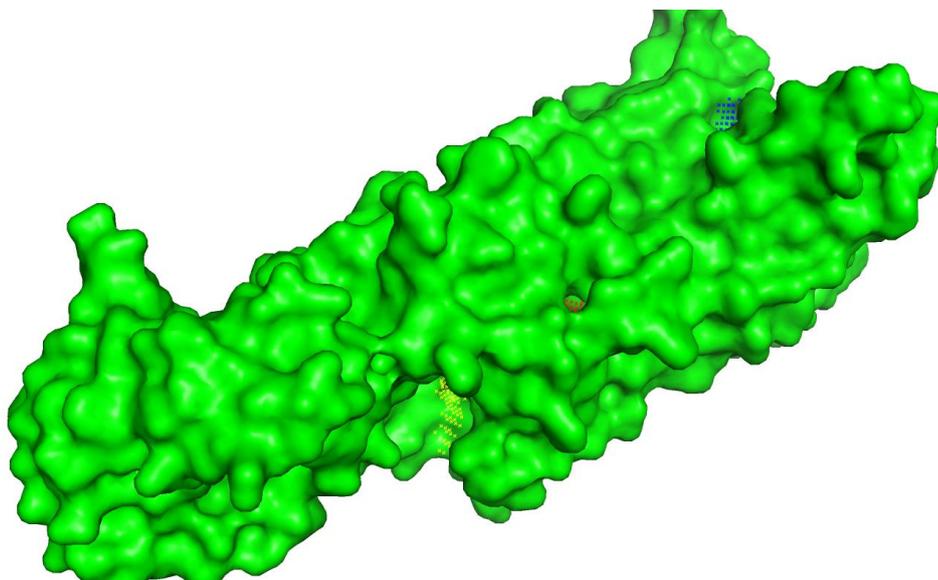


Рисунок 11. "Закрытая" конформация. Карманы, обнаруженные при помощи POCASA, белок изображен в Surface

Параметры найденных карманов:

Номер кармана	Объем	«Глубина»
1	438	4342
2	523	1433
3	102	269
4	92	214
5	90	212

Таким образом, карман связывания лиганда был успешно обнаружен программой в обоих случаях. При связывании объем кармана значительно (в 3-4 раза) уменьшается. Мне кажется, что это стягивание должно закрывать доступ в полость, а также приводить к изменениям в конформации, в результате которых изначально далеко расположенные остатки перемещаются ближе и дополнительно стабилизируют лиганд. На мой взгляд, «стягивание» должно происходить во время связывания, так как форма самого кармана и стабилизация лиганда взаимодействиями может обеспечиваться изначально далекими остатками, которые должны переместиться к лиганду с относительно больших расстояний.

Задание 2. Протонирование, подготовка к докингу

В этом задании было необходимо подготовить структуры – белок из структуры не связанной с лигандом и сам лиганд к докингу. Для этого необходимо добавить водороды в обе структуры.

Для протонирования белка я использовал сервис PDB2PQR. Для добавления водородов к лиганду я воспользовался программой SPORES.

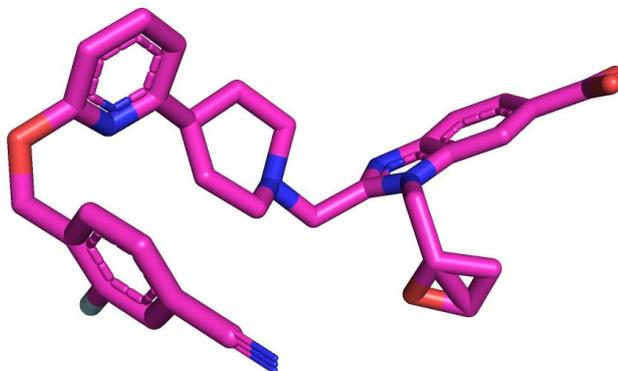


Рисунок 12. Лиганд до добавления водородов

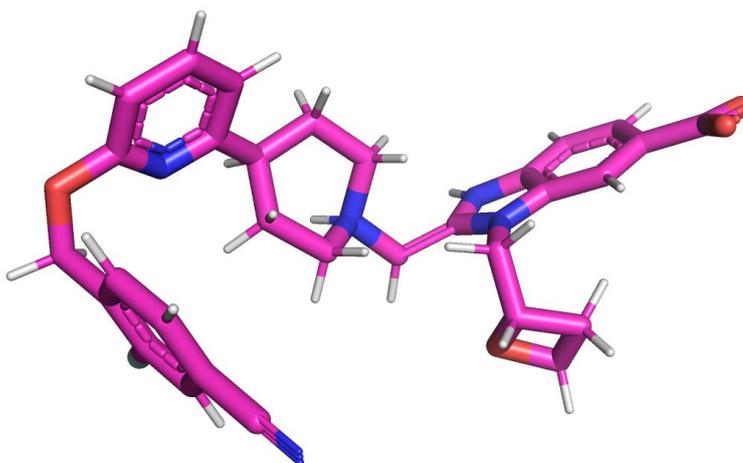


Рисунок 13. Лиганд после протонирования при помощи программы SPORES

Добавленные протоны выглядят хорошо, валентности соблюдены, углы выглядят адекватно.

Задание 3. Докинг.

Для докинга использовалась программа Webina. Ей были поданы на вход подготовленные ранее протонированные формы не связанного белка и лиганда. В качестве исходного состояния использовалось состояние лиганда

из связанной с белком структуры. Все остальные параметры были заданы по умолчанию. В результате получилось 9 возможных расположений лиганда.

Они вместе с лигандом из связанной с белком структуры представлены ниже:

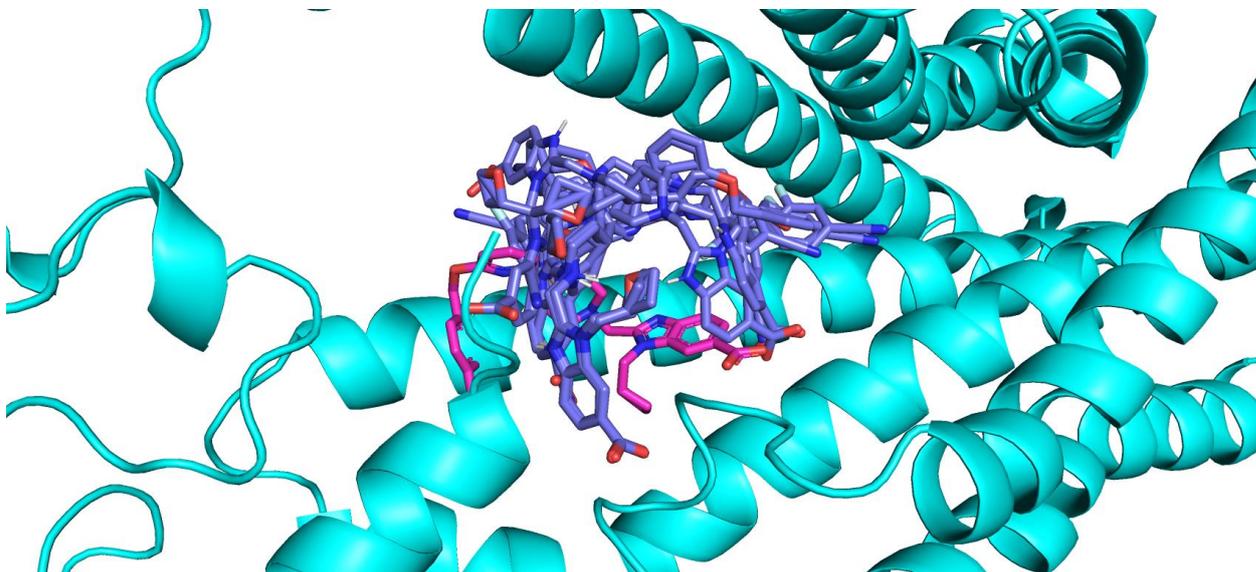


Рисунок 14. Положения лиганда относительно структуры "свободного" белка. Исходное положение лиганда окрашен в сиреневый, полученные в результате докинга - в синий.

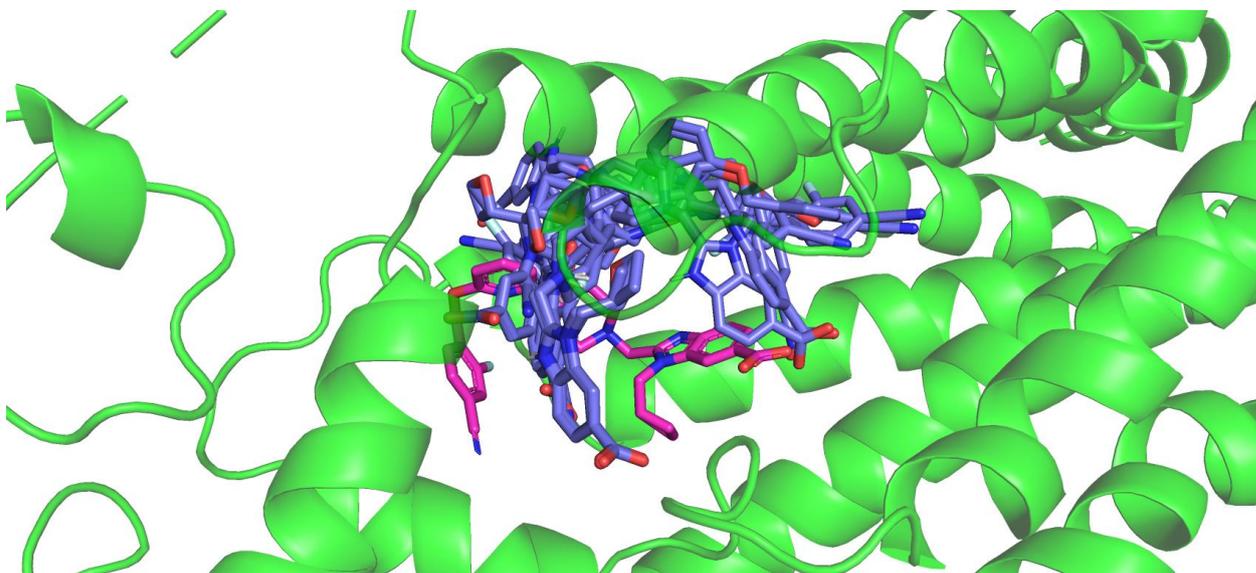


Рисунок 15. Положения лиганда относительно структуры "связанного" белка. Исходное положение лиганда окрашен в сиреневый, полученные в результате докинга - в синий.

Все предсказанные положения мало похожи на положение «связанного» лиганда. Заметно, что сам «связанный» лиганд перекрывается с одной из альфа-спиралей «свободного» белка, в то время как все предсказанные положения перекрываются с одной или двумя альфа-спиралями «связанного» белка. Молекула в исходном состоянии расположена немного

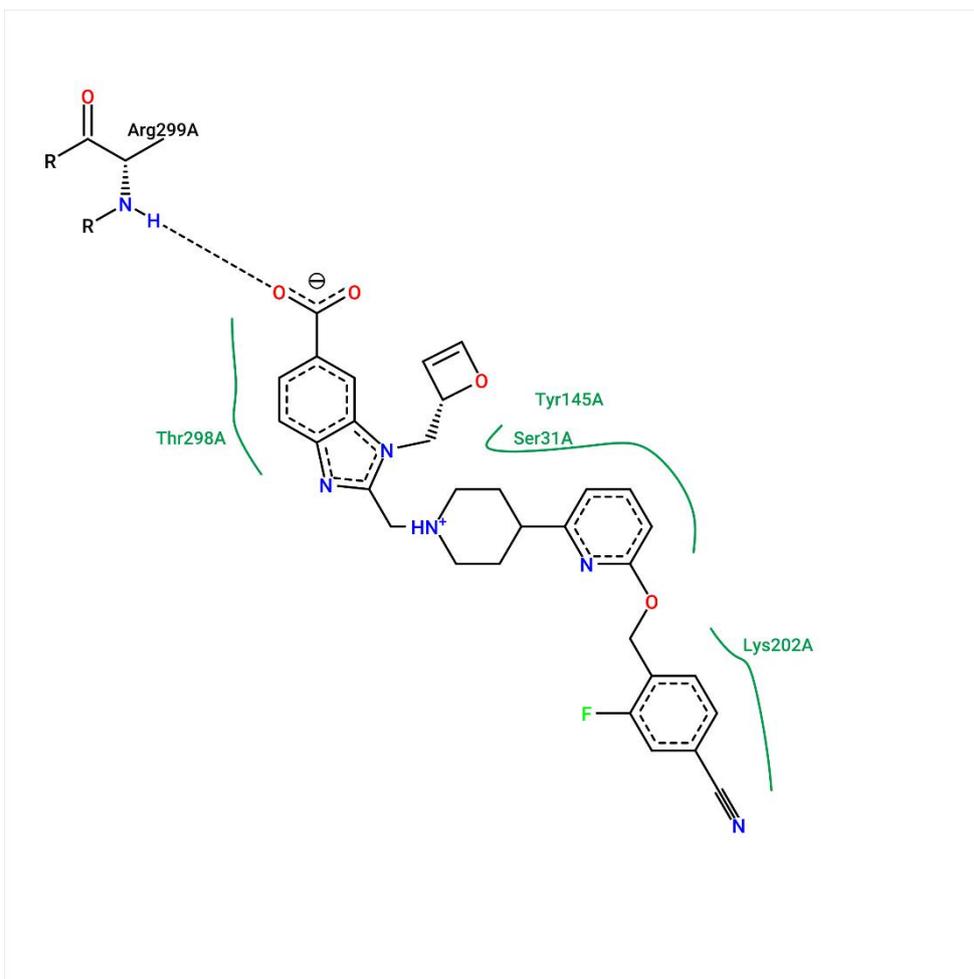


Рисунок 17. Диаграмма взаимодействий белка из "свободной" структуры с лигандом, положение которого предсказано программой Webina

На найденных диаграммах нет общих взаимодействий. Это может говорить о том, что в процессе связывания белок очень сильно подстраивается под лиганд, что также подтверждается рассмотренными в задании 1 примерами (например, обсуждалось перемещение остатков Trp 33 и Phe381, которые в связанной форме стабилизируют лиганд гидрофобными взаимодействиями, а в несвязанной располагаются далеко от места связывания). Таким образом, можно сказать, что для данной пары наблюдается эффект индуцированного соответствия, для связывания лиганда необходимо чтобы в белке произошли значительные конформационные изменения.