

# Структурная биоинформатика

*Практикум 7. Связывание лигандов. Карманы связывания. Индуцированное соответствие.*

Поддьяков Иван

---

## Оглавление

Задание 1. Изменения	2
Задание 2. Подготовка к докингу	7
Задание 3. Докинг	8
Дополнительное задание. Поиск карманов	12
Дополнительное задание. pKa	12
Дополнительное задание. Докинг	12
Источники	12

---

## Задание 1. Изменения

В данном задании необходимо сравнить две структуры молекулы белка - со связанным лигандом (уридиндифосфат) и без такового. На Рисунке 1 изображены две данные молекулы, наложенные друг на друга. Заметно отличие свободной формы от связанной - в последней сегмент белка (выделен фиолетовым) смещен в сторону лиганда относительно положения в свободной форме.

Рассмотрим отличия форм подробнее. На Рисунке 2 показана водородная связь азота глицина-43 с кислородом фосфатной группы лиганда. В свободной форме данная аминокислота находится на значительном удалении от места связывания. На Рисунке 3 представлена водородная связь между азотом остова глутамата-66 и аспаргатом-92. Эта связь образуется только в связанной форме. На Рисунке 4 показано образование гидрофобного ядра в связанной форме. Гидрофобные остатки этой области смыкаются сильнее, чем в свободной форме, обеспечивая более выгодную по энергии укладку за счет гидрофобного эффекта.

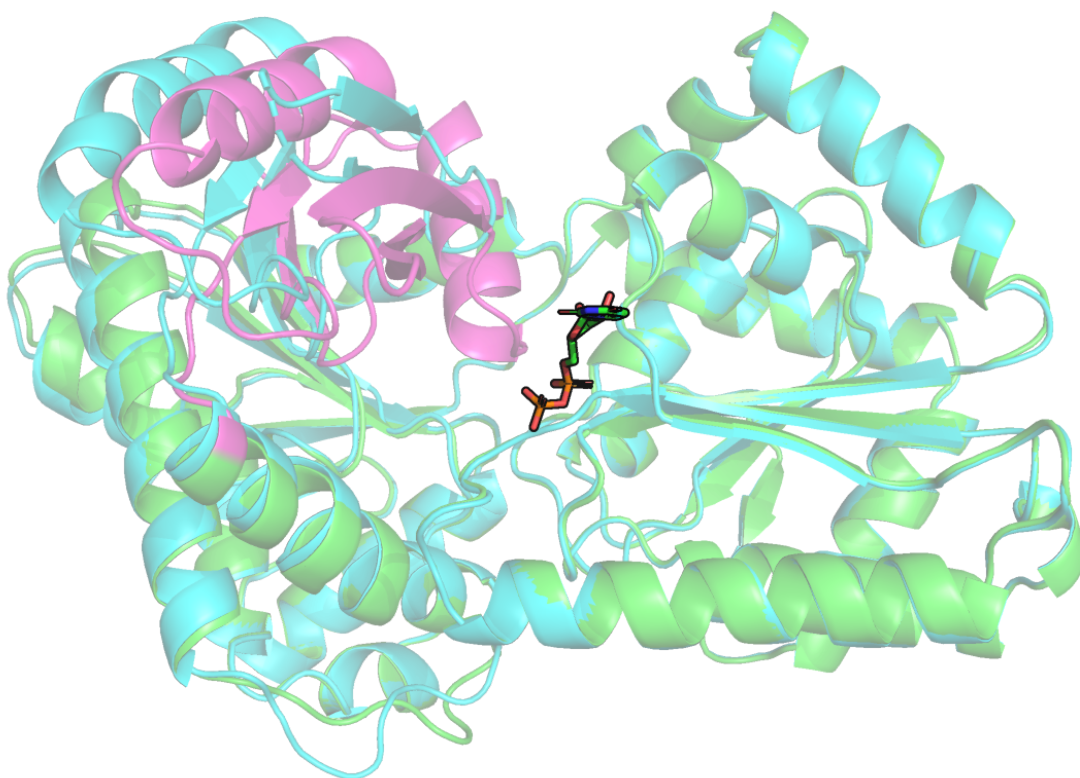


Рисунок 1. Общий вид белка и лиганда. Свободная форма - голубым, связанная - зеленым.

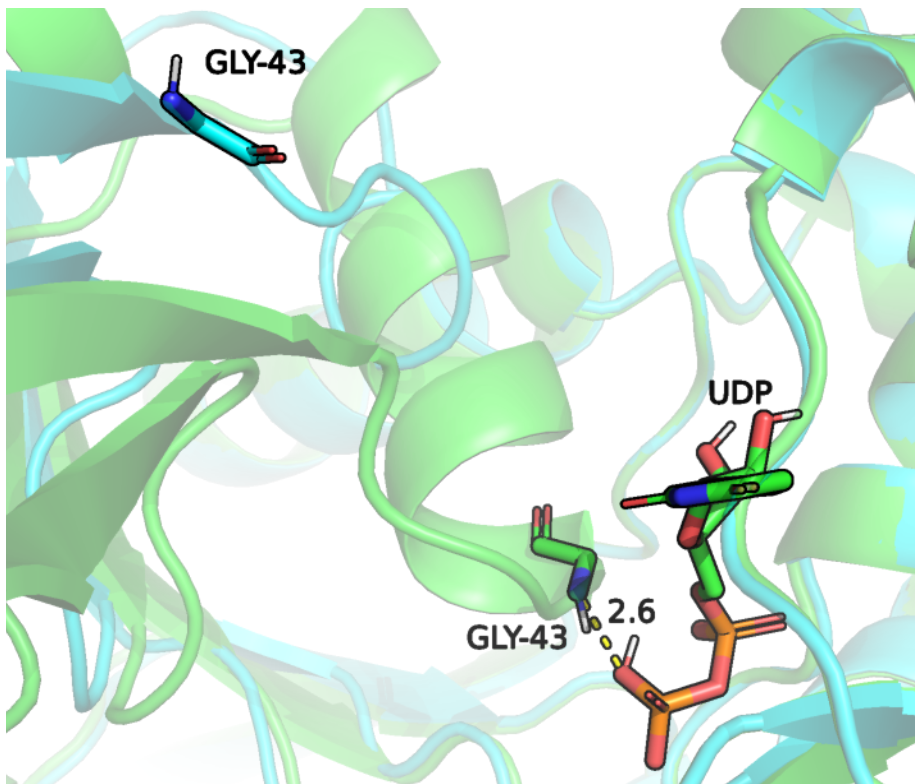


Рисунок 2. Водородная связь глицина-43 с лигандом в связанной форме (зеленым).

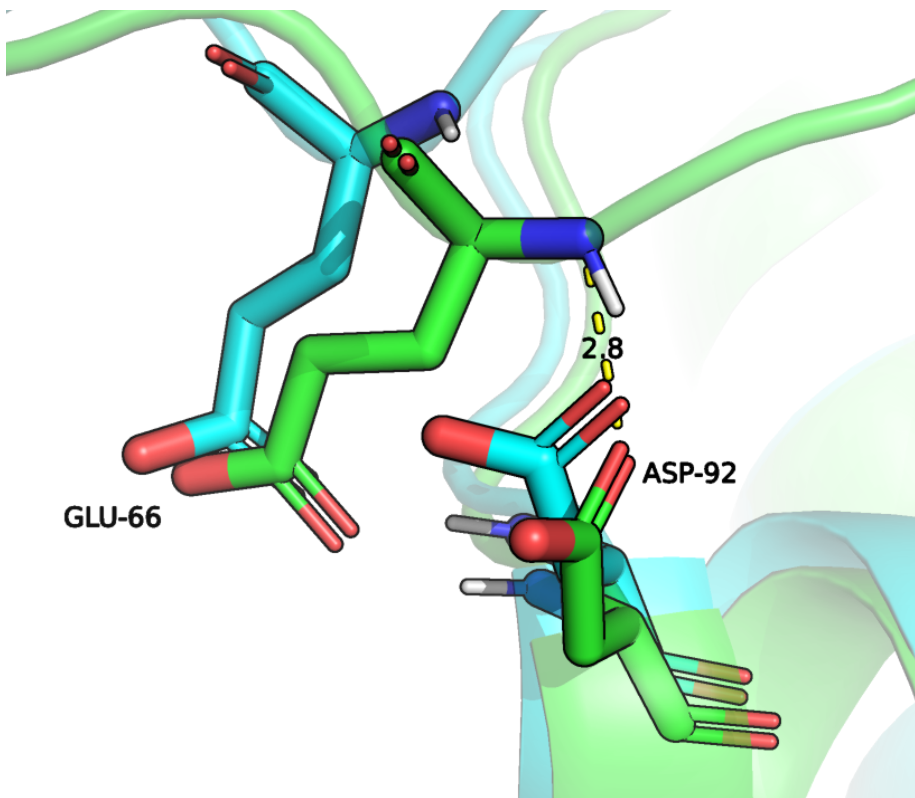


Рисунок 3. Водородная связь глутамата-66 и аспартата-92 в связанной форме (зеленым).

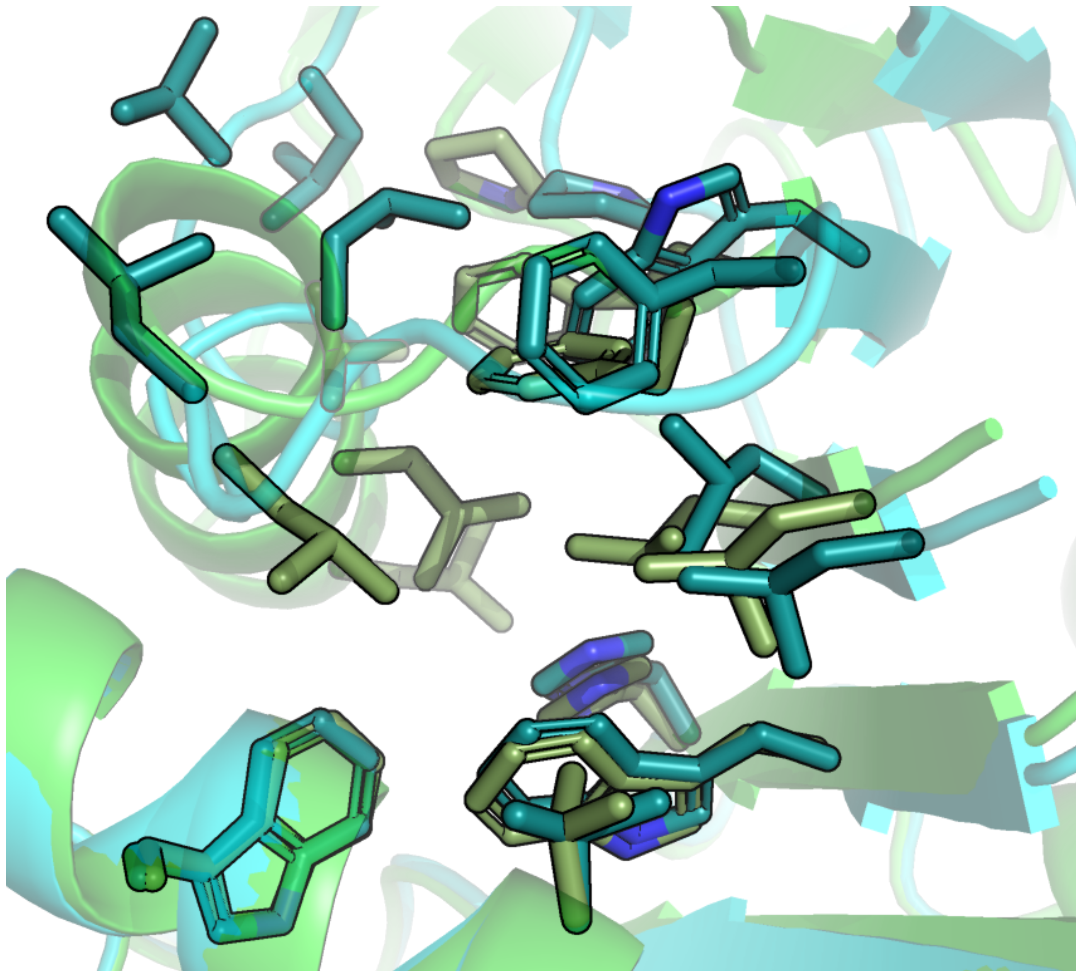


Рисунок 4. Образование гидрофобного ядра в связанной форме. Синим - свободная форма, зеленым - связанная.

Далее рассмотрим полости, в которых потенциально могут связываться лиганды в этом белке, определенные сервисом [POCASA](#) с параметрами по умолчанию. На Рисунке 5 показаны полости, проранжированные программой как лучшие. Интересующая полость отмечена зеленым цветом. Её крупное изображение с добавленным лигандом приведено на Рисунке 6. UDP занимает лишь некоторую ее часть, при этом в данный карман также включается участок слева, который как раз является тоннелем, образованным гидрофобными остатками в свободной форме (Рисунок 4).

На Рисунке 7 показаны полости, определенные сервисом в связанной форме белка. В числе лучших находок также присутствуют полости, аналогичные найденным в свободной форме. При этом полость, где связан лиганд, стала меньше из-за “опускания” на нее фрагмента белка и представляет собой два тоннеля, соединенные в глубине глобулы. В одном из тоннелей и находится лиганд (Рисунок 8). Почему карман в связанной форме имеет такую геометрию, я разберу в дополнительном задании.

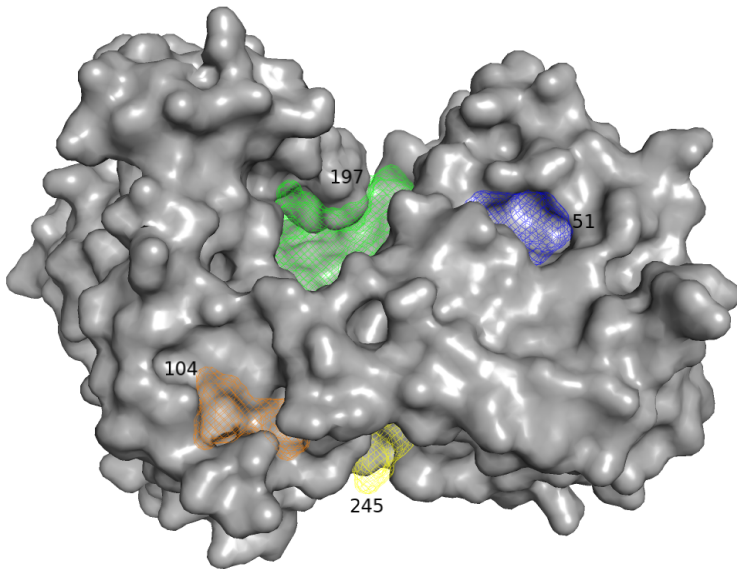


Рисунок 5. Найденные POCASA полости в свободной форме.

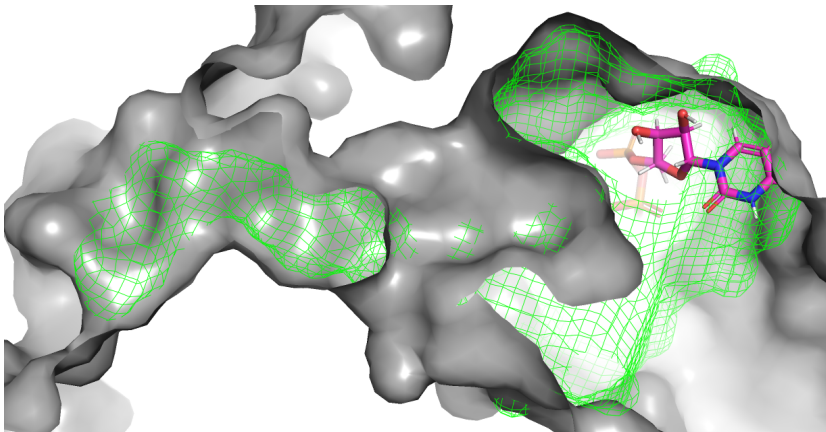


Рисунок 6. Полость связывания лиганда, свободная форма, лиганд добавлен из связанной.

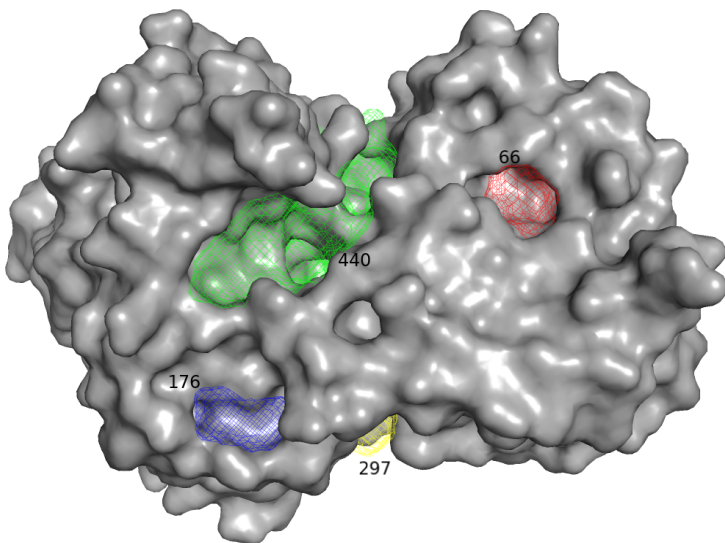


Рисунок 7. Найденные POCASA полости в связанной форме.

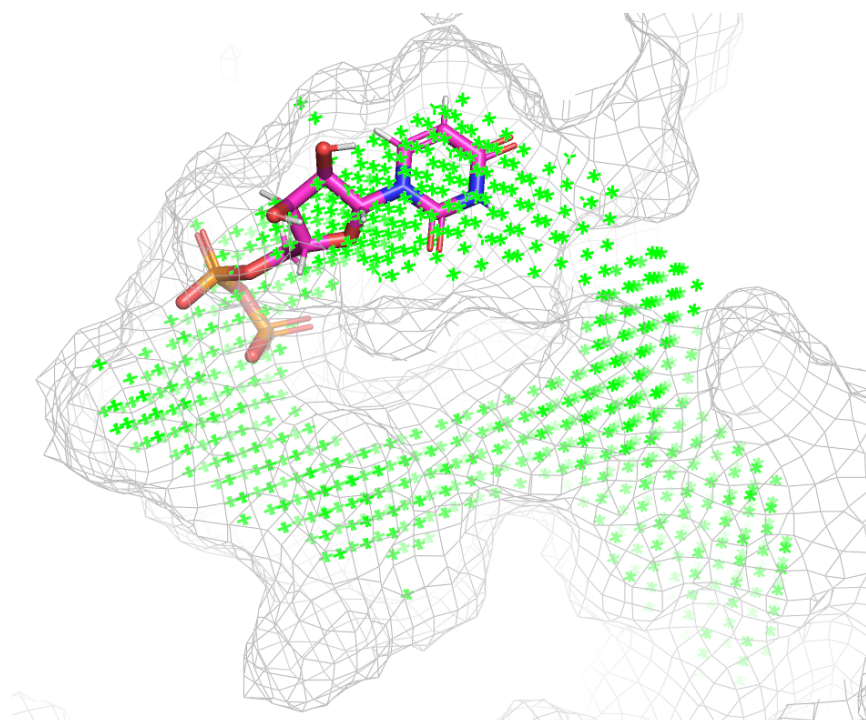


Рисунок 8. Полость связывания лиганда, связанная форма.

По моему мнению, сервис удовлетворительно справился с предсказанием полостей связывания лигандов, учитывая заданный радиус “пробы” - 2 Å. Полость связывания лиганда в обоих случаях является лучшей находкой с наибольшим объемом (превышает объемы других полостей из топ-5 более чем на порядок). Объем полости в свободной форме - 1325, в связанной - 1042 (предполагаю, что Å<sup>3</sup>, но в статье по методу я не смог найти информацию по единицам). Уменьшение объема кармана в связанной форме может быть объяснено его закрытием опускающейся “крышкой” (Рисунок 1). Однако я бы принял в расчет, что именно карман связывания определяется не совсем верно, захватывается вся полость и прилегающие к ней вогнутые участки поверхности. Поэтому мне кажется, что лучше считать эти карманы сопоставимыми по объему.

Если говорить про другую метрику, рассчитываемую сервисом, - VD [1], то ее параметры у обеих полостей еще более близки: 4873 против 4680. Этот параметр является суммой наименьших расстояний по всем точкам (согласно гриду) полости до поверхности, по которой была “проведена” проба. Он же и используется для ранжирования. Стоит также обратить внимание и на другой параметр - среднее VD точки, так как наши полости имеют разный объем и, следовательно, включают разное количество точек. Для полости в связанной форме этот показатель равен 4.49 Å, а для

свободной формы - 3.68. Это может говорить о том, что карман в связанной форме глубже и уже, чем в свободной.

## Задание 2. Подготовка к докинг

На следующем этапе было необходимо подготовить лиганд и белок к докингу, а именно добавить водороды к лиганду и рецептору, предсказав их положение при физиологических значениях pH и в зависимости от аминокислотного окружения. Для этого я воспользовался программой `pdb2pqr`, запустил ее с параметрами  $\text{pH} = 7.0$ , метод - PROPKA. Затем `pqr`-файл я конвертировал в `pdbqt` формат, используя скрипт пакета AutoDock. Подробнее об отклоняющихся от референса рКа и добавленных водородах в дополнительном задании.

Также я добавил водороды лиганду, воспользовавшись программой SPORES. UDP до и после добавления на Рисунках 9 и 10 соответственно. Все протоны, на мой взгляд, добавлены разумно для нейтральных значений pH.

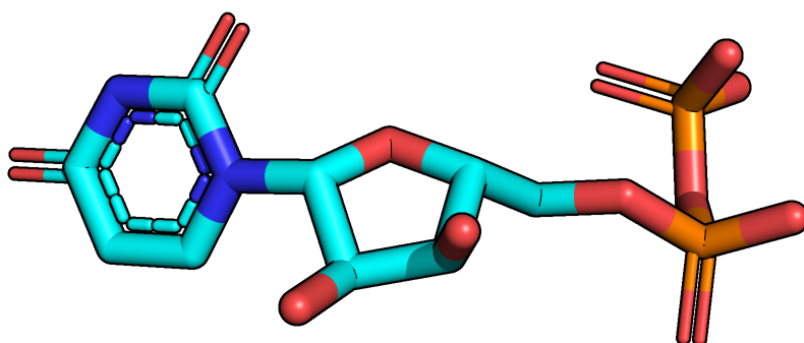


Рисунок 9. UDP до добавления протонов.

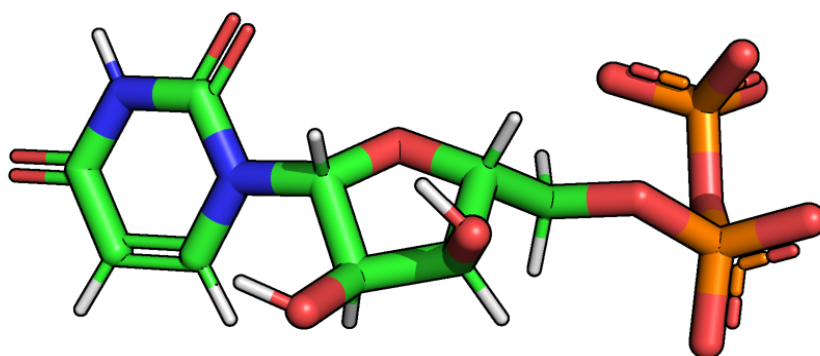


Рисунок 10. UDP с добавленными SPORES протонами.

### Задание 3. Докинг

В данном задании я попытался предсказать, в каком положении лиганд может связываться со свободной формой белка в изучаемой полости, с помощью докинга. Протонированные молекулы я загрузил на онлайн сервис докинга [Webina](#), совместил центры лиганда из связанной формы и “грид бокса”, захватив по несколько Å дополнительно с каждой стороны от лиганда. Программа предсказала 9 поз, они приведены на Рисунке 11. Желтыми стиками изображена лучшая поза, розовыми стиками - положение лиганда в связанной форме. Все позы локализируются примерно в одном месте и принимают две разные ориентации. Ни одна из них совершенно не похожа на истинную позу лиганда. Рассчитанная аффинность для лучшей позы -7.8 ккал/моль, для худшей -7.3 ккал/моль, то есть эти показатели достаточно близки.

На Рисунке 12 показана разметка взаимодействий лиганда в связанной форме сервисом [PoseView](#). Я согласен с предсказанными контактами, но, наверное, добавил бы водородную связь азота глицина-42 с кислородом у второго атома углерода урацила.

На Рисунке 13 показана разметка взаимодействий лучшей позиции докинга со свободной формой сервисом [PoseView](#). Я также согласен с приведенными взаимодействиями, однако водородная связь ND гистидина с кислородом у второго атома углерода урацила (Рисунок 15) кажется мне маловероятной из-за геометрических затруднений (все-таки для установления такой связи достаточной силы водород нужно повернуть из плоскости имидазольного кольца).

Лиганд в связанной форме и лучшая поза по результатам докинга не имеют идентичных взаимодействий, однако фосфатные группы удерживаются одинаковыми аминокислотами - боковыми радикалами лизина-284 и аргинина-289 и азотами остова валина-393 и лейцина-392. При этом  $\alpha$  и  $\beta$ -фосфаты лиганда взаимодействуют с этими аминокислотами по-разному -  $\alpha$ -фосфат истинного лиганда имеет связи, идентичные со связями  $\beta$ -фосфата позы докинга, и наоборот. Предположу, что помимо водородных связей, в данном случае имеет место быть электростатическое взаимодействие между азотами аминокислот с частичным положительным зарядом и кислородами фосфатов, несущими отрицательный заряд.



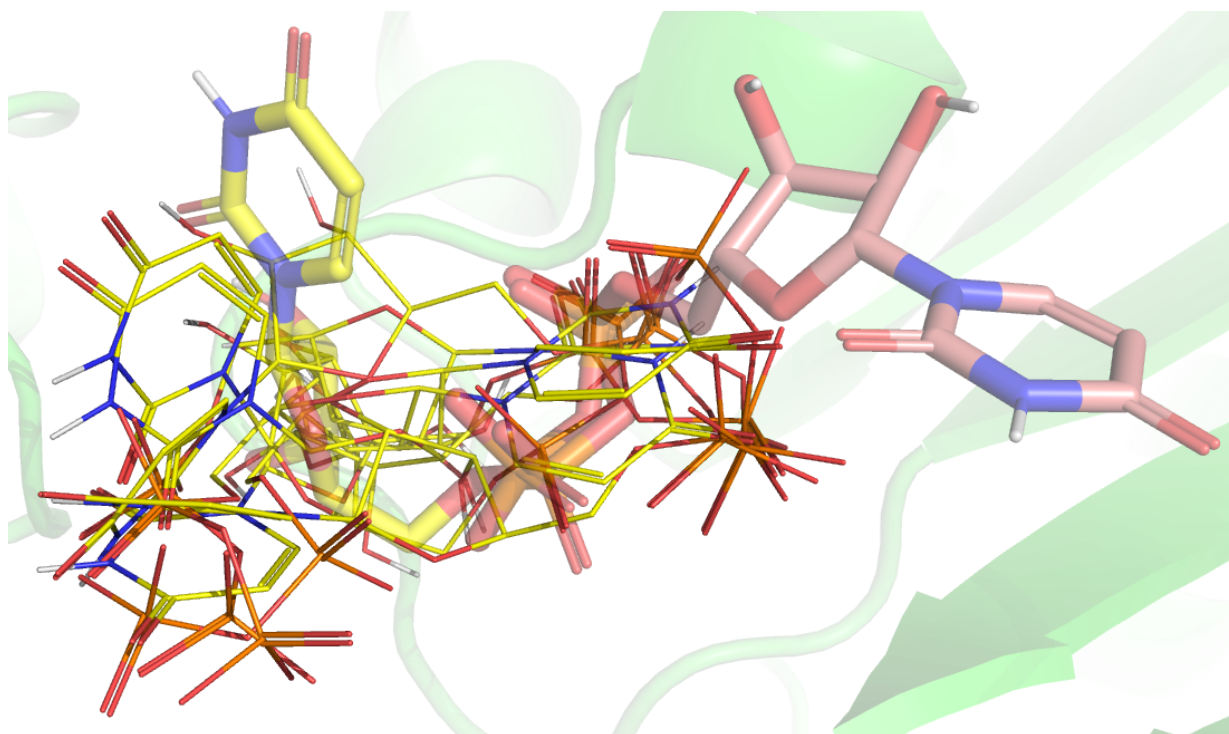


Рисунок 11. Лучшие позы докинга и изначальный лиганд в свободной форме.

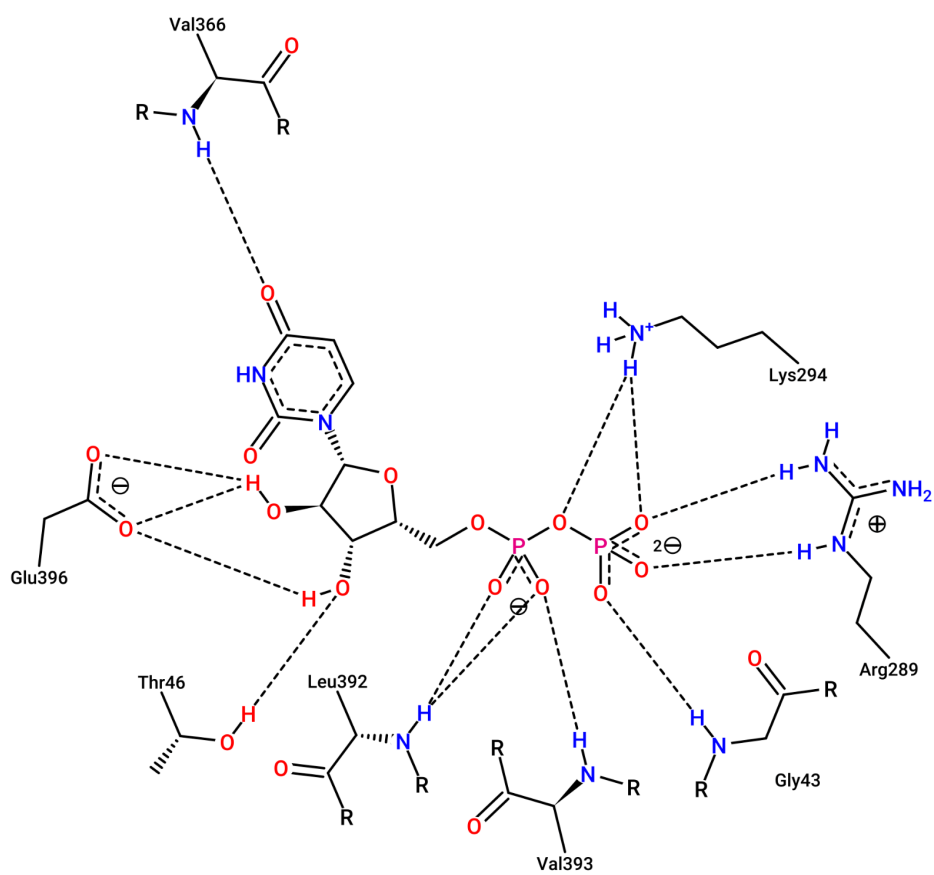


Рисунок 12. Разметка взаимодействий лиганда со связанной формой, PoseView.

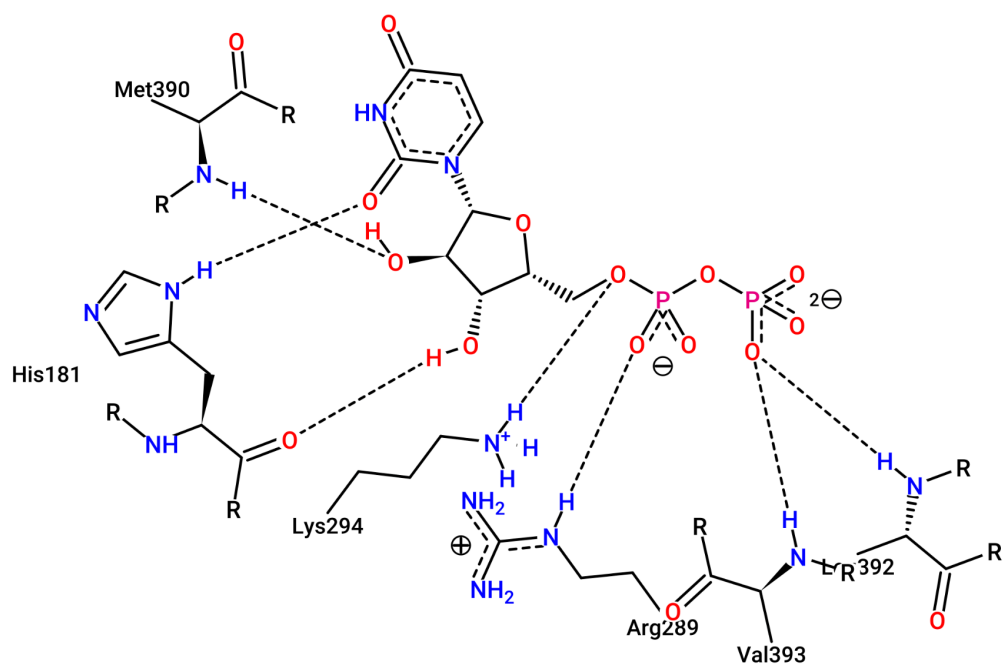


Рисунок 13. Разметка взаимодействий лучшей позы докинга со свободной формой, PoseView.

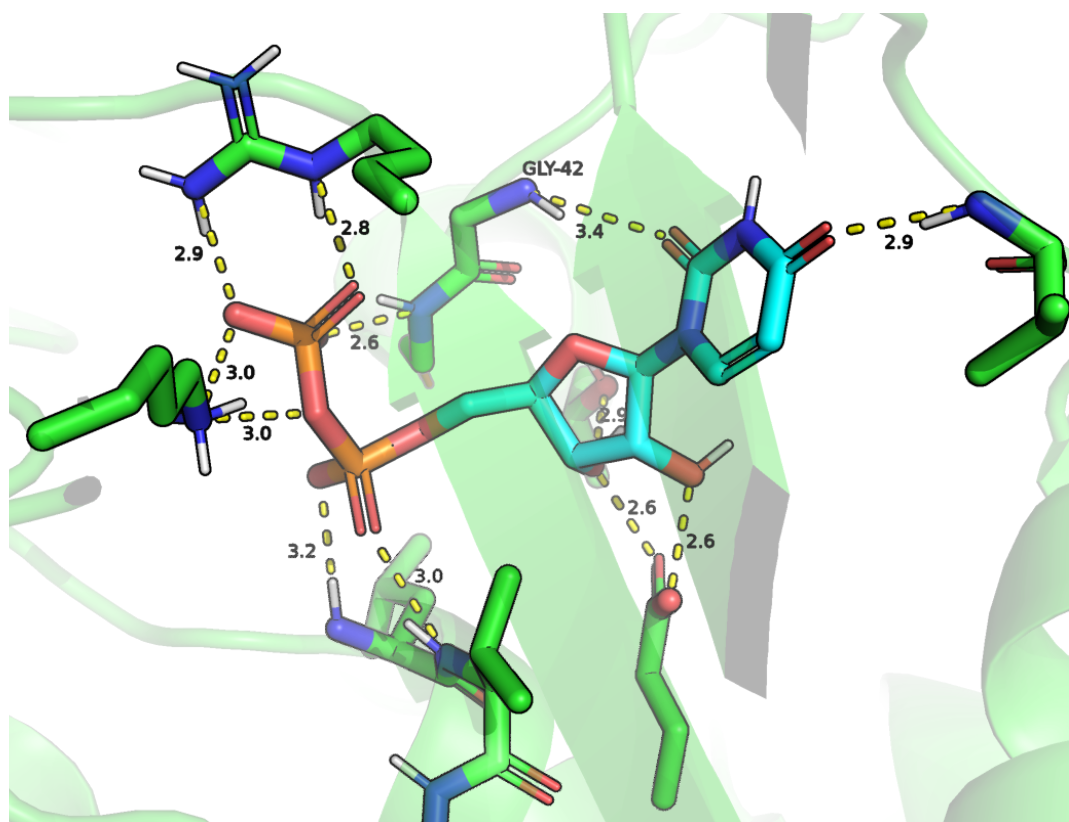


Рисунок 14. Взаимодействия лиганда (голубым) со связанной формой.

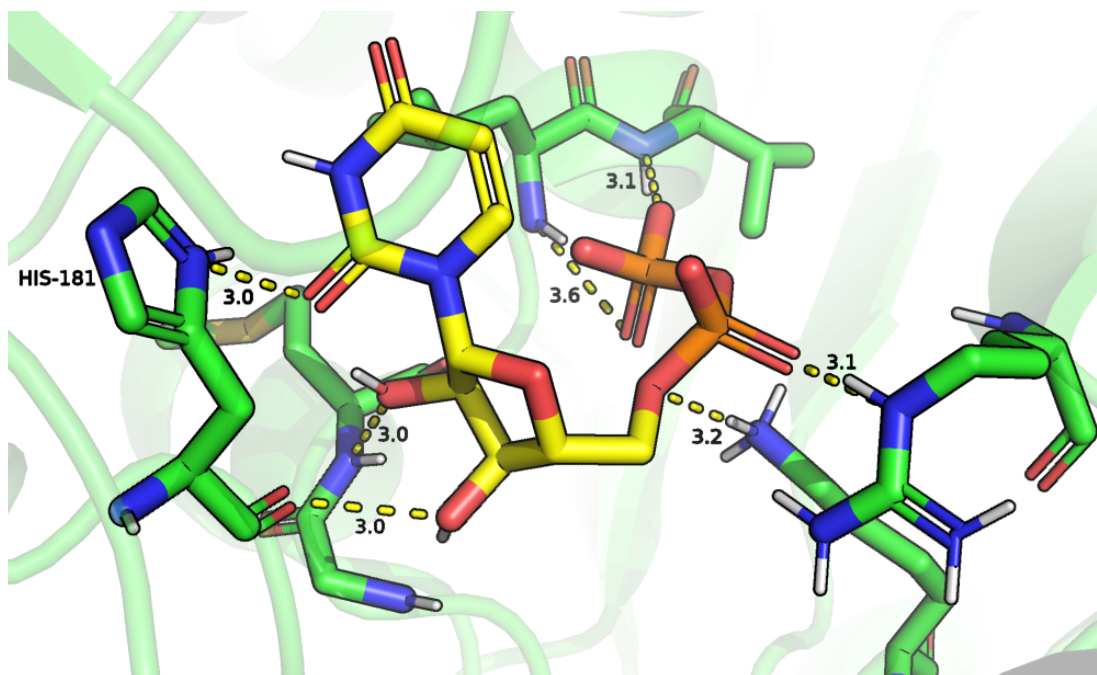


Рисунок 15. Взаимодействия лучшей позы докинга (желтым) со свободной формой.

Обсудим полученный результат. Несовпадение взаимодействий предсказанной позы докинга с истинной позой говорит в пользу того, что для связывания данного лиганда необходимо изменение конформации белка (закрытие “крышки”). Я считаю, что связывание фосфатов одинаковыми аминокислотами не поможет замкнуть полость кармана и образовать связи, идентичные истинной позе, всю молекулу лиганда придется развернуть, что будет уменьшением энергии, пусть и частичным, уже существующих контактов с фосфатами. На мой взгляд, на данном этапе можно предположить индуцированное соответствие белка лиганду - без изменения конформации белка лиганд никак не займет истинную позу. Однако еще до проведения докинга я заметил, что лиганд в связанной форме занимает не весь карман (Рисунок 8), а “крышка” довольно слабо с ним связана. Кажется, что там может находиться еще какая-то молекула. Об этом я подробнее расскажу в дополнительном задании.

*Дополнительные задания будут позже, я отдельно запишусь на проверку.*

**Дополнительное задание. Поиск карманов**

**Дополнительное задание. pKa**

**Дополнительное задание. Докинг**

### **Источники**

1. Yu J, Zhou Y, Tanaka I, Yao M. Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. *Bioinformatics*. 2010;26: 46–52.