

Локализация лиганда и объем кармана связывания

Для того, чтобы понять, как изменяется карман связывания при взаимодействии с лигандом, рассмотрим пару структур, одна из которых содержит лиганд.

На макроуровне наблюдается некоторое количество изменений, в основном затрагивающих участки, располагающиеся рядом с сайтом связывания лиганда. Наиболее отклоняющиеся участки принадлежат петлям, в то время как положение α -спиралей остается почти неизменным. Положение дистальных участков практически не изменяется.

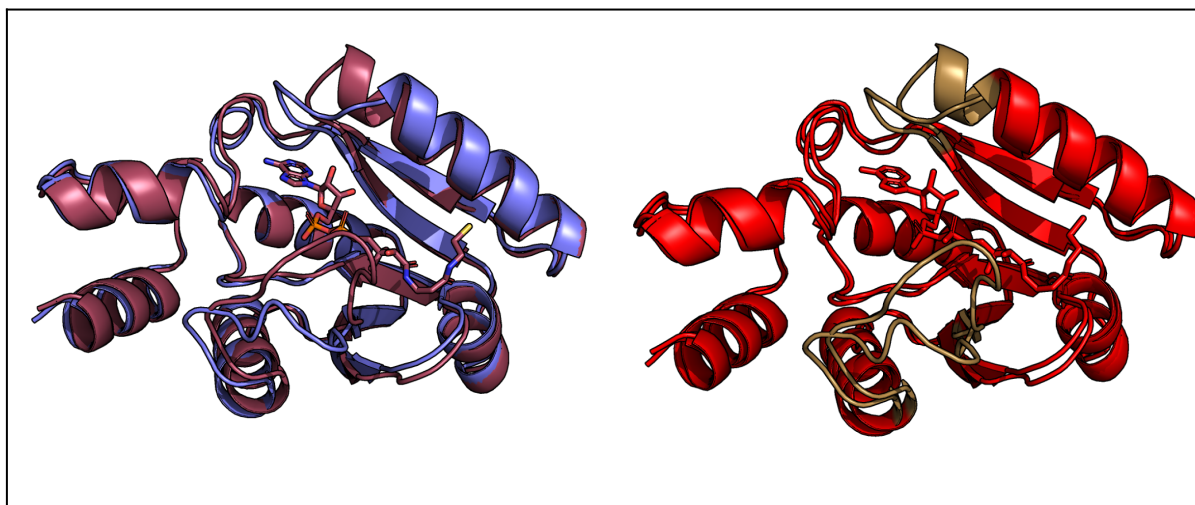


Рисунок 1. Изменения в структуре комплекса, наблюдаемые на макроуровне. Синим цветом показана структура фермента, не несущего связанный лиганд, бордовым -- связанная с лигандом. На втором изображении песочным покрашены петли, положение которых значительно изменяется при связывании, красным -- участки, положение которых изменяется незначительно.

Рассмотрим аминокислотные взаимодействия, наблюдаемые рядом с сайтом связывания лиганда. Для этого наложим структуру, несущую связанный лиганд на структуру, которая его не содержит, что поможет нам точно определить карман связывания. После рассмотрим аминокислотные остатки, находящиеся в кармане связывания (определим их как остатки, аналогичные тем, что располагаются на расстоянии 5\AA от лиганда в структуре, несущей связанный лиганд). В кармане связывания можно рассмотреть три выгодных взаимодействия: Т-стекинг, соляной мостик и водородная связь остова.

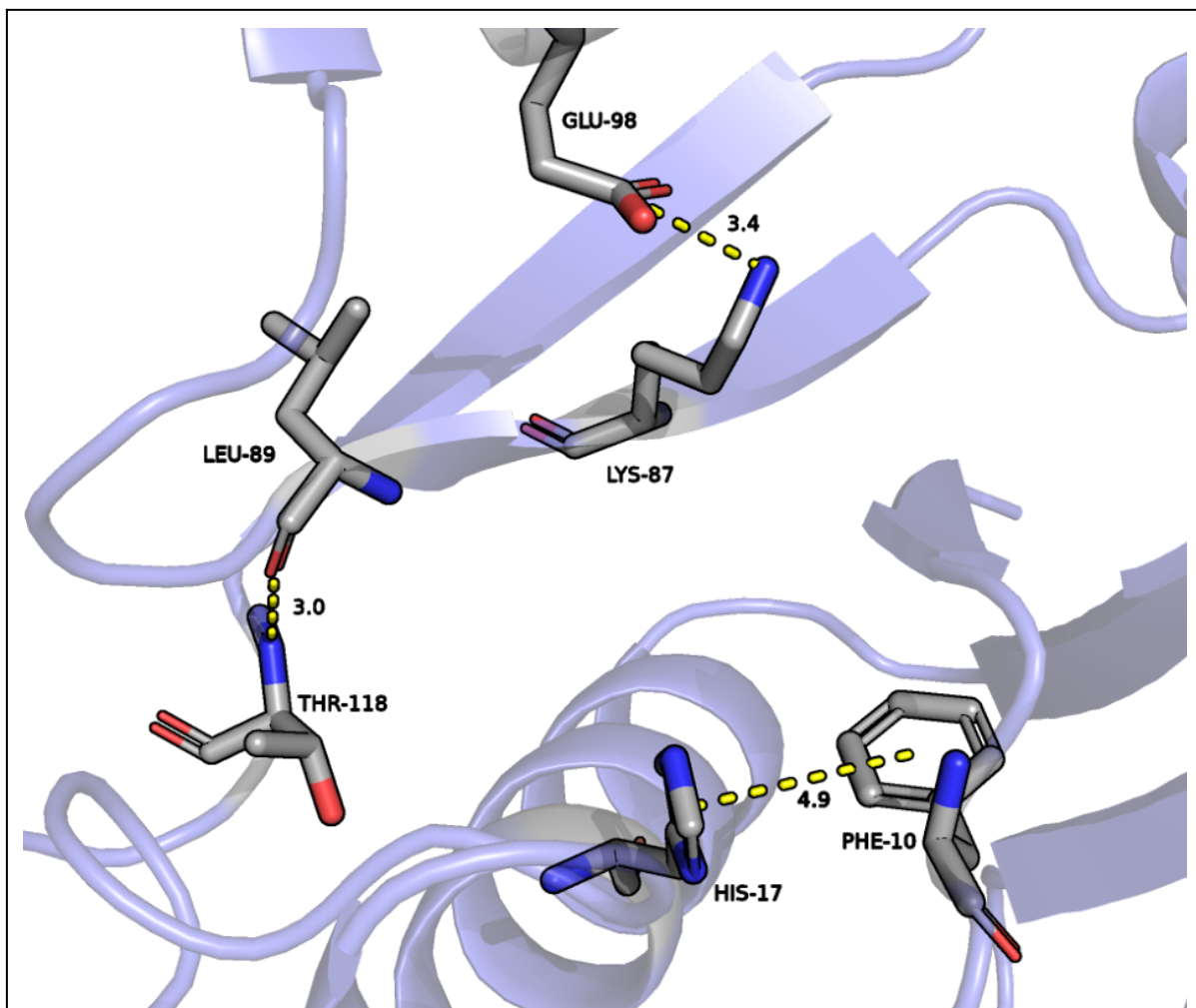


Рисунок 2. Взаимодействия аминокислотных остатков в кармане связывания в структуре, не несущей связанный лиганд. Показаны наиболее ярко различимые взаимодействия.

Посмотрим на те же самые взаимодействия на структуре, в которой находится связанный лиганд. Все взаимодействия сохраняются; одно из них даже несколько улучшается, т.к. сокращается расстояние между атомами и водородная связь стремится к оптимальной своей длине.

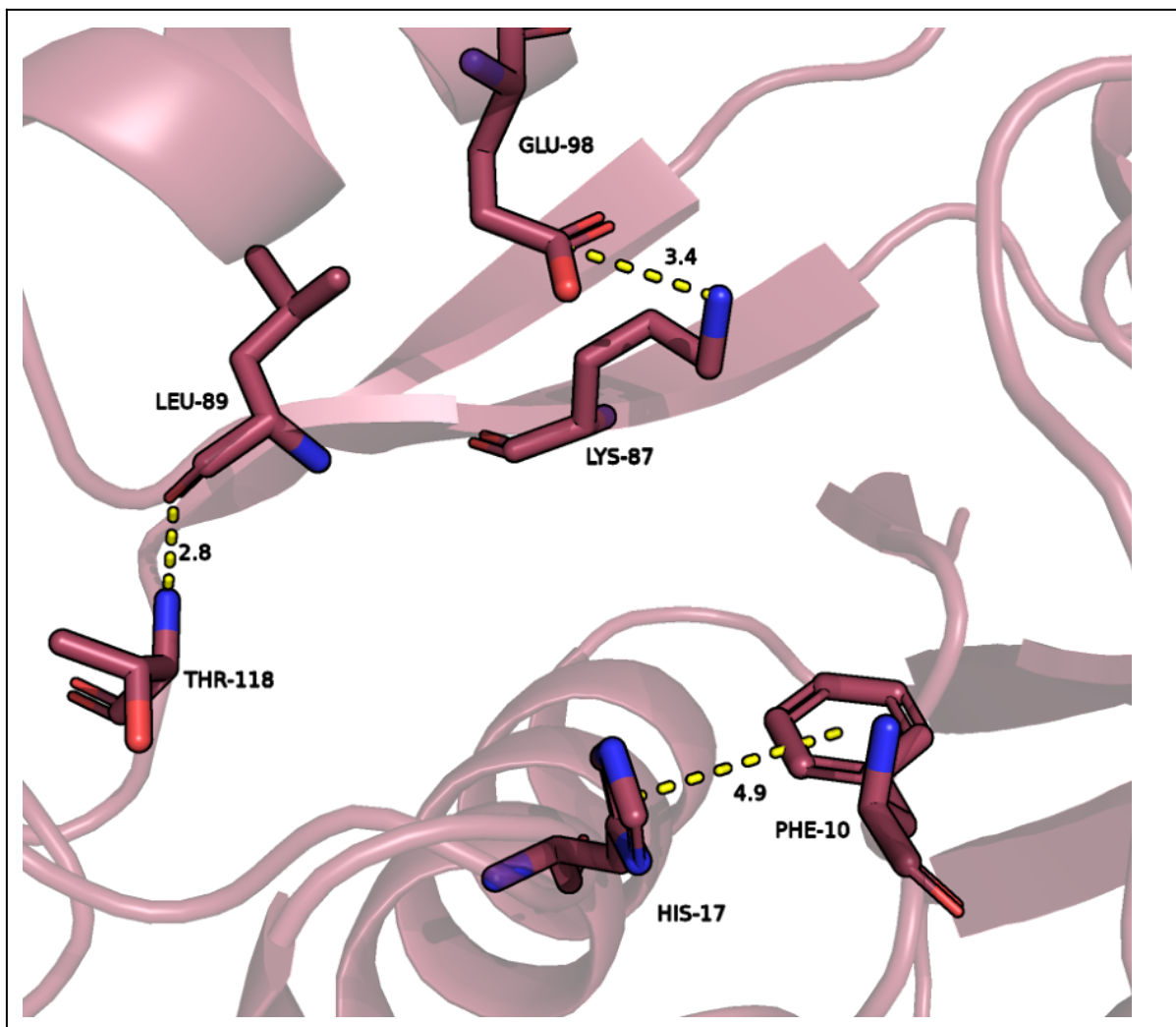


Рисунок 3. Взаимодействия аминокислотных остатков в кармане связывания в структуре, несущей связанный лиганд. Показаны ранее рассмотренные взаимодействия.

Рассмотрим, какие взаимодействия появляются в белке при связывании лиганда. Выделим все атомы, расположенные на расстоянии не более 5\AA от лиганда, оставим те аминокислотные остатки, положение которых значительно изменилось, а также те, которые отсутствовали на данном расстоянии в структуре, не несущей лиганд.

Стоит отметить, что рядом с карманом связывания появляется несколько аминокислотных остатков: Asp-94, Tyr-97, Asn-38 и Pro-39 (немного дальше от кармана, чем другие остатки). Остатки 38 и 39 приходят к сайту связывания при перемещении дистальной петли; два других остатка сближаются с сайтом связывания из-за небольшого смещения α -спирали к сайту связывания.

Мы видим появление достаточно большого количества новых взаимодействий между аминокислотами. Мы видим образование солевого мостика между остатками Asp-94 и Arg-90, между этими остатками также образуется водородная связь как между боковыми группами, так и между боковой группой и остовом. Имеется водородная

связь между остатками Asn-38 и Tyr-94, а также связь между остовами остатков Asp-38 и Tyr-94.

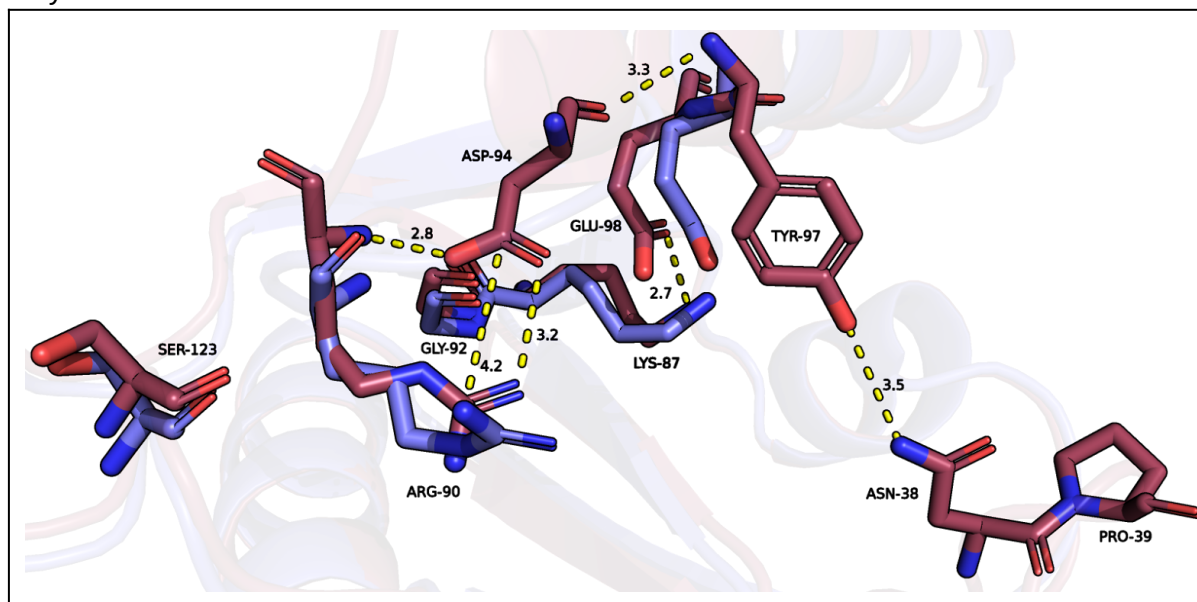
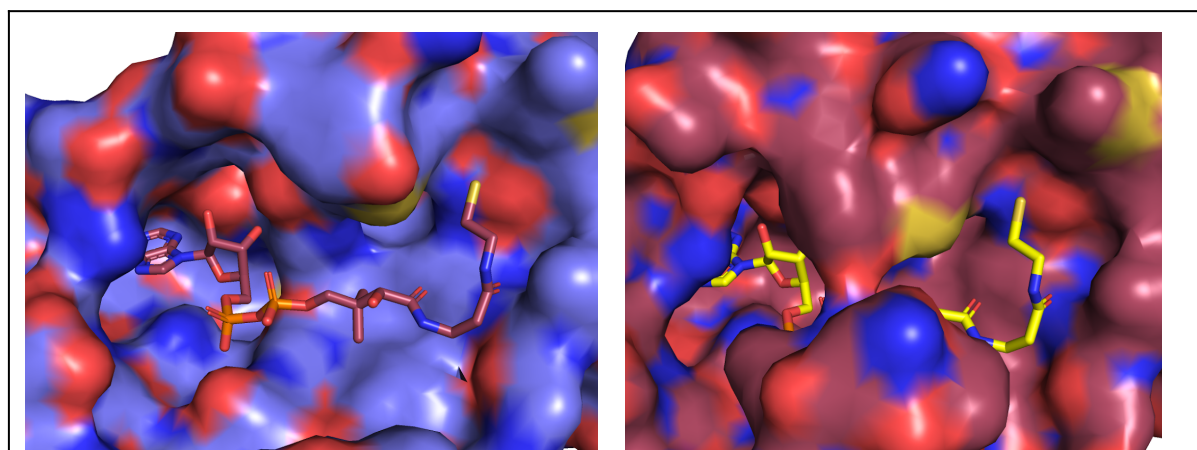


Рисунок 4. Взаимодействия аминокислотных остатков, появившиеся в процессе связывания лиганда.

Стоит отметить, что карман связывания стал более “плотным” -- рядом с ним появилось больше аминокислотных остатков, они приобрели более “компактную” укладку, что также видно и при отрисовке поверхности. Карман также своеобразным образом “закрылся”.

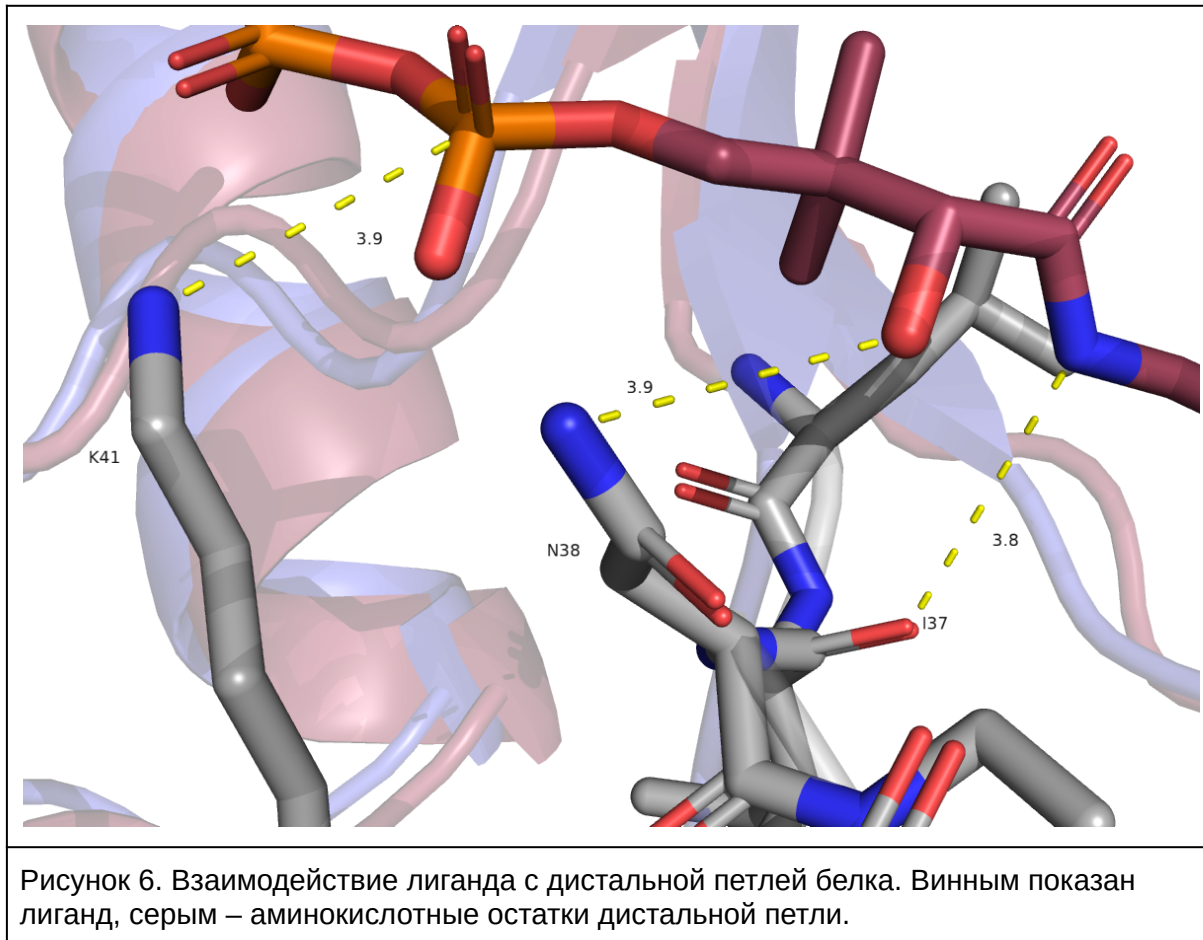


Карман связывания свободной структуры Лиганд, связанный в кармане

Рисунок 5. Изменение общей формы и объема кармана связывания при взаимодействии с лигандом.

Что еще приводит к закрытию кармана связывания? На рисунке 1 видно, что одна из дистальных петель при связывании лиганда сильно меняет свое положение. Может ли это быть связано с процессом связывания лиганда? Может ли лиганд своеобразным

образом “подхватывать” эту петлю в процессе связывания и “закрывать за собой” дверь в карман связывания?



Действительно, лиганд взаимодействует с аминокислотными остатками этой петли, наиболее эффективное взаимодействие происходит с остатком лизина-41, который связан электростатическими взаимодействиями и водородными связями с остатком фосфорной кислоты в составе лиганда. Менее эффективные взаимодействия образуют и другие аминокислотные остатки петли.

Стоит сказать, что в результате связывания лиганда карман связывания лиганда уплотняется и закрывается. Это происходит как и по причине сближения аминокислотных остатков внутри кармана связывания (а само сближение, вероятно, индуцируется лигандом), так и благодаря лиганду, который своеобразно “подтаскивает” дистальную петлю к карману, вынуждая его закрыться, что мы и видим на рисунке 5.

Посмотрим, какие карманы связывания находит POCASA. Probe radius для работы сразу пришлось снизить до 1, т.к. карманы в свободной структуре не находились. Стоит отметить, что в структуре, свободной от лиганда, программа находит 4 возможных кармана связывания со следующими объемами: 183 (карман А), 64 (карман В), 36 (карман С) и 21 (карман D); можно предположить, что все значимые по размерам карманы были найдены.

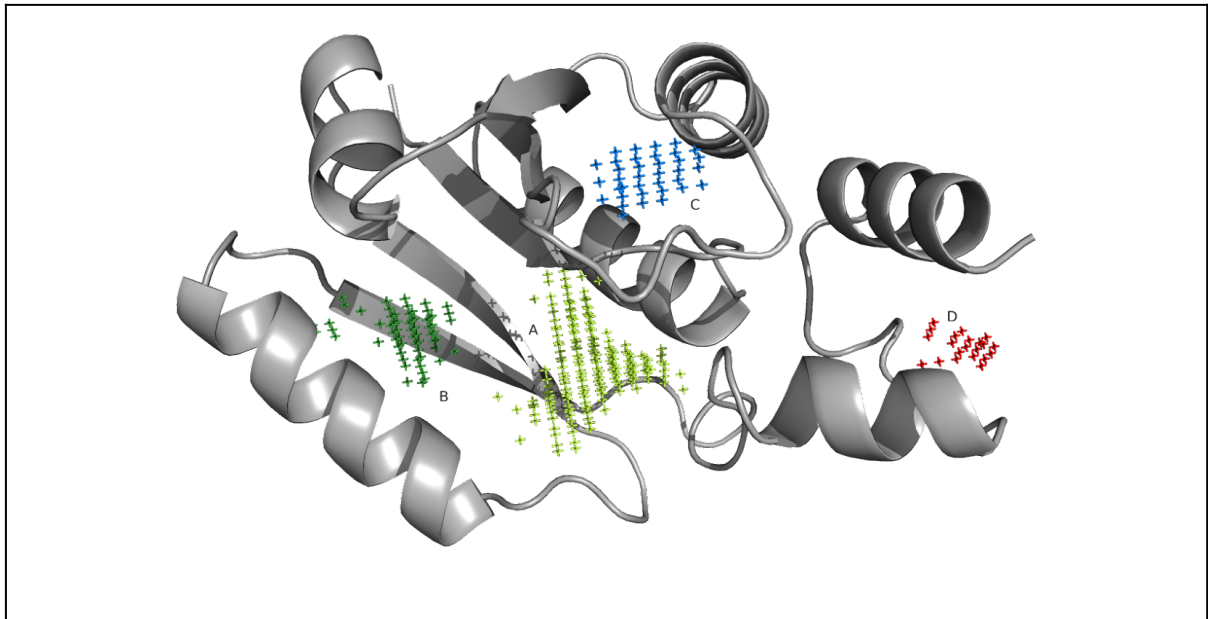


Рисунок 7. Возможные карманы связывания для структуры, не несущей связанный лиганд.

Стоит отметить, что два из карманов связывания располагаются в месте, где будет связываться лиганд, что было ожидаемо. Для центрального участка молекулы лиганда карман не находится, так как он лежит практически на поверхности глобулы (см. Рисунок 5 выше). Карман D, вероятно, является артефактом запуска, так как он явно не заглублен в элементы вторичной структуры и располагается на периферии молекулы. Карман C располагается в месте контактов элементов вторичной структуры, он имеет небольшой объем и может быть как артефактом, так и местом связывания какого-нибудь небольшого аллостерического регулятора.

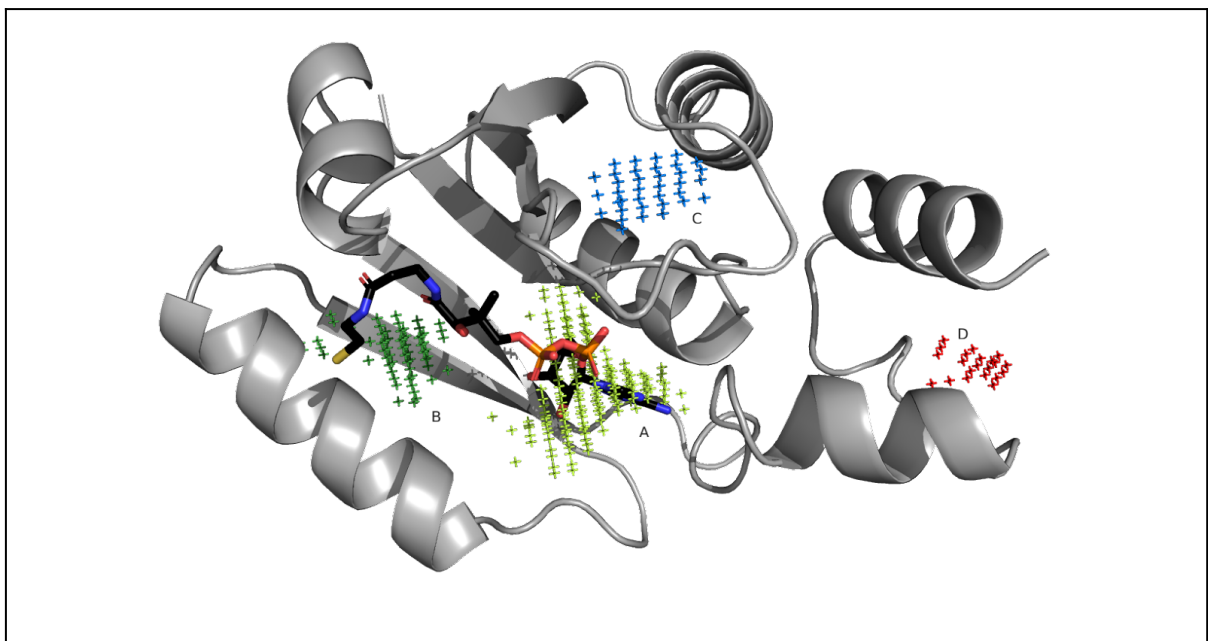


Рисунок 8. Положение лиганда относительно карманов в структуре.

Рассмотри карманы, которые находит алгоритм для структуры белка в комплексе с лигандом. Мы видим только один единственный карман достаточно большого объема (387), располагающегося приблизительно в том же месте, где и карман A на структуре, не связанной с лигандом. Удаленный карман D в данной структуре не обнаруживаются, что позволяет предположить, что он не имеют функциональной значимости как минимум для белка, связанного с лигандом. Стоит также отметить, что все карманы значительного размера были найдены.

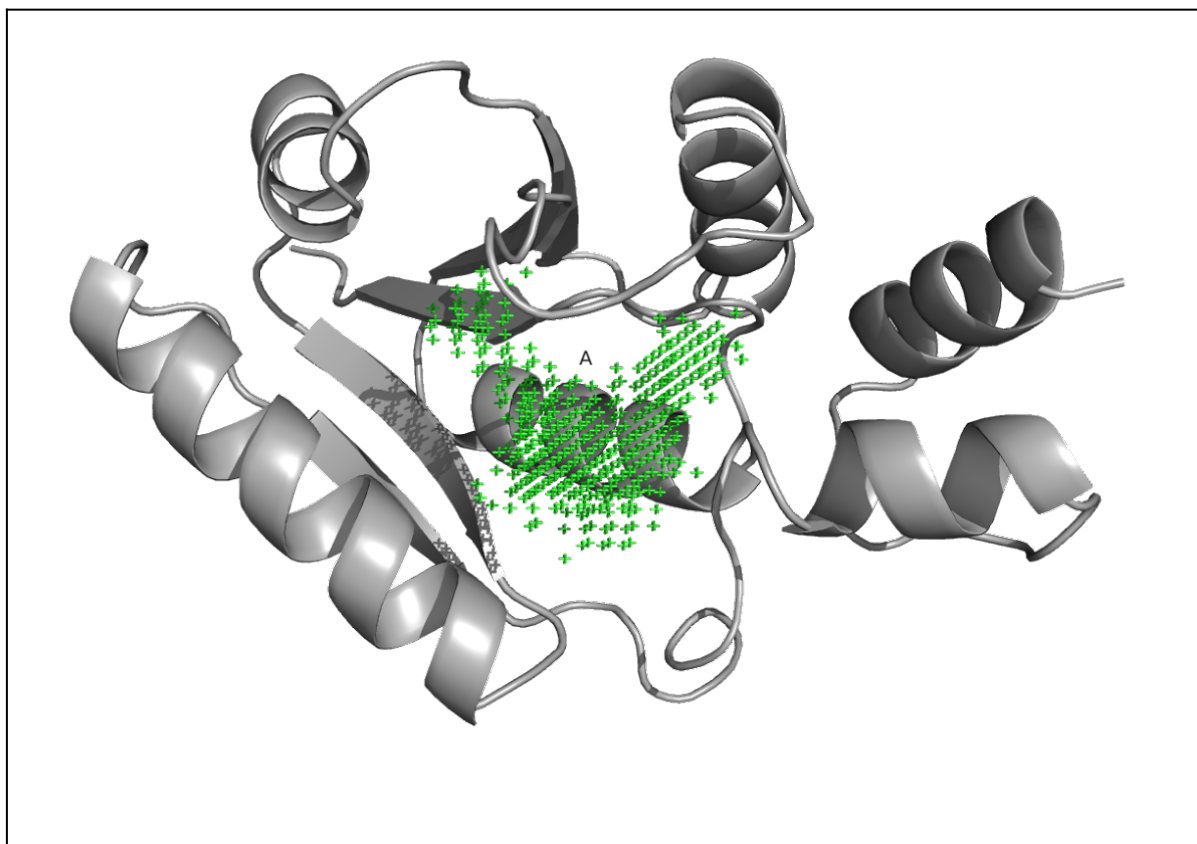
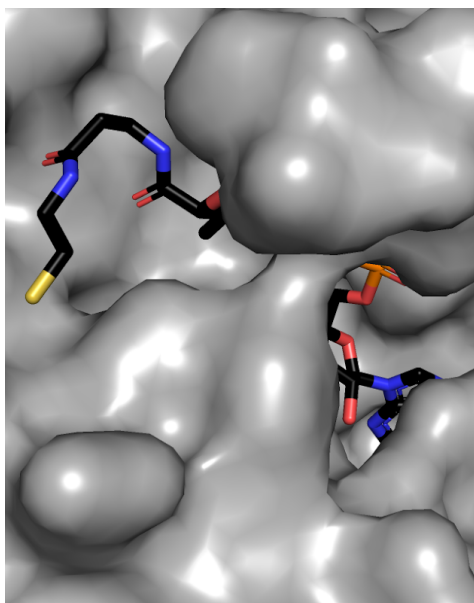


Рисунок 9. Карман, находящийся в структуре, содержащей связанный лиганд.



Рассмотрим положение лиганда относительно найденного кармана. Достаточно крупный участок молекулы лиганда попадает в найденный карман; хвост молекулы остается непокрытым карманом, но стоит отметить, что в отличии от покрытой зоны, данный участок располагается скорее на поверхности молекулы, чем в глубоком участке. Это может быть причиной такого положения найденных карманов.

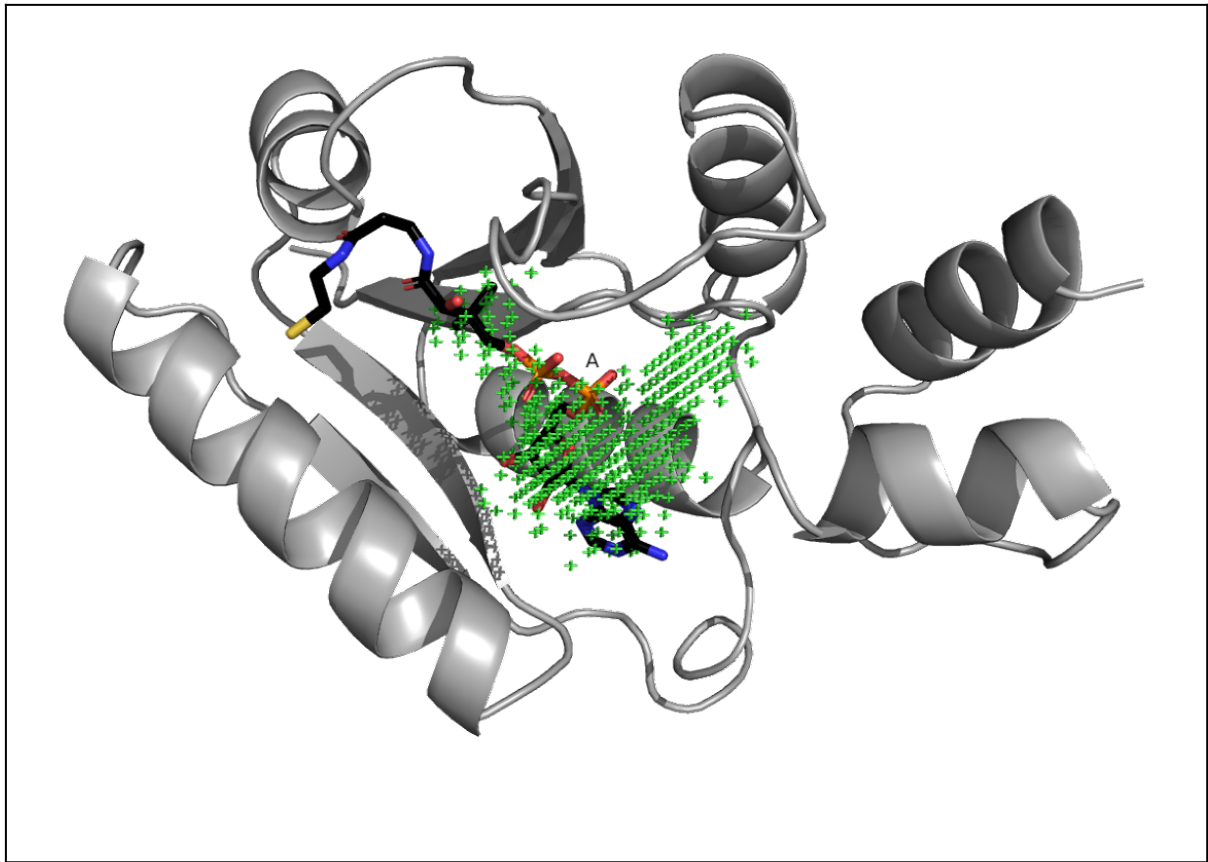


Рисунок 10. Положение лиганда относительно карманов в структуре.

Карман связывания лиганда находится в обеих структурах, однако для структуры комплекса белка с лигандом он является более “стянутым” и углубленным относительно лиганда, а его больший объем может объясняться тем, что карман покрывает больший участок лиганда и немного углубляется в центр глобулы в сторону кармана С. Появление данного углубления может являться следствием слияния карманов А и С, что также хорошо может объяснять увеличение его объема.

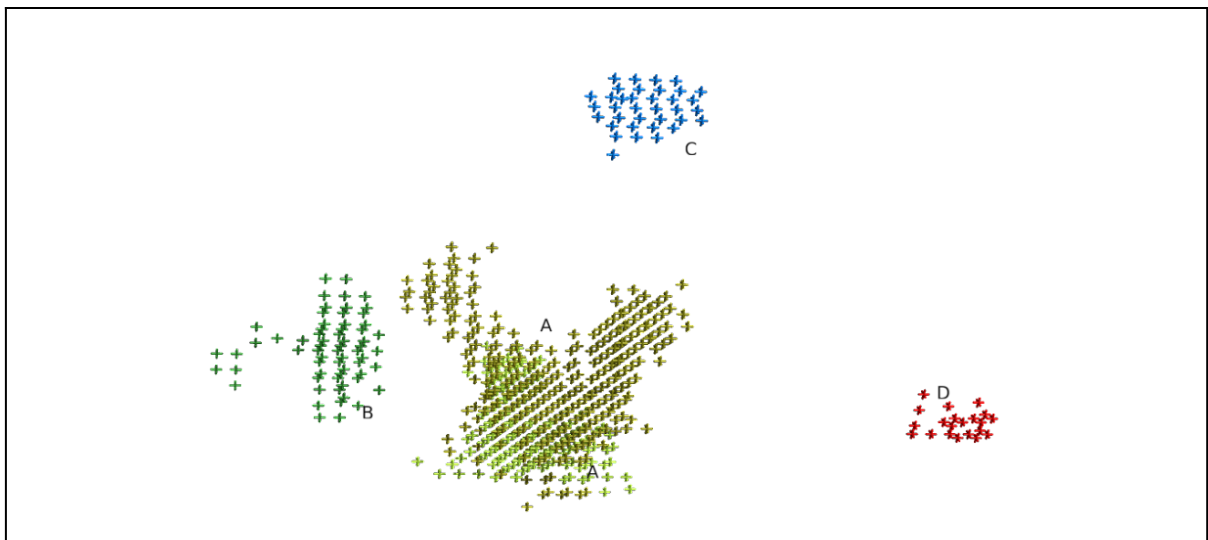
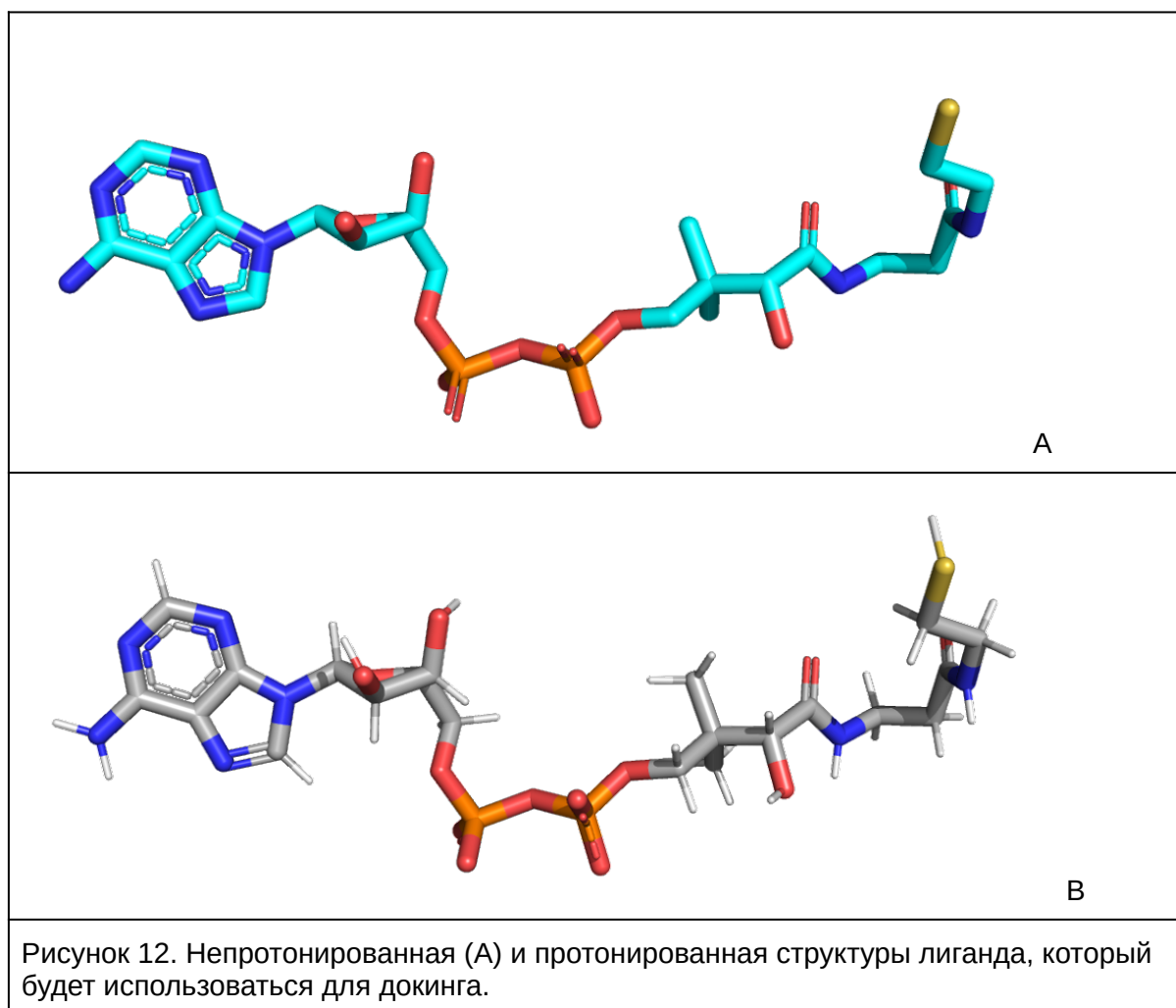


Рисунок 11. Наложение найденных карманов друг на друга.

Стоит отметить, что положение размеченных карманов и особенности положения лиганда внутри них позволяет предположить, что связывание и взаимодействие с лигандом действительно “стягивает” молекулу белка. Предположительно, это стягивание происходит в процессе стабилизации положения лигандов в полости: мы наблюдаем наличие небольших карманов для отдельных участков лиганда; взаимодействие лиганда с ними приводит к динамическим изменениям их поверхности и привлечение более дистальных остатков, участвующих в образовании уже конечного кармана.

Подготовка к докингу

Для подготовки к докингу нам необходимо протонировать структуру, не несущую связанных лиганд, и сам лиганд. Для протонирования белковой молекулы воспользуемся веб-сервером PDB2PQR, а для лиганда -- тулом SPORES. Рассмотрим, как был запротонирован лиганд.



На мой взгляд, протонирование лиганда прошло достаточно адекватно: водороды в пептидных связях добавлены в ее плоскости, положение водородов на кислородах согласуется с теоретическим; водороды на ароматических группах также верно добавлены в плоскости колец.

Оценим, насколько хорошо прошло протонирование белковой молекулы. Для этого взглянем на остатки, чьи pK_a (по предсказаниям сервиса PROPKA) оказались далеки от оптимального. Выберем pK_a , предсказанные PROPKA, найдем их абсолютное отклонение от теоретического pK_a и проанализируем пять наиболее отклоняющихся остатков.

Остаток	Номер	pK_a	Референсная pK_a	Абсолютная разница
CYS	6	12.23	9.0	3.23
HIS	17	3.73	6.5	2.77
ARG	151	14.46	12.5	1.96
ASP	29	1.89	3.8	1.91
GLU	49	2.75	4.5	1.75

Таблица 1. Пять остатков, чье pK_a наиболее сильно отклоняется от теоретического для структуры, не несущей связанный лиганд.

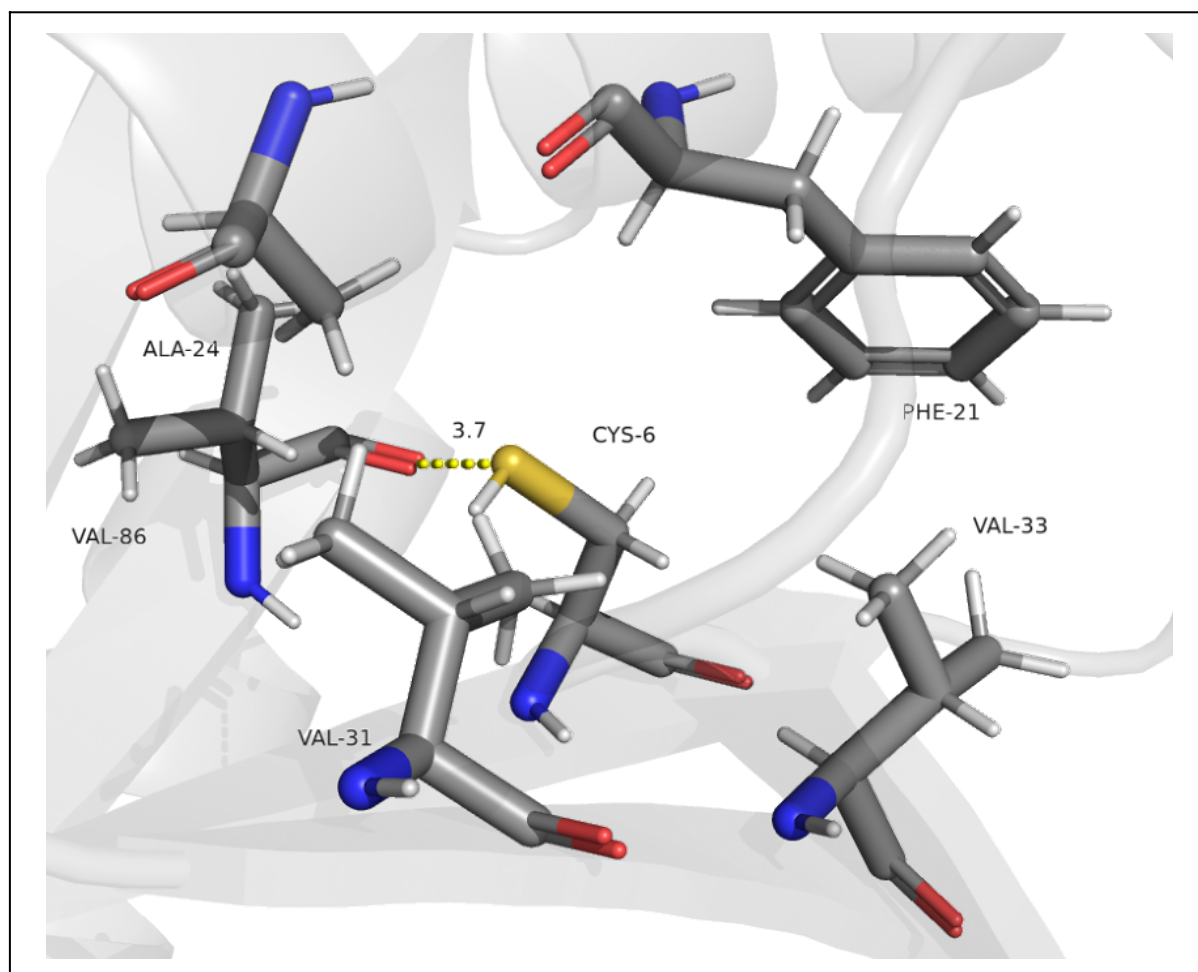


Рисунок 13. Окружение остатка Cys-6, чей pK_a сильно сдвинут в щелочную область.

Окружение данного остатка очень гидрофобно, а водород на цистеине может вовлекаться в образование водородной связи с кислородом остова остатка Val-86. Водородные связи в гидрофобном окружении имеют высокую энергию, а появление некомпенсированного заряда в гидрофобном окружении очень нежелательно. В данном случае pK_a определен верно, однако протон скорее всего добавлен неверно и должен смотреть в сторону кислорода.

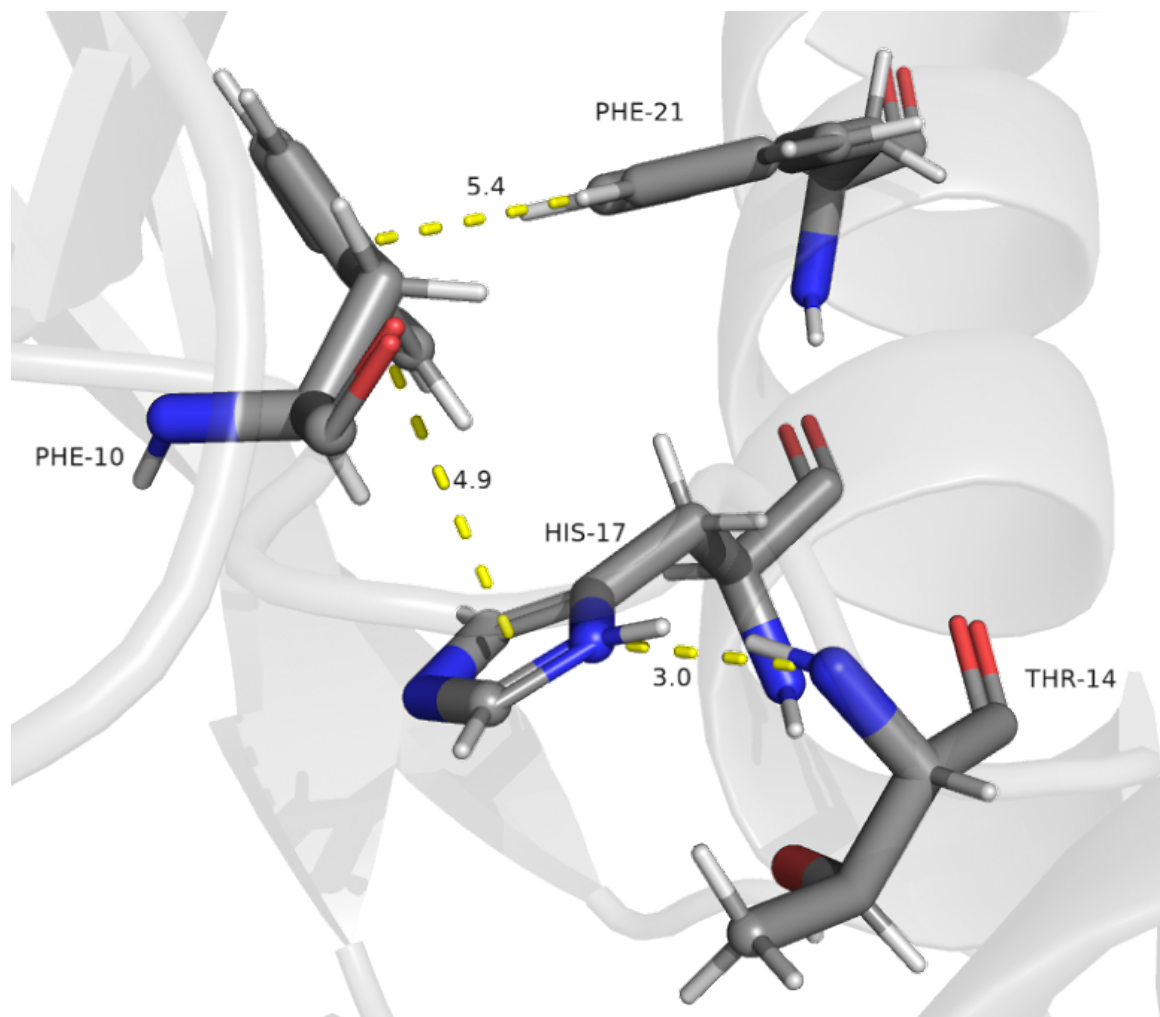


Рисунок 14. Окружение остатка His-17, чей pK_a сдвинут в кислую область. Данный остаток вовлечен в эффективные T-стекинговые взаимодействия, однако его низкий pK_a обусловлен не этим. δ -азот располагается очень близко к водороду на остоном азоте остатка Thr-16 и протонирование данного остатка приводит к разрыву водородной связи и даже небольшим стерическим нарушениям, что и может объяснять наблюдаемые явления. Протон добавлен не на тот азот кольца гистидина.

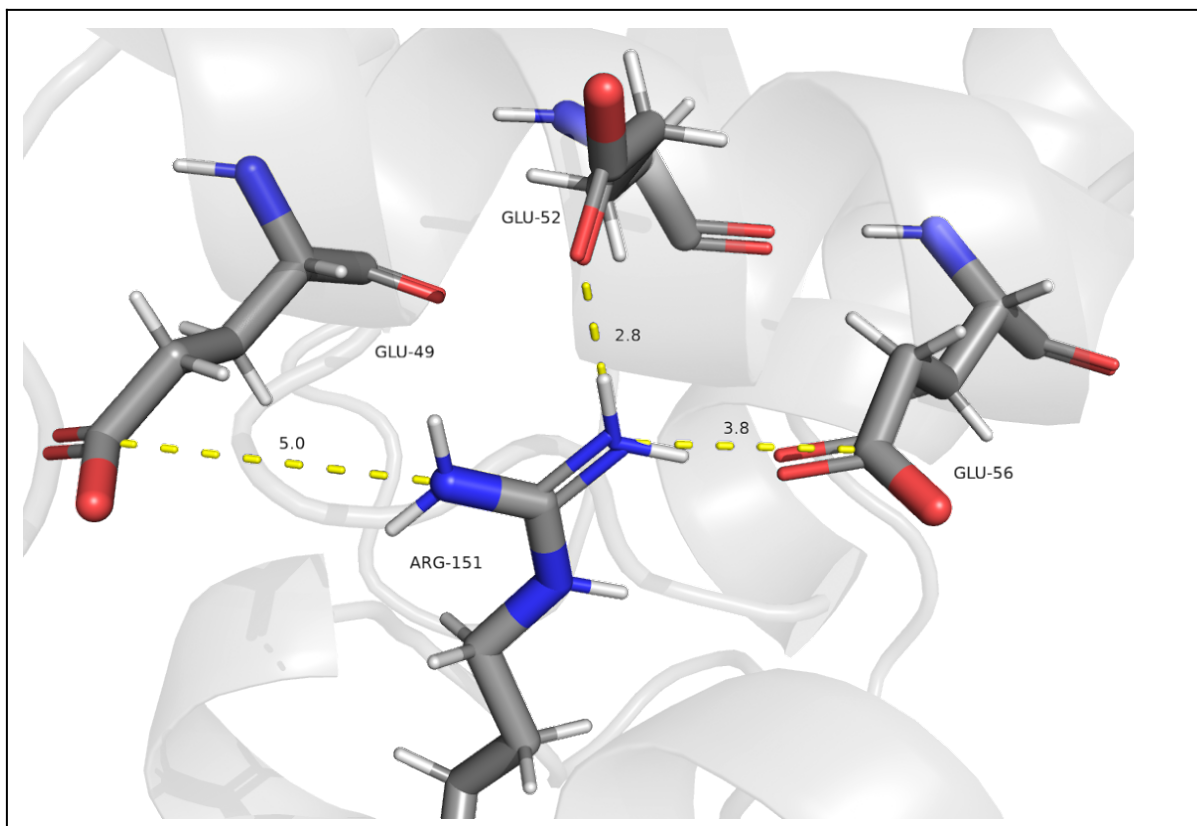


Рисунок 15. Окружение остатка Arg-151, чей pK_a сильно сдвинут в щелочную область.

Данный остаток располагается в окружении кислых остатков глутамата и вовлечен в эффективные электростатические взаимодействия; с остатками Glu-52 и Glu-56 возможно образование водородных связей. Это объясняет такой высокий pK_a данной группы.

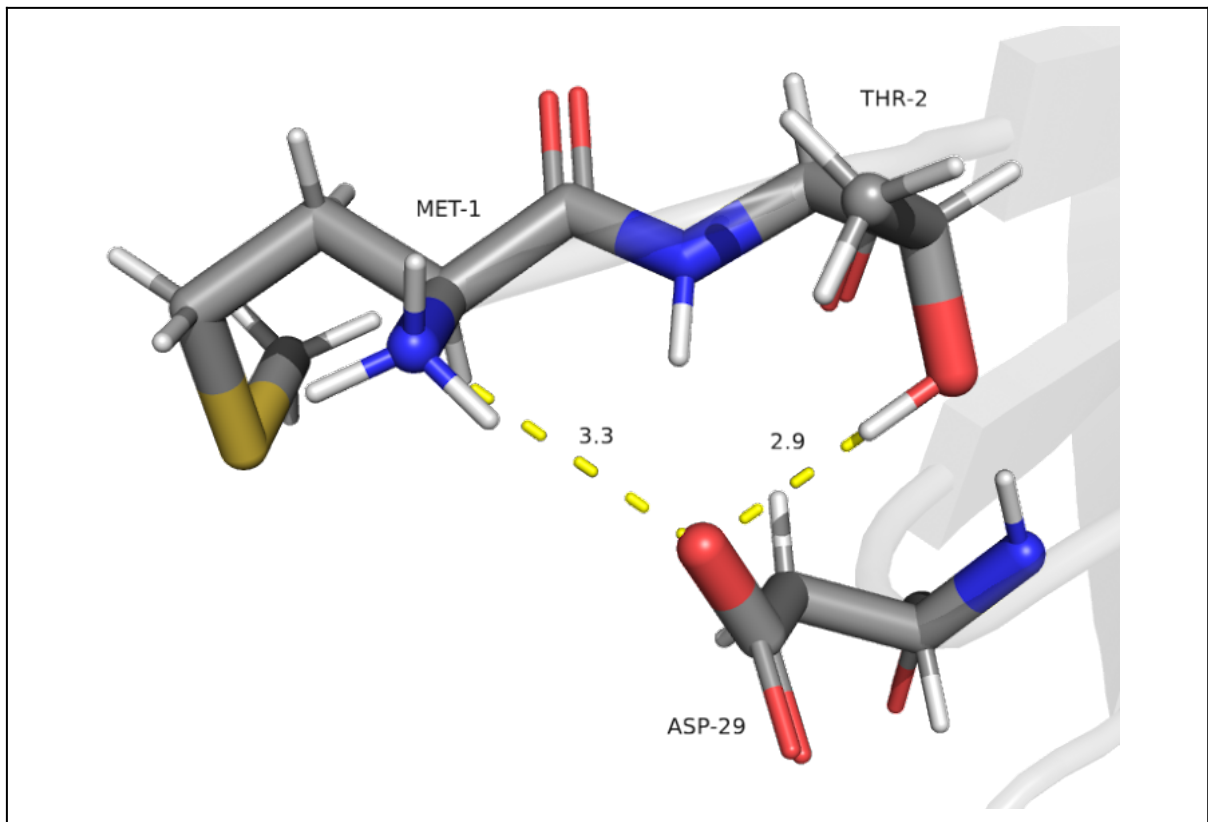


Рисунок 16. Окружение остатка Asp-29, чей pK_a сдвинут в кислую область. Данный остаток взаимодействует с N-концевым участком аминокислотной цепи, а также образует довольно хорошую водородную связь с остатком Thr-2. Снижение его pK_a предсказано верно.

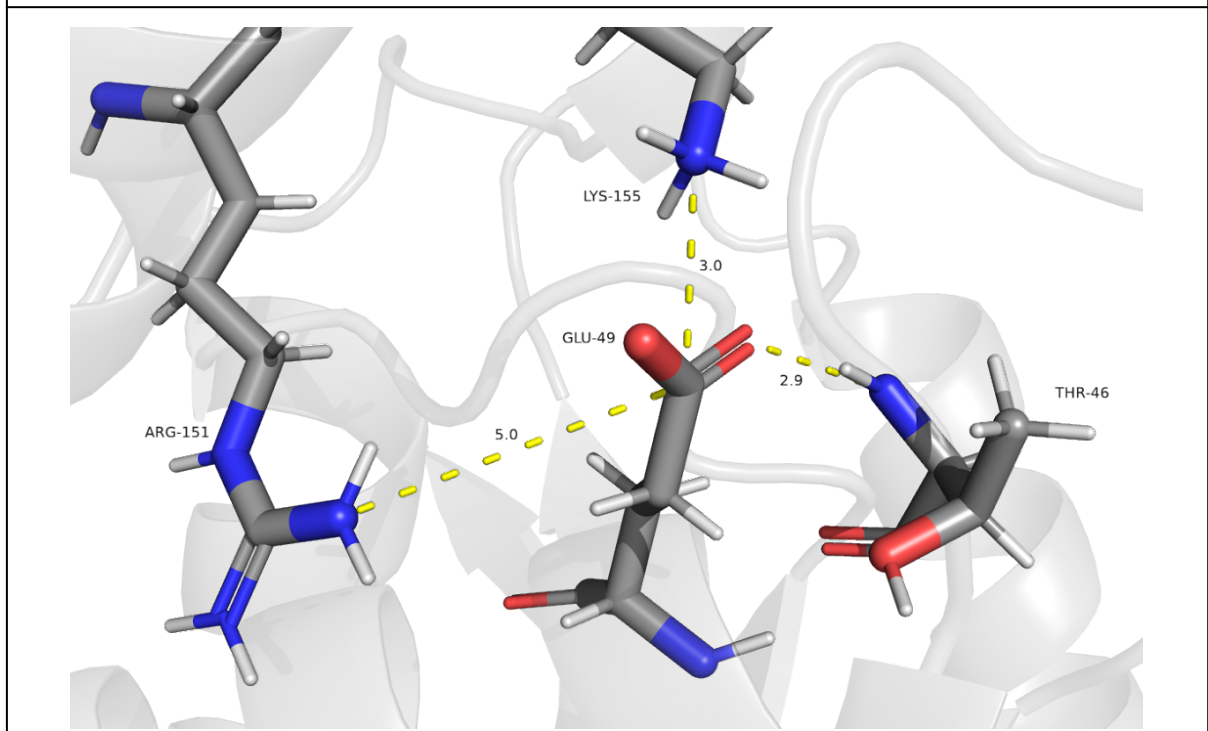


Рисунок 17. Окружение остатка Glu-49, чей pK_a сдвинут в кислую область. Данный остаток взаимодействует с двумя отрицательно заряженными

аминокислотами, а также образует довольно хорошую водородную связь с остатком Thr-46. Снижение его pK_a предсказано верно.

На мой взгляд, протонирование в целом прошло достаточно хорошо; PROPKA справилась с определением аминокислот со сдвинутыми pK_a . Посмотрим, изменилось ли что-то при протонировании структуры, несущей связанный лиганд (лиганд предварительно был удален).

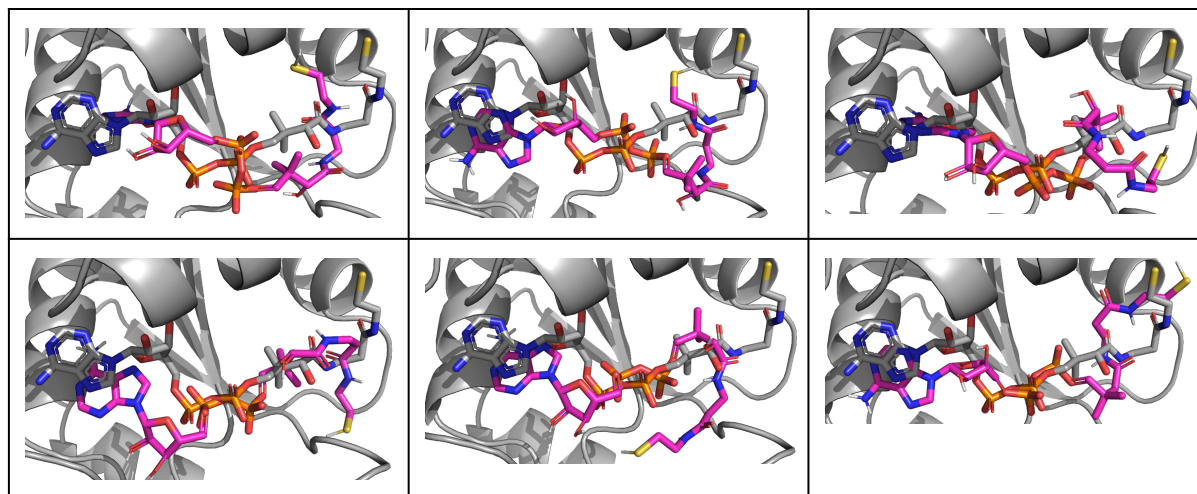
Остаток	Номер	pK_a	Референсная pK_a	Абсолютная разница
CYS	6	12.23	9.0	3.23
HIS	17	3.73	6.5	2.77
ARG	151	14.46	12.5	1.96
ASP	29	1.89	3.8	1.91
GLU	49	2.75	4.5	1.75

Таблица 2. Пять остатков, чье pK_a наиболее сильно отклоняется от теоретического для структуры, несущей связанный лиганд.

Мы не видим изменений в наиболее далеких от оптимального pK_a остатках, что позволяет предположить, что эти остатки располагаются достаточно далеко от сайта связывания лиганда.

Докинг

Используем полученные структуры для докинга. Веб-версия AutoDock Vina выдает 9 лучших поз, которые удалось найти.



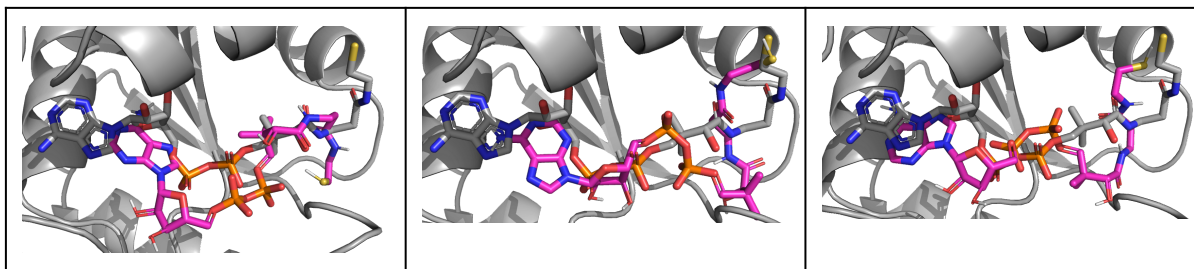


Рисунок 18. Найденные в ходе докинга позы.

Стоит отметить, что докинг не находит наиболее оптимальную позу, однако 2 из них (2 и 6) наиболее приближены к тому, что мы видим в реальной структуре. Посмотрим на карту взаимодействий между лучшей позой (поза 1), наиболее близкой к исходной (поза 2) и положением лиганда в bound-структуре.

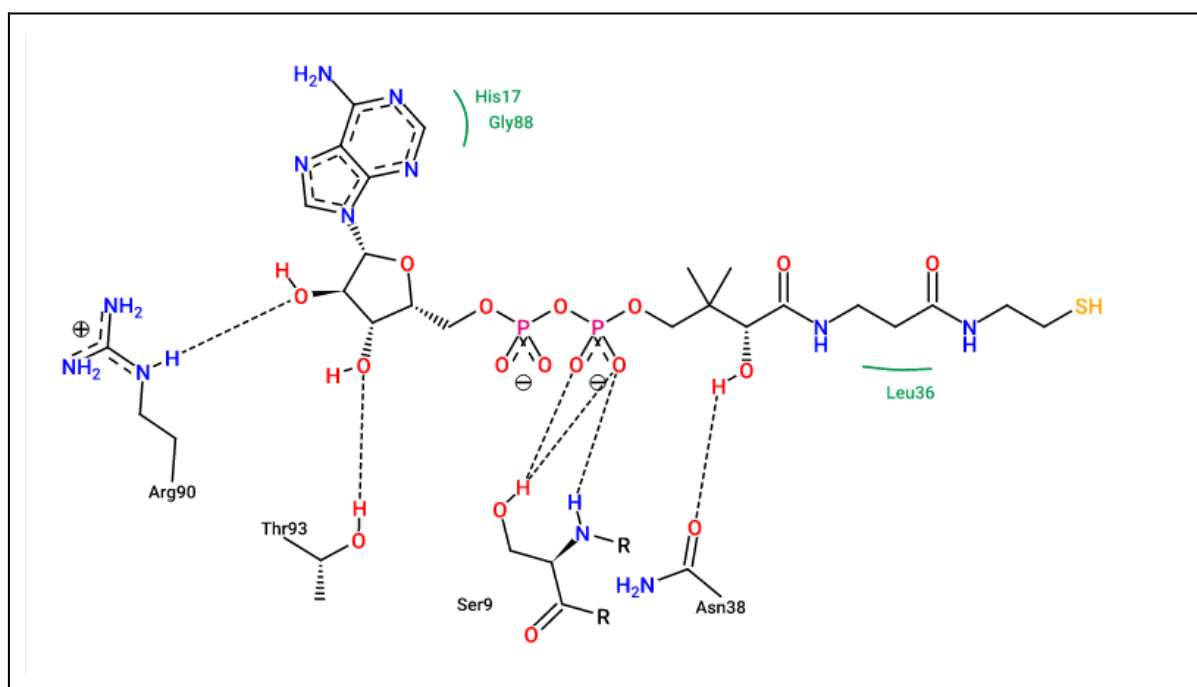


Рисунок 19. Взаимодействия наилучшей позы, полученной Webina, со структурой, не несущей связанный лиганд.

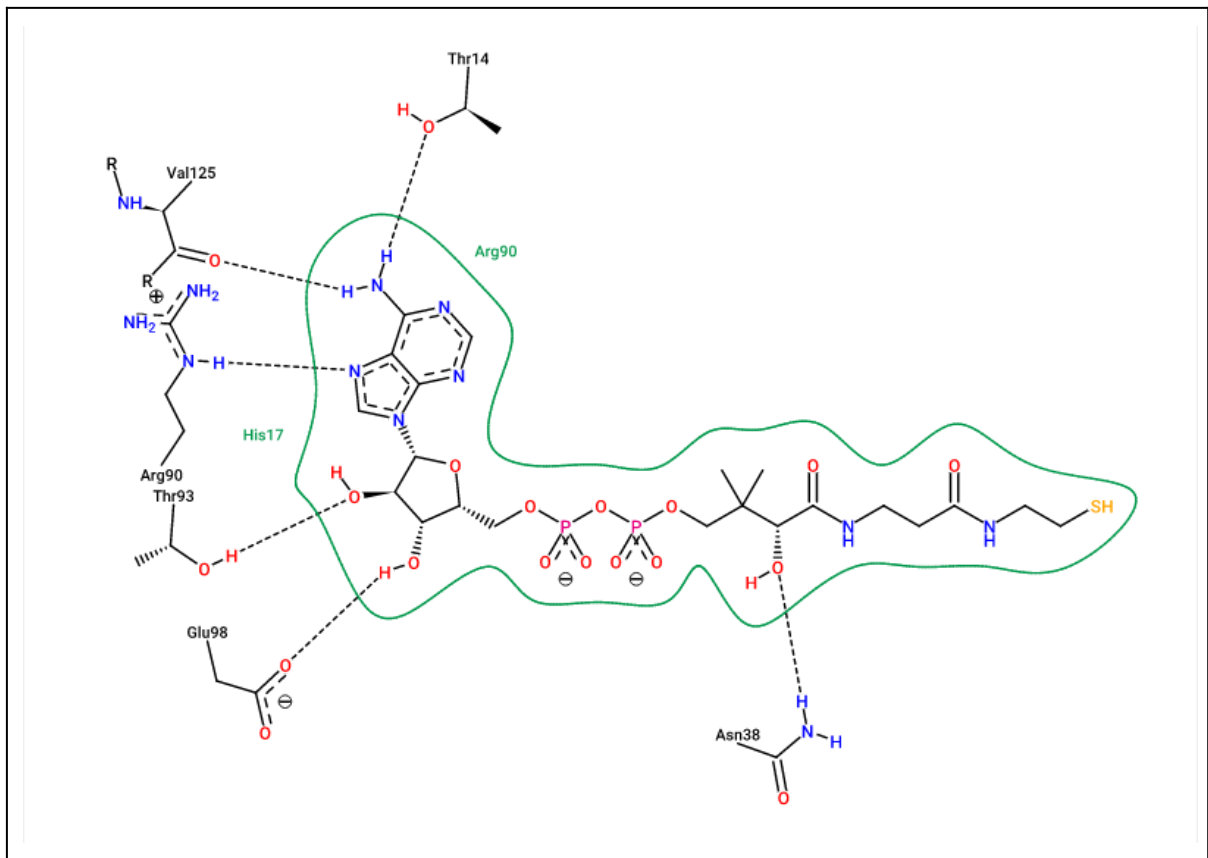


Рисунок 20. Взаимодействия позы, наиболее похожей на позу, которую мы видим в комплексе субстрата и белка, полученной Webina, со структурой, не несущей связанный лиганд.

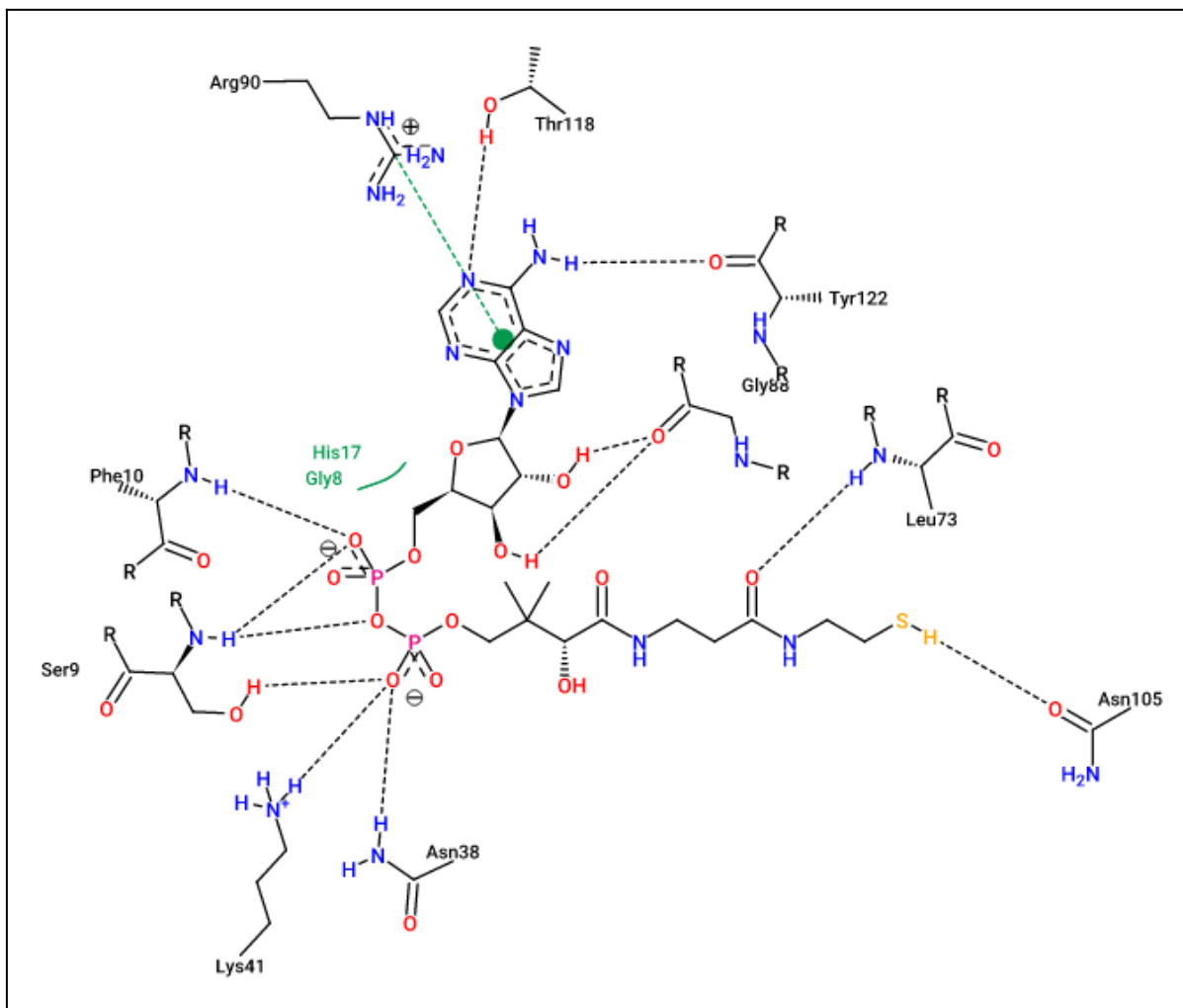


Рисунок 21. Взаимодействия лиганда с белком в связанной форме.

Взаимодействия в bound-форме	Поза 1	Поза 2
Ser9	+	
Phe10		
His17	+	+
Asn38	+	+
Lys41		
Leu73		
Gly88		
Arg90	+	+
Asn105		

В данном случае наблюдается модель индуцированного соответствия: белок с лигандом немного подстраиваются друг под друга в процессе взаимодействия.

Во-первых, мы видим изменения структуры белка на макроуровне (движение достаточно крупных петель), которое является необходимым для хорошего связывания лиганда. Остаток Asp-38 располагается на достаточно далекой петле, которая в процессе связывания должна изменить свое пространственное положение. Лиганд в процессе связывания вероятно “цепляет” данный остаток и данную петлю за счет водородной связи с ОН-группой, “подтаскивает” ее к центру связывания, где взаимодействие перескакивает уже на более эффективное (с кислородом фосфата), а также появляются новые (например, с остатком лизина-41).

Вторым индуктором связывания, видимо, является аденин. Здесь индуцирующим взаимодействием может быть взаимодействие с остатком Arg-90: в связанной структуре данный остаток образует π -катионное взаимодействие с аденином, такое же взаимодействие мы наблюдаем для позы 2; в позе 1 аргинин не принимает участие в связывании аденина. Поэтому можно предположить, что еще одним важным якорным взаимодействием для связывания аденина является стекинг-взаимодействие с остатком гистидина-17. В связанной структуре мы видим не самый оптимальный Т-стекинг, однако он является геометрически оптимальным для позы 1. Возможно, правильный Т-стекинг с данным остатком ориентирует аденин в составе лиганда, что приводит к стабилизации и установлению верных взаимодействий в первую очередь с остатком аргинина-90.

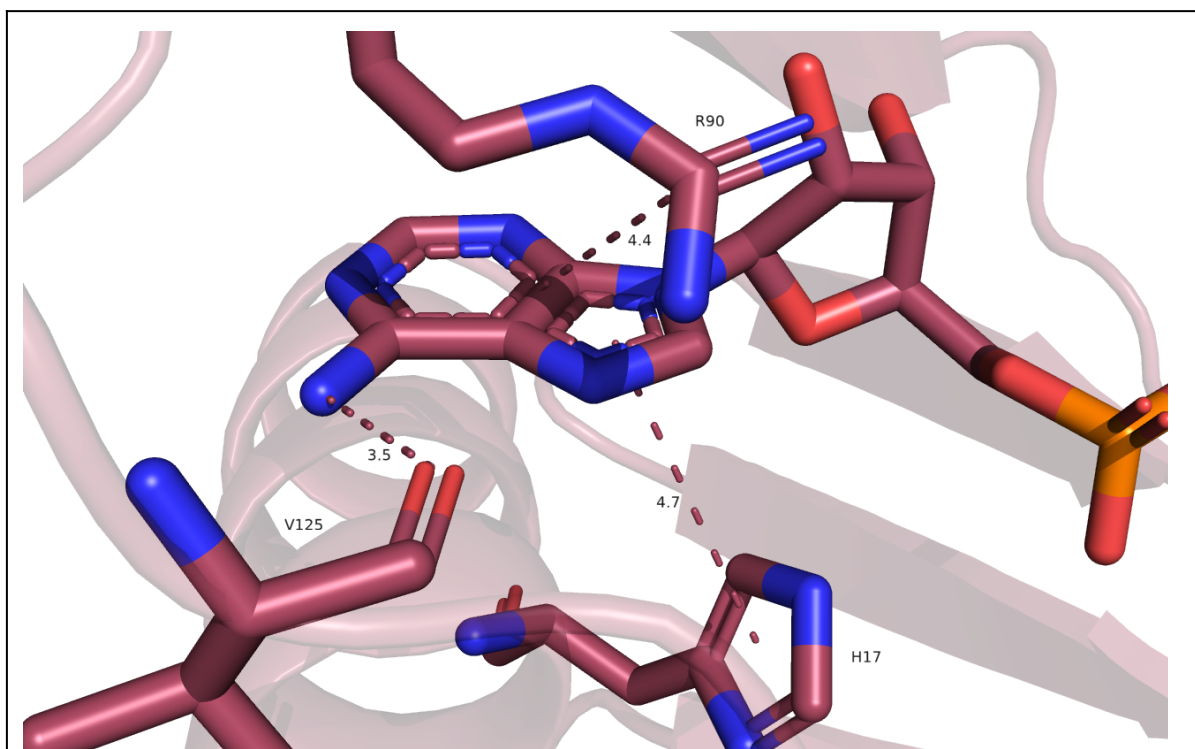


Рисунок 22. Взаимодействие аденина с аминокислотными остатками сайта

связывания для истинного положения лиганда в связанной структуре.

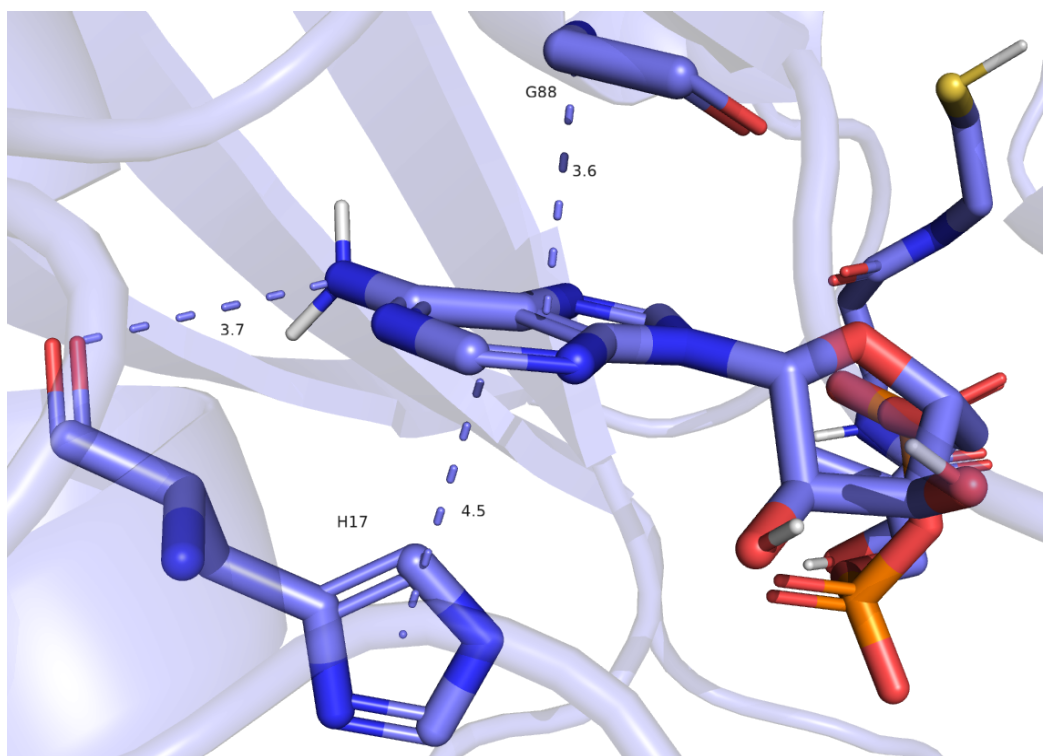


Рисунок 23. Взаимодействие аденина с аминокислотными остатками сайта связывания для позы 1.

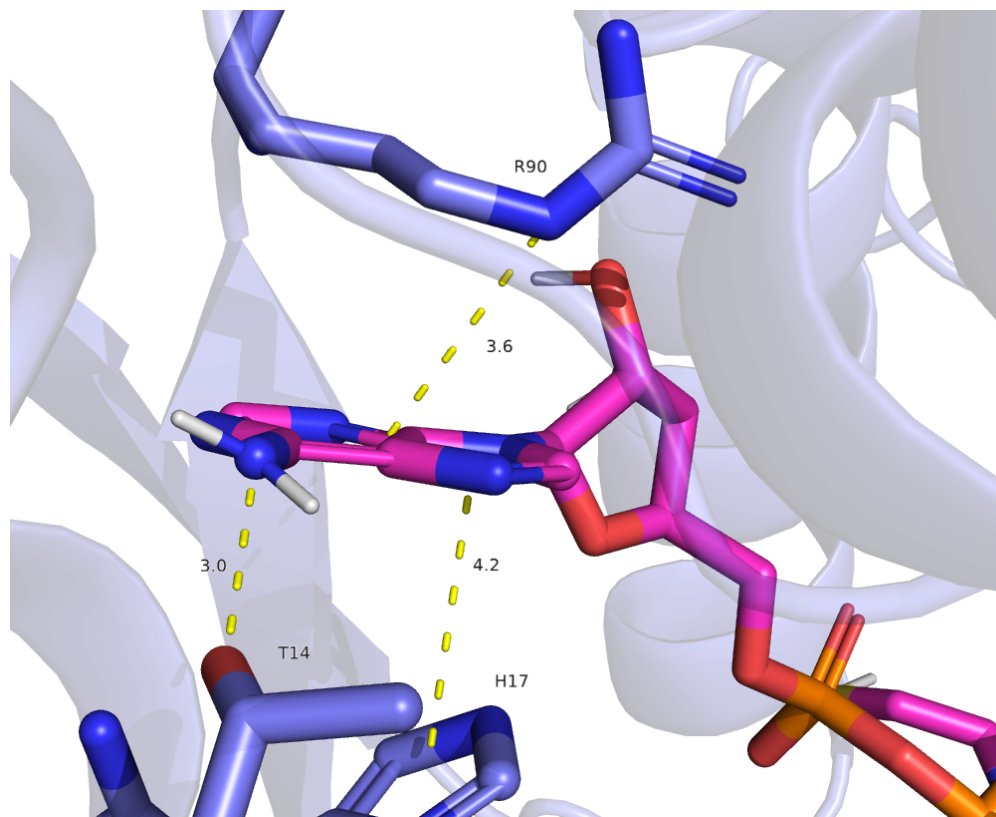


Рисунок 24. Взаимодействие аденина с аминокислотными остатками сайта связывания для позы 2.

Важным взаимодействием может происходить с остатком Ser-9, который также образует водородные связи с остатками фосфата.

Также стоит отметить, что PoseView находит наиболее оптимальные взаимодействия, однако может пропускать некоторое количество слабых взаимодействий:

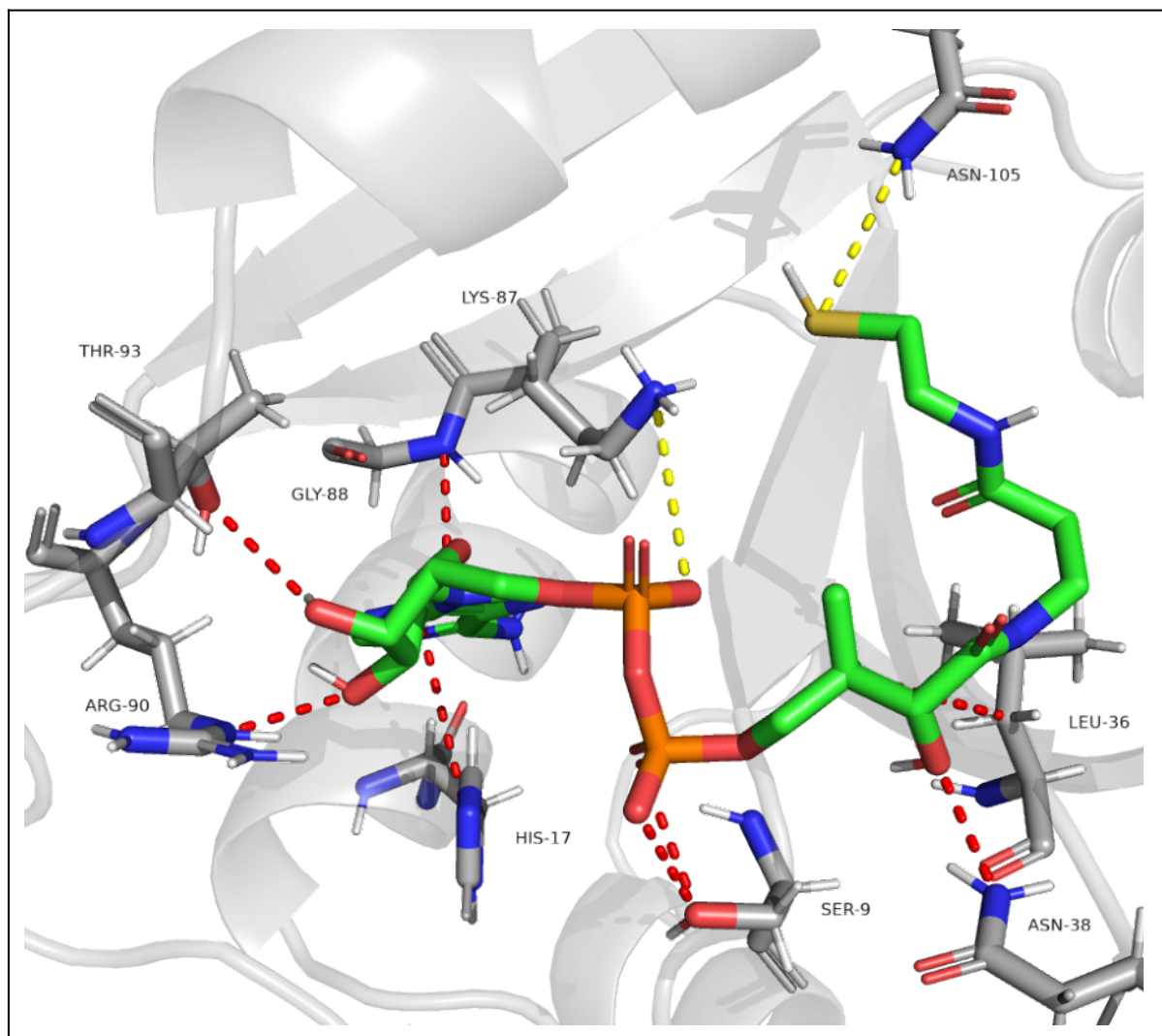


Рисунок 25. Взаимодействия лиганда из позы 1 с белком. Красным покрашены взаимодействия, найденные PoseView, желтым -- возможные найденные (слабая водородная связь с остатком Asn105 и электростатические взаимодействия с остатком Lys87).

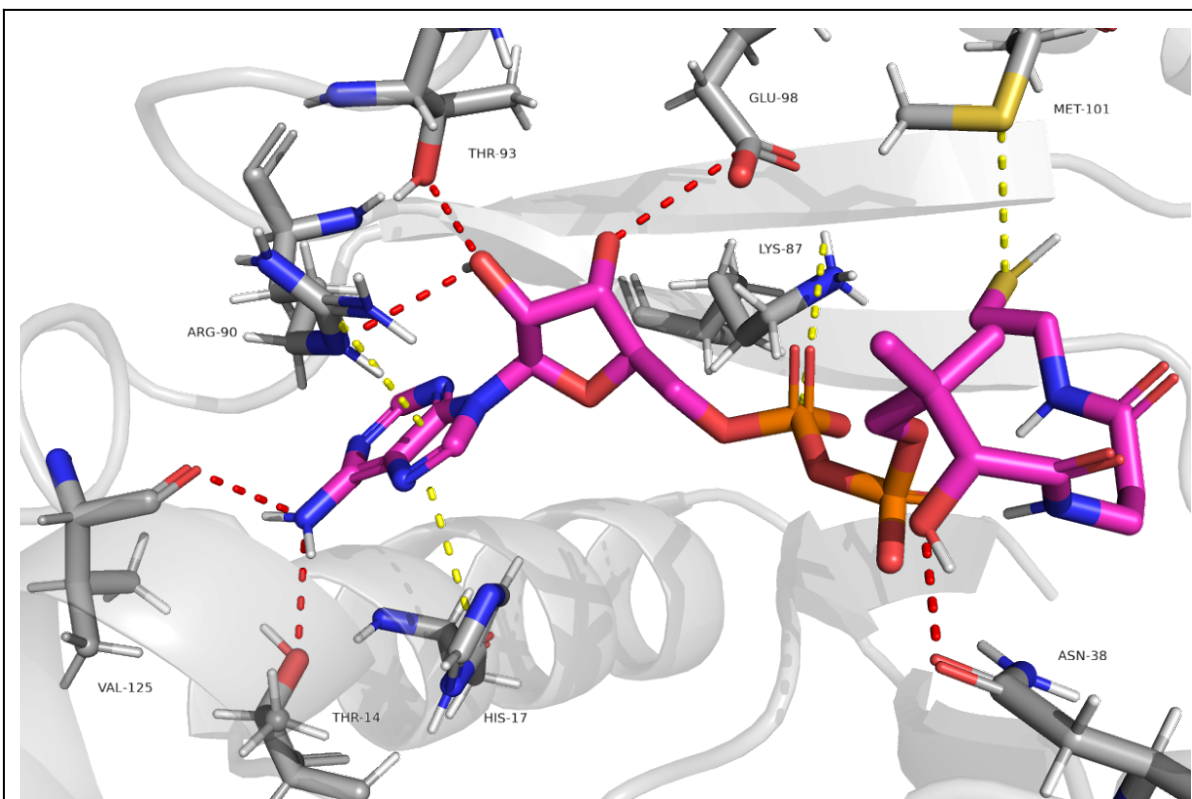


Рисунок 26. Взаимодействия лиганда из позы 2 с белком. Красным покрашены взаимодействия, найденные PoseView, желтым -- возможные ненайденные (слабая водородная связь с остатком Met101, электростатические взаимодействия с остатком Lys87, слабый стекинг с остатком His-17 и катион- π -взаимодействия с остатком Arg90).