

Лабораторная работа 4

Анализ взаимодействий ингибитора с белком — механизмы связывания и визуализация
ЦЕЛЬ РАБОТЫ :

1. Освоить методы анализа взаимодействий в комплексе «белок–лиганд».
2. Научиться интерпретировать типы взаимодействий: водородные, гидрофобные, ионные, $\pi-\pi$ и $\pi\text{--cation}$ контакты.
3. Освоить использование современных инструментов (PLIP и UCSF ChimeraX) для анализа механизмов действия ингибитора.
4. Понять, как пространственное расположение атомов и химические свойства определяют эффективность связывания ингибитора с белковой мишенью.

ПОДГОТОВКА ДАННЫХ

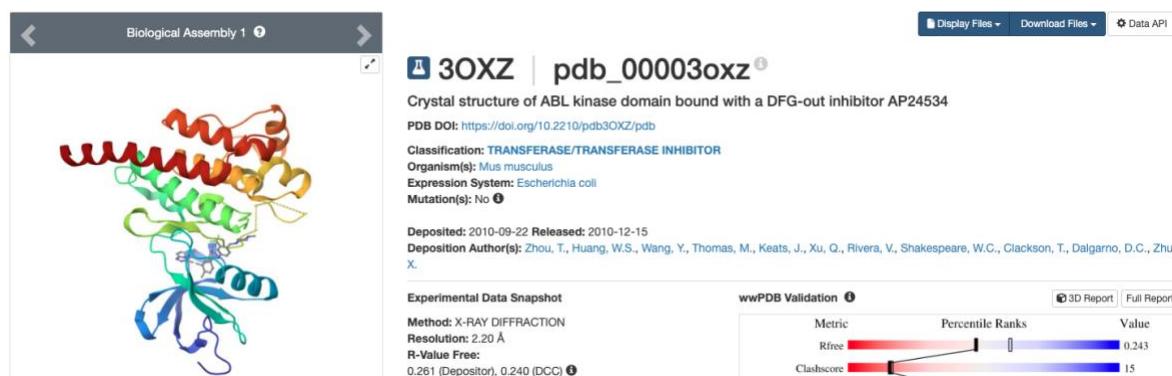
1.1. Выберите белок-мишень, использованный в предыдущих лабораторных работах ([мишени](#)).

ABL kinase (native)

Crystal structure of ABL kinase domain bound with a DFG-out inhibitor AP24534

Code in PDB: 3oxz

1.2. Перейдите на сайт <https://www.rcsb.org> и найдите структуру комплекса белка с ингибитором.



3OXZ — Кристаллическая структура домена киназы ABL, связанного с ингибитором DFG-out AP24534

1.3. Скачайте файл .pdb (в нём должны быть разделы ATOM и HETATM).

1.4. Откройте файл в UCSF ChimeraX, чтобы убедиться, что лиганд корректно отображается в активном центре.



2. АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ПОМОЩЬЮ PLIP

2.1. Перейдите на сайт [PLIP](#).

2.2. Нажмите **Upload Structure** и выберите файл .pdb.

2.2. После загрузки нажмите **Analyze Structure** и дождитесь завершения анализа.

2.3. PLIP выполнит автоматическую идентификацию всех контактов между белком и ингибитором.

Результат анализа включает:

- список взаимодействий (водородные, гидрофобные, ионные, $\pi-\pi$ и др.),
 - 3D визуализацию комплекса,
 - 2D схему взаимодействий (в любом удобном формате).

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	248A	LEU	3.77	2170	178
2	286A	GLU	3.64	2183	431
3	313A	ILE	3.88	2159	643
4	315A	THR	3.63	2158	659
5	370A	LEU	3.87	2177	1097
6	381A	ASP	3.90	2185	1177
7	382A	PHE	3.77	2156	1190

▼ Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	286A	GLU	2.16	2.99	141.82	✗	✓	2182 [Nam]	434 [O2]
2	318A	MET	1.72	2.68	164.19	✓	✗	680 [Nam]	2154 [Nar]
3	381A	ASP	1.71	2.67	164.92	✓	✗	1173 [Nam]	2181 [O2]

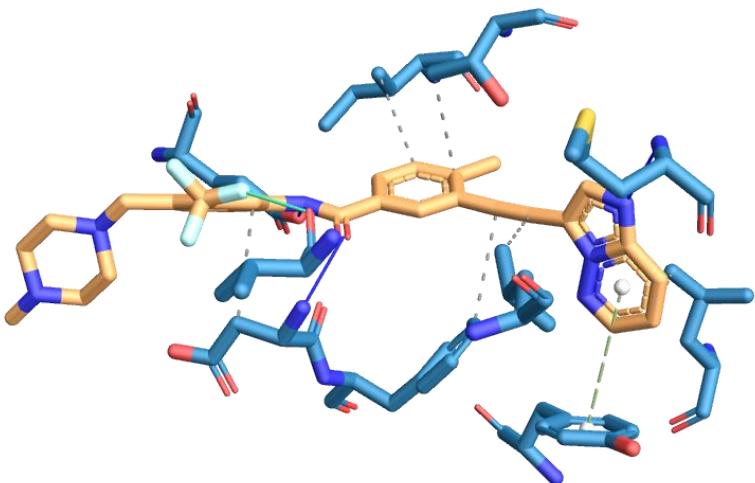
▼ π-Stacking

Index	Residue	AA	Distance	Angle	Offset	Stacking Type	Ligand Atoms
1	253A	TYR	4.83	79.27	1.14	T	2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174

▼ Halogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance	Donor Angle	Acceptor Angle	Donor Atom	Acceptor Atom
1	379A	VAL	2.85	152.05	116.44	2188 [F]	1164 [O2]

Сохраните таблицу взаимодействий и 2D схему для отчёта.



3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Изучите таблицу взаимодействий в PLIP:

- **Residue** — аминокислота белка, участвующая в контакте;
- **Type** — тип взаимодействия;
- **Distance** — расстояние между атомами (в Å).

3.2. Определите **основные аминокислоты**, которые стабилизируют ингибитор в активном центре.

LEU 248, GLU 286, ILE 313, THR 315, LEU 370, ASP 381, PHE 382 — гидрофобные контакты.

GLU 286, MET 318, ASP 381 — формируют водородные связи.

TYR 253 — участвует в π -стэкинге.

VAL 379 — образует галогеновую связь.

3.3. Сравните типы взаимодействий — какие из них чаще встречаются, а какие обеспечивают специфичность связывания.

Тип взаимодействия	Частота (пример)	Специфичность получения
Гидрофобные	7	Средняя
Водородные	3	Высокая
π -стэкинг	1	Высокая
Галогеновые	1	Высокая

3.4. Сделайте вывод: за счёт каких взаимодействий ингибитор фиксируется в белке.

Ингибитор фиксируется в белке за счёт совокупности различных несиловых взаимодействий между атомами его структуры и аминокислотными остатками активного центра:

- **Гидрофобные взаимодействия** — основной вклад в фиксацию ингибитора; такие контакты позволяют молекуле хорошо «сидеть» в кармане белка за счёт притяжения неполярных участков.
- **Водородные связи** — обеспечивают специфическую ориентацию и сильную фиксацию отдельных частей ингибитора благодаря точному совпадению доноров и акцепторов.
- **π -стэкинг** — создаёт дополнительную селективность, если в ингибиторе и в белке присутствуют ароматические группы, усиливая закрепление в специфической позиции.

- Галогеновые связи — иногда усиливают стабильность комплекса, если ингибитор содержит подходящие атомы галогенов.

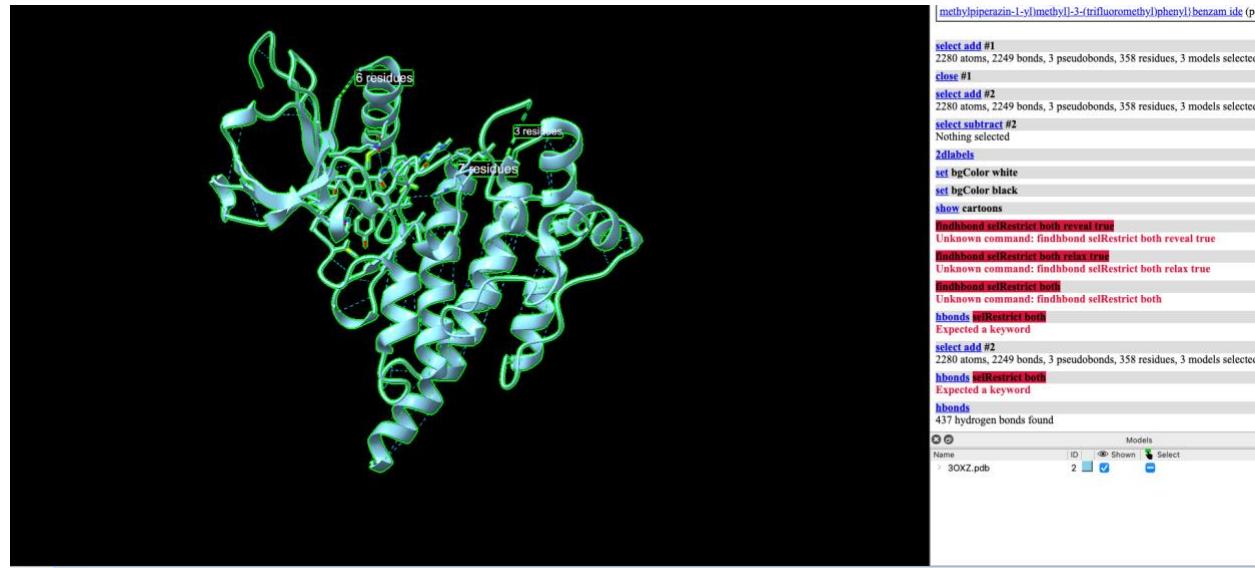
Таким образом, прочность и специфичность фиксации ингибитора в белке достигается за счёт сочетания гидрофобных контактов (частые), водородных связей (специфические), а также дополнительных π -стэкинг и галогеновых взаимодействий

4. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ В UCSF CHIMERA X

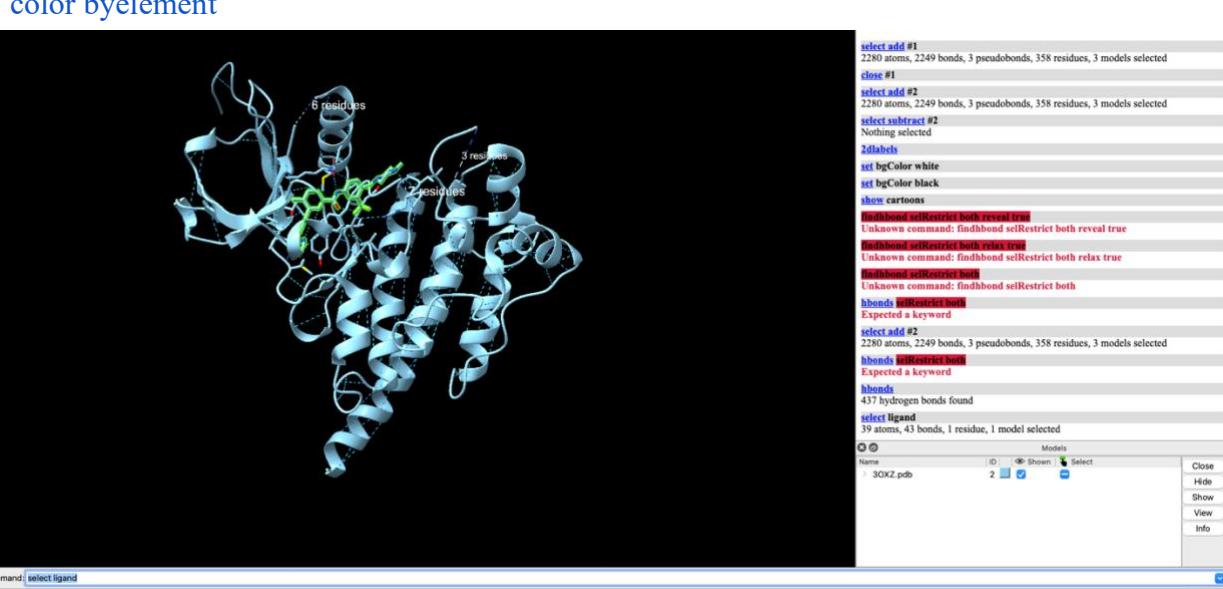
4.1. Откройте тот же файл .pdb в ChimeraX.

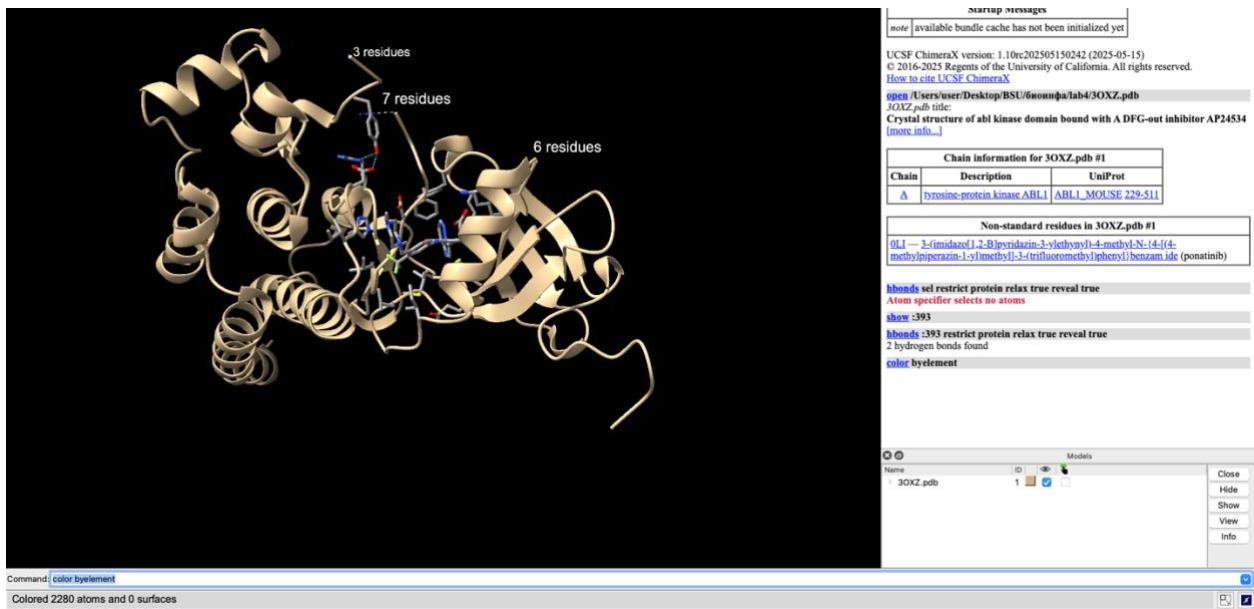
Используйте команды:

`findhbond selRestrict both reveal true`



`color byelement`





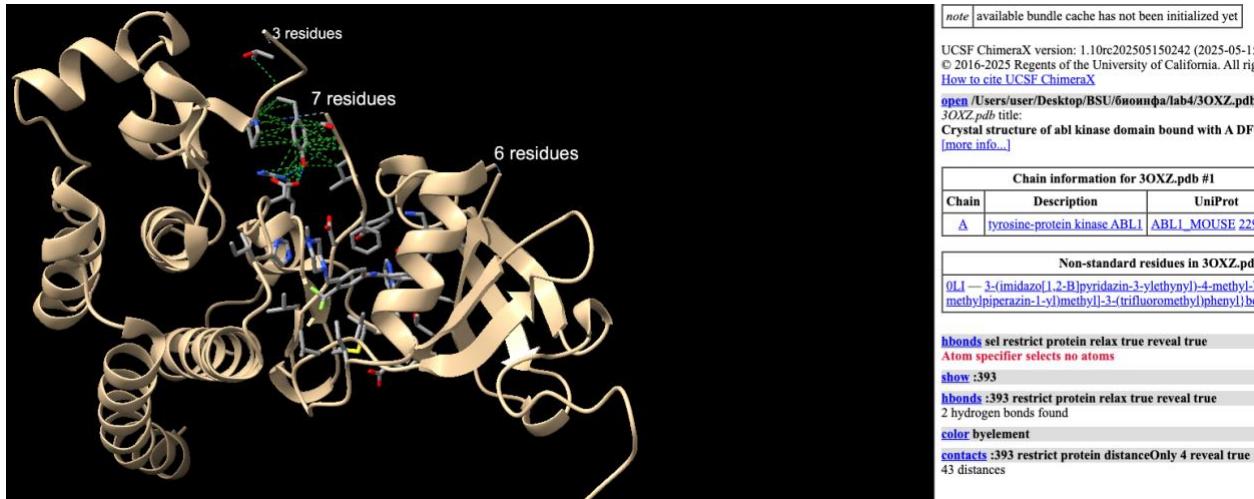
Command: color byelement

Colored 2280 atoms and 0 surfaces

Эти команды отобразят водородные связи и контакты между белком и лигандом.

4.2. Для отображения ароматических взаимодействий:

[contacts sel radius 4.5](#)



4.3. Сделайте 3 скриншота:

общий вид комплекса;

водородные связи (пунктиром);

гидрофобные контакты (серые области).

Отметьте аминокислоты, участвующие в связывании.

5. Сравнение с другим ингибитором

5.1. Найдите вторую структуру того же белка, но с другим ингибитором.



5.2. Повторите анализ в PLIP.

Сравните:

- число взаимодействий;
- типы (водородные, ионные, $\pi-\pi$ и т.д.);
- общие аминокислоты, участвующие в связывании.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	248A	LEU	3.63	8361	114
2	253A	TYR	3.70	8360	145
3	256A	VAL	3.92	8366	167
4	269A	ALA	3.62	8395	277
5	299A	VAL	3.96	8377	495
6	313A	ILE	3.83	8374	599
7	315A	THR	3.88	8373	615
8	370A	LEU	3.71	8360	1062
9	381A	ASP	3.68	8380	1141
10	382A	PHE	3.86	8366	1154

Hydrogen Bonds

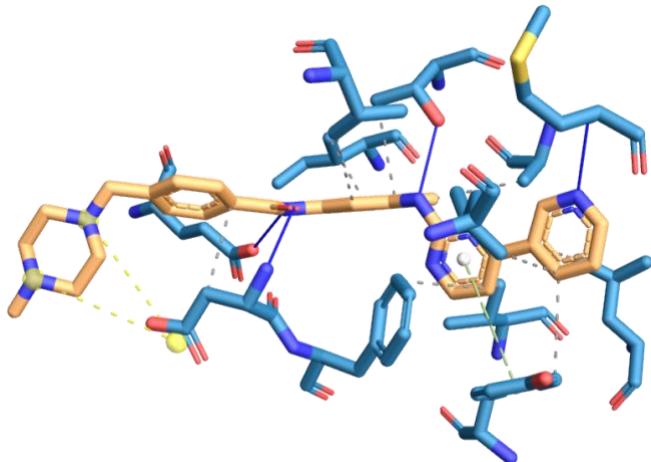
Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	286A	GLU	2.24	3.09	143.11	✗	✓	8378 [Nam]	400 [O2]
2	315A	THR	2.34	3.01	124.55	✗	✓	8371 [Npl]	614 [O3]
3	318A	MET	2.00	2.94	158.24	✓	✗	636 [Nam]	8363 [Nar]
4	381A	ASP	2.08	2.98	150.55	✓	✗	1137 [Nam]	8394 [O2]

π -Stacking

Index	Residue	AA	Distance	Angle	Offset	Stacking Type	Ligand Atoms
1	253A	TYR	5.03	78.26	1.48	T	8365, 8366, 8367, 8368, 8369, 8370

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	381A	ASP	5.49	✗	Tertamine	8390
2	381A	ASP	5.34	✗	Tertamine	8387



Число взаимодействий

- **Гидрофобные взаимодействия:**
 - Ингибитор1: 7 контактов (LEU, TYR, GLU, ILE, THR, ASP, PHE)
 - Ингибитор2: 10 контактов (LEU, TYR, VAL, ALA, ILE, THR, ASP, PHE; в том числе по два разных VAL и LEU)
- **Водородные связи:**
 - Ингибитор1: 3 контакта (GLU, MET, ASP)
 - Ингибитор2: 4 контакта (GLU, THR, MET, ASP)
- **π -стэкинг:**
 - Оба ингибитора: 1 контакт (TYR)
- **Ионные (Salt Bridges):**
 - Ингибитор1: отсутствуют.
 - Ингибитор2: 2 контакта (ASP)

Типы взаимодействий

Тип	Ингибитор1	Ингибитор2
Гидрофобные	есть	есть
Водородные	есть	есть
π -стэкинг	есть	есть
Ионные	нет	есть

Общие аминокислоты, участвующие в связывании

- В оба ингибитора имеют аминокислоты LEU, TYR, ILE, THR, ASP, PHE, GLU, MET.
- Все основные аминокислоты, которые фиксируют или стабилизируют ингибитор, представлены в обоих анализах.
- В новой фотографии чуть больше подробностей по гидрофобным контактам (дополнительные VAL, ALA), а также присутствуют ионные взаимодействия с участием аспартата (ASP)

5.3. Сделайте вывод: какой ингибитор формирует более устойчивый и специфичный комплекс.

Сравнительный анализ взаимодействий двух ингибиторов с ABL1 показывает, что оба формируют ключевые контакты с остатками активного центра белка, такими как LEU, TYR, ILE, THR, ASP, PHE, GLU и MET. Основными типами взаимодействий являются гидрофобные контакты, водородные связи и π -стэкинг, обеспечивающие фиксирование и ориентацию молекул в активном сайте. У ингибитора 1 (AP24534) отмечается 7 гидрофобных контактов, 3 водородные связи и один π -стэкинг, тогда как ингибитор 2 дополнительно формирует 10 гидрофобных контактов, 4 водородные связи и 2 ионные взаимодействия, усиливающие стабильность комплекса.

Дополнительные гидрофобные контакты с VAL и ALA у ингибитора 2 расширяют площадь взаимодействия и повышают плотность связывания в гидрофобном кармане белка. Появление ионных взаимодействий с ASP также увеличивает специфичность связывания, делая комплекс более селективным. Водородные связи и π -стэкинг у обоих ингибиторов обеспечивают правильную ориентацию молекулы в активном центре, но их количество и комбинация у ингибитора 2 создают более прочную и устойчивую сеть контактов.

Таким образом, ингибитор 2 формирует более устойчивый и специфичный комплекс с ABL1 по сравнению с AP24534, благодаря совокупности увеличенного числа гидрофобных контактов и дополнительных ионных связей. Ингибитор 1 также стабилен, но меньшая площадь взаимодействия и отсутствие ионных контактов делают его комплекс менее специфичным и потенциально менее эффективным. Эти различия важны для понимания механизма связывания и оптимизации ингибиторов для селективного ингибирования киназы.

1. Почему водородные и гидрофобные взаимодействия являются ключевыми для связывания?

- **Водородные связи:** это слабые электростатические взаимодействия между донором водорода ($-\text{OH}$, $-\text{NH}$) и акцептором (O, N). Они обеспечивают **специфичное направленное связывание** лиганда с белком. Водородные связи играют важную роль в **ориентации лиганда в активном центре** и помогают удерживать его в правильной позиции.
- **Гидрофобные взаимодействия:** возникают между неполярными участками молекул (например, боковыми цепями аминокислот, как фенилаланин, лейцин, изолейцин). Они способствуют **термодинамически выгодному "выдавливанию воды" из активного центра**, что увеличивает энергию связывания.
- Вместе эти взаимодействия **обеспечивают как специфичность, так и стабильность комплекса**, позволяя лиганду надежно «сидеть» в активном центре белка.

2. Что такое π – π и π –cation взаимодействия и как они влияют на стабильность комплекса?

- **π – π взаимодействия:** взаимодействие между ароматическими кольцами (например, фенилаланин – бензольное кольцо лиганда). Эти взаимодействия стабилизируют комплекс за счет **сопряженного распределения электронов**.
 - **π –cation взаимодействия:** взаимодействие между положительно заряженной группой (например, лизин, аргинин) и ароматическим кольцом лиганда. Эти взаимодействия **дополнительно укрепляют связь**, особенно когда лиганд содержит ароматические группы.
 - **Влияние на стабильность:** такие взаимодействия повышают **энергетическую стабильность комплекса**, уменьшают подвижность лиганда и повышают специфичность связывания.
-

3. Какие аминокислоты чаще всего участвуют в связывании с лигандами?

Чаще всего участвуют:

- **Полярные и способные к водородным связям:** серин (Ser), треонин (Thr), тирозин (Tyr), аспарагин (Asn), глутамин (Gln).
- **Заряженные:** аспартат (Asp), глутамат (Glu), лизин (Lys), аргинин (Arg), гистидин (His).
- **Гидрофобные:** фенилаланин (Phe), лейцин (Leu), изолейцин (Ile), валин (Val), триптофан (Trp).
- **Особые случаи:** цистеин (Cys) может образовывать ковалентные связи с некоторыми лигандами.

То есть аминокислоты выбираются в зависимости от **характера лиганда и типа взаимодействия**, которое он формирует.

4. Почему изменение одной функциональной группы ингибитора может изменить его эффективность?

- Функциональные группы отвечают за **ключевые взаимодействия с белком**: водородные связи, ионные взаимодействия, гидрофобные контакты.
- Изменение группы может:
 - **Разрушить важное взаимодействие**, уменьшив аффинность лиганда.
 - **Изменить конформацию лиганда**, что снизит его способность правильно ориентироваться в активном центре.

- Повлиять на растворимость или проницаемость через клеточные мембранны.
 - Даже небольшие изменения могут резко менять эффективность ингибитора, поэтому химическая оптимизация требует точной структуры–активности.
-

5. Какие методы позволяют оценить стабильность комплекса (например, молекулярная динамика)?

- **Молекулярная динамика (MD):** симуляции движения атомов во времени позволяют видеть динамику комплекса и стабильность связывания.
- **Docking + scoring:** виртуальное «пристыковывание» лиганда к белку с оценкой энергии связывания.
- **MM/PBSA и MM/GBSA:** расчет свободной энергии связывания на основе MD траекторий.
- **Флуоресцентные или спектроскопические методы (экспериментально):** оценка конформационных изменений белка и устойчивости комплекса.
- **Изотермическая калориметрия (ITC) и поверхностный плазмонный резонанс (SPR):** измеряют кинетику и термодинамику связывания напрямую.