

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, π - π и π -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.



Biological Assembly 1

3OXZ | pdb_00003oxz

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

PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb3OXZ/pdb>

Classification: TRANSFERASE/TRANSFERASE INHIBITOR

Organism(s): *Mus musculus*

Expression System: *Escherichia coli*

Mutation(s): No

Deposited: 2010-09-22 Released: 2010-12-15

Deposition Author(s): Zhou, T., Huang, W.S., Wang, Y., Thomas, M., Keats, J., Xu, Q., Rivera, V., Shakespeare, W.C., Clackson, T., Dalgarno, D.C., Zhu, X.

Experimental Data Snapshot

Method: X-RAY DIFFRACTION

Resolution: 2.20 Å

R-Value Free: 0.261 (Depositor), 0.240 (DCC)

wwPDB Validation

Metric	Percentile Ranks	Value
Rfree		0.243
Clashscore		15

3D Report | Full Report

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

1.3. Скачайте файл **.pdb** (в нём должны быть разделы **АТОМ** и **НЕТАТМ**).

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](https://plip.bio.uni-goettingen.de/).

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

enter PDB ID (e.g. 1xdn) or

Find PDB ID using our search tool

30XZ.pdb

Choose file...

> Advanced Options

ANALYZE

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

Binding Sites in 30XZ
(tyrosine-protein kinase abt1)

SMALLMOLECULE
0LI (ponatinib)
0LI-A-1

Results in XML format
Results in RST format

Your results will be available for 30 days using the current URL

30XZ in the PDB
How to Cite Us
Run another analysis

SMALLMOLECULE
0LI (ponatinib)
0LI-A-1 ★

Interacting chains: A

Protein
Ligand
Water
Charge Center
Aromatic Ring Center
Metal Ion

Hydrophobic Interaction
Hydrogen Bond
Water Bridge
n-Stacking (parallel)
n-Stacking (perpendicular)
n-Cation Interaction
Halogen Bond
Salt Bridge
Metal Compensation

Download visualization in PyMol format (.pse)
Download visualization as image (.png)

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	x	x	2182 [Nam]	434 [O2]
2	318A	MET	1.72	2.68	164.19	✓	x	680 [Nam]	2154 [Nar]
3	381A	ASP	1.71	2.67	164.92	✓	x	1173 [Nam]	2181 [O2]

n-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]

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

Результат анализа включает:

- список взаимодействий (водородные, гидрофобные, ионные, π - π 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]

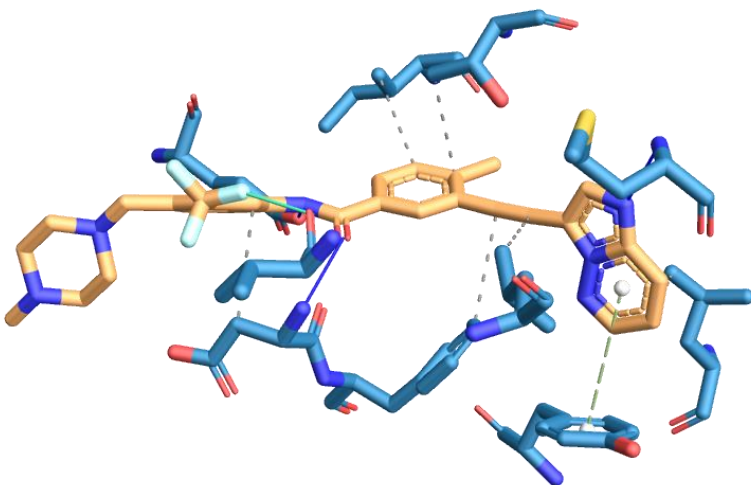
▼ π -Stacking

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.

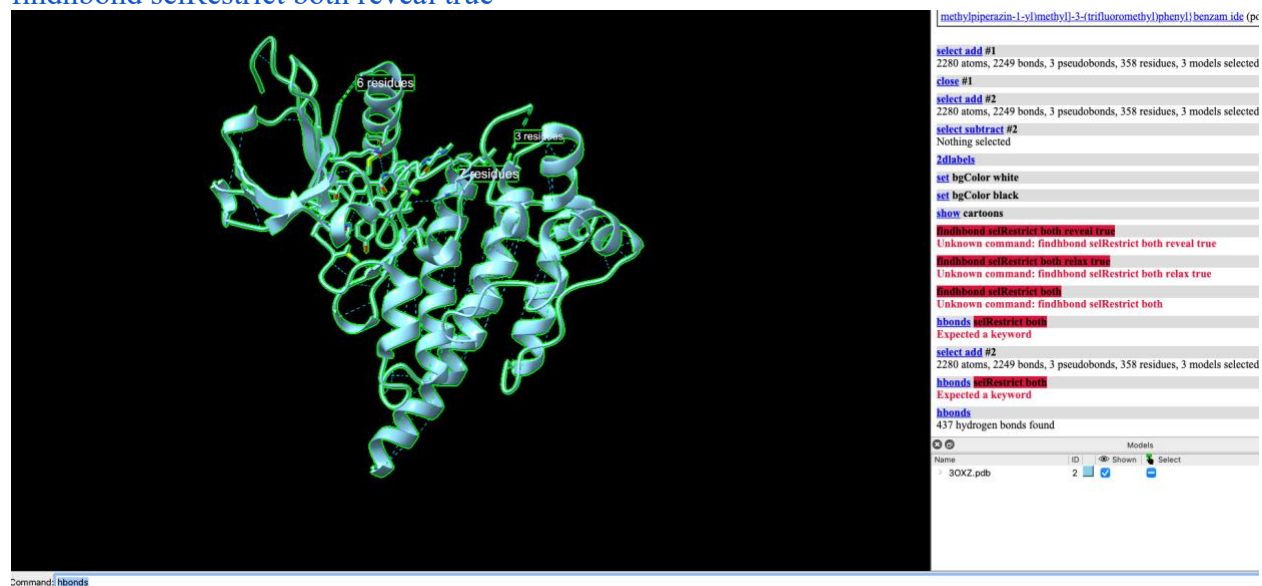
Таким образом, прочность и специфичность фиксации ингибитора в белке достигается за счёт сочетания гидрофобных контактов (частые), водородных связей (специфические), а также дополнительных π -стэкинг и галогеновых взаимодействий

4. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ В UCSF CHIMERA X

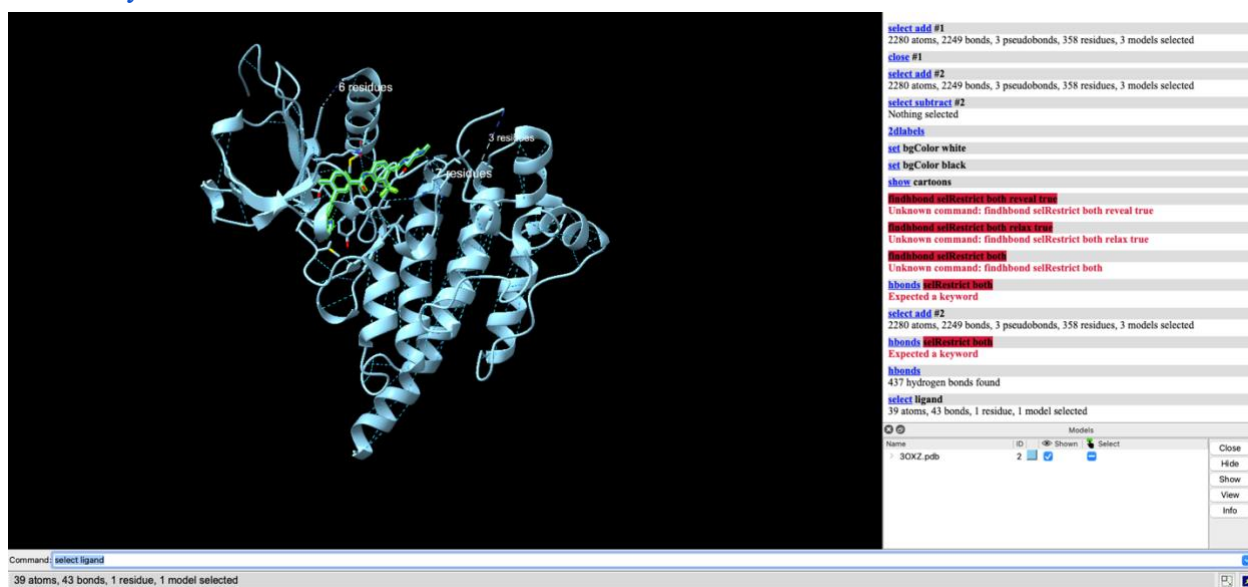
4.1. Откройте тот же файл .pdb в ChimeraX.

Используйте команды:

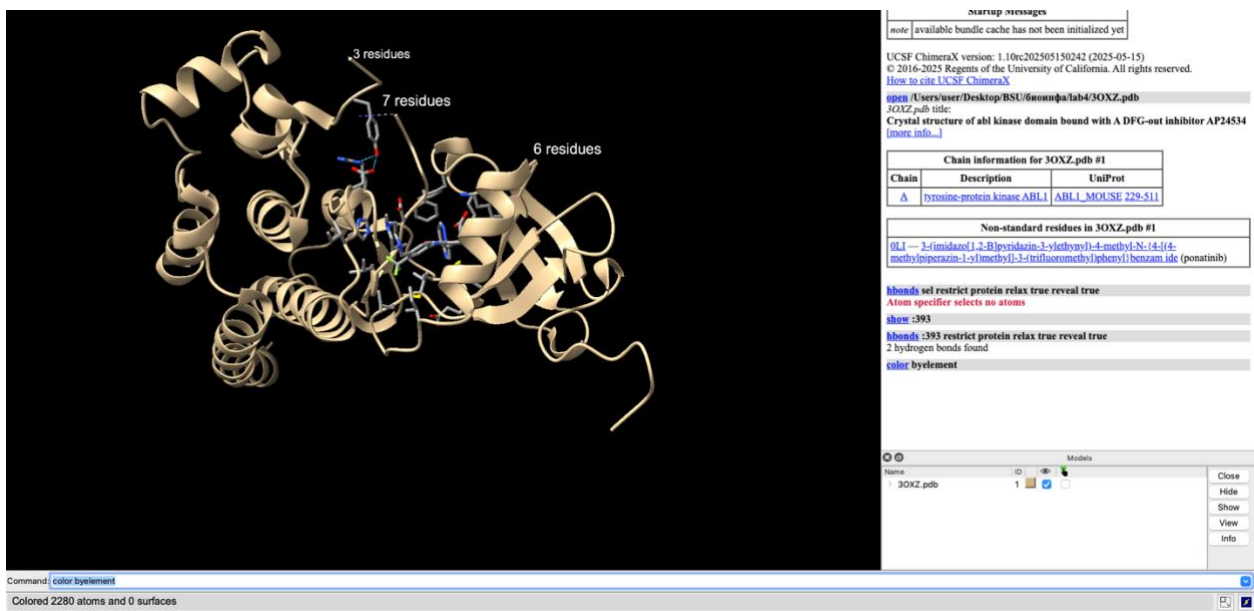
`findhbond selRestrict both reveal true`



`color byelement`

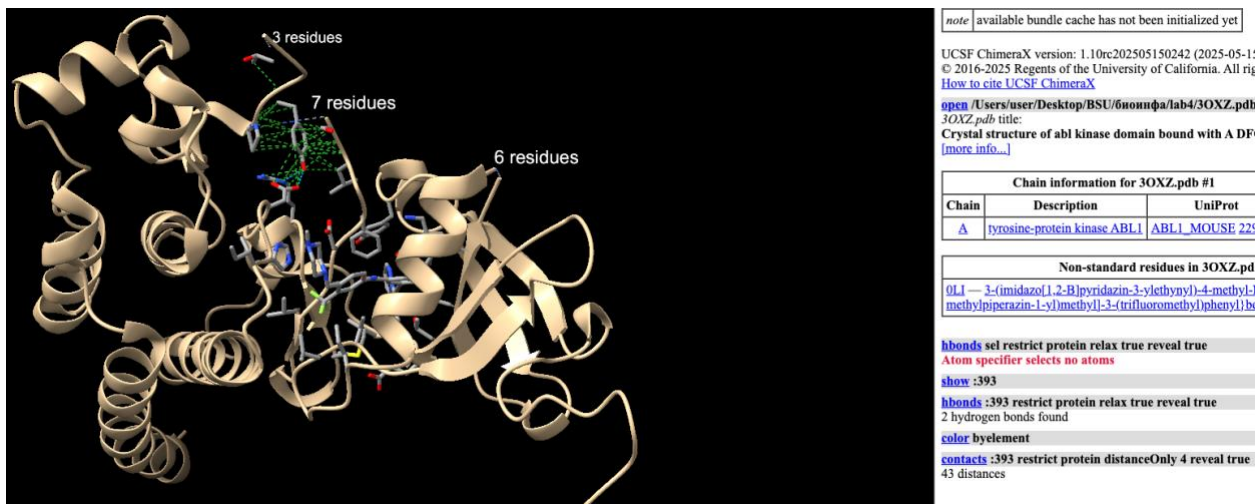


`contacts sel reveal true`



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.



2HYY | **pdb_00002hyy**

Human Abl kinase domain in complex with imatinib (STI571, Glivec)

PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb2HYY/pdb>

Classification: **TRANSFERASE**

Organism(s): *Homo sapiens*

Expression System: *Spodoptera frugiperda*

Mutation(s): No

Deposited: 2006-08-08 Released: 2007-01-16

Deposition Author(s): Cowan-Jacob, S.W., Fendrich, G., Liebetanz, J., Fabbro, D., Manley, P.

Experimental Data Snapshot

Method: X-RAY DIFFRACTION

Resolution: 2.40 Å

R-Value Free: 0.267 (Depositor), 0.260 (DCC)

R-Value Work: 0.204 (Depositor), 0.200 (DCC)

Starting Model: experimental

View more details

wwPDB Validation

3D Report | Full Report

Metric	Percentile Ranks	Value
Rfree		0.257
Clashscore		10
Ramachandran outliers		0.4%
Sidechain outliers		4.2%
RSRZ outliers		7.7%

Global Symmetry: Asymmetric - C1

Explore in 3D: Structure | Sequence Annotations | Electron Density | Validation Report | Ligand Interaction (STI)

wwPDB Validation

3D Report | Full Report

Metric	Percentile Ranks	Value
Rfree		0.257
Clashscore		10
Ramachandran outliers		0.4%
Sidechain outliers		4.2%
RSRZ outliers		7.7%

Worse | Better

Percentile relative to all X-ray structures

Percentile relative to X-ray structures of similar resolution

5.2. Повторите анализ в PLIP.

Сравните:

- число взаимодействий;
- типы (водородные, ионные, π - π 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

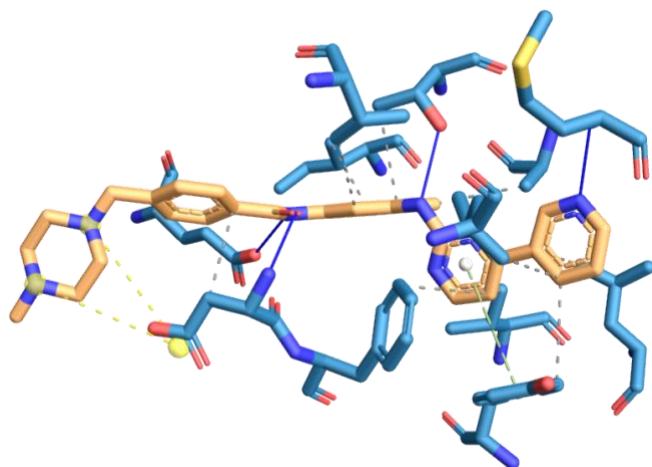
Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Side chain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	286A	GLU	2.24	3.09	143.11	×	✓	8378 [Nam]	400 [O2]
2	315A	THR	2.34	3.01	124.55	×	✓	8371 [Npl]	614 [O3]
3	318A	MET	2.00	2.94	158.24	✓	×	636 [Nam]	8363 [Nar]
4	381A	ASP	2.08	2.98	150.55	✓	×	1137 [Nam]	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)
 - Ингибитор: 4 контакта (GLU, THR, MET, ASP)
- **π-стэкинг:**
 - Оба ингибитора: 1 контакт (TYR)
- **Ионные (Salt Bridges):**
 - Ингибитор1: отсутствуют.
 - Ингибитор: 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 мембраны.
 - 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 (ИТС) и поверхностный плазмонный резонанс (SPR)**: измеряют кинетику и термодинамику связывания напрямую.