

# Electrostatique des Protéines: Relations Structure - Fonction

Maria Miteva

Equipe "Bioinformatique Structurale"

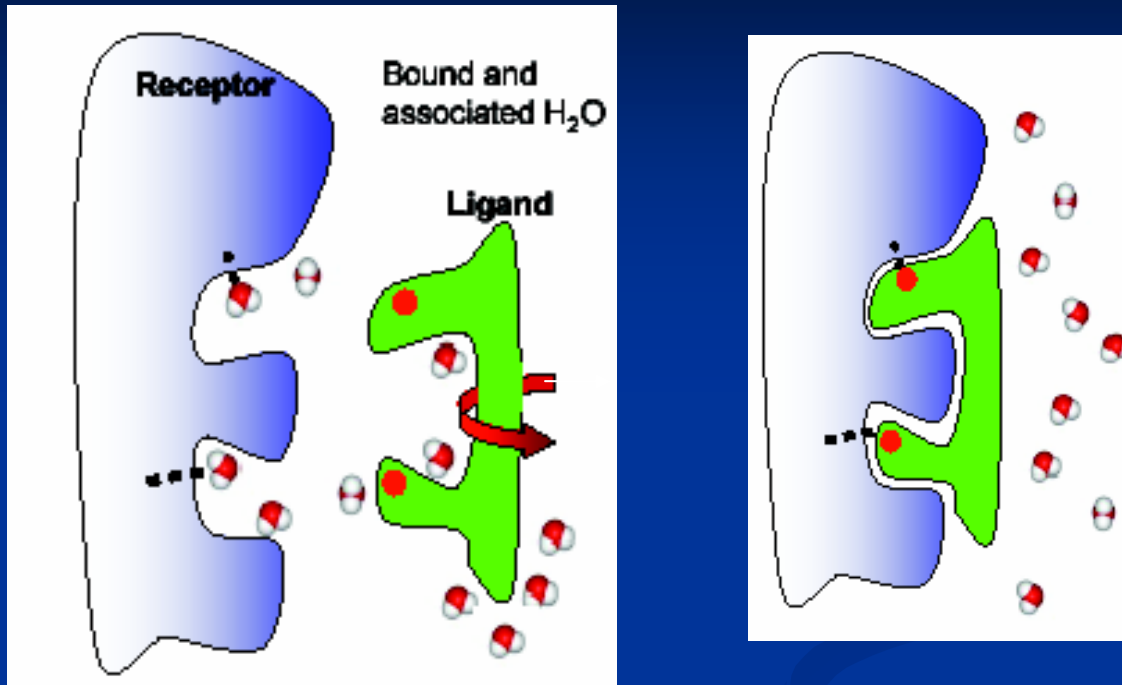
INSERM U648

Equipe de Bioinfo Drug Design

# Electrostatique des Protéines

- Interactions Electrostatiques
- Calculs des pKas
- Applications Biologiques

# Les Interactions Moléculaires



$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{complex}} - \Delta G_{\text{R}} - \Delta G_{\text{L}}$$

$$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]}$$

$$\Delta G^0 = RT \ln K_d$$

# Les Interactions Moléculaires

L'énergie libre d'interaction noncovalente R – L :

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solv}} - T\Delta S$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{es}} + \Delta E_{\text{vdW}}$$

# Les Interactions Moléculaires

- **Les interactions moléculaires:**  
*covalentes, électrostatiques, van der Waals*

Les interactions entre les molécules sont exprimées sous la forme d'énergie potentielle U.

- **La force** nécessaire pour séparer deux molécules d'une distance intermoléculaire r vers l'infini peut être exprimée par la différence d'énergie potentielle:

$$F = - \frac{dU}{dr}$$

**F** : force (N)

**U** : énergie potentielle (J)

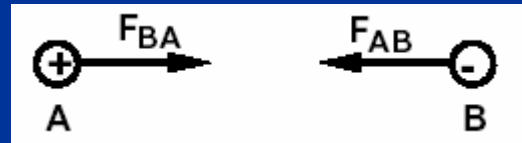
**r** : distance intermoléculaire (m)

# Interactions Electrostatiques

**Charges électriques:** négatives et positives

**Les interactions électrostatiques** peuvent être répulsives ou attractives selon le signe de la charge.

**La force d'interaction** dépend des charges des molécules, de la distance entre les molécules et de la constante diélectrique du milieu.

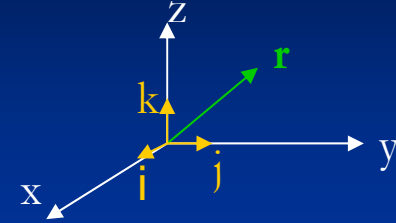


# Electrostatique du vide

## Equation de Poisson:

$$-\nabla \cdot \nabla \phi(\mathbf{r}) = \frac{\rho(\mathbf{r})}{\epsilon_0}$$

$$\nabla \phi(\mathbf{r}) = \text{grad } \phi(\mathbf{r}) = \mathbf{i} \frac{\partial \phi}{\partial x} + \mathbf{j} \frac{\partial \phi}{\partial y} + \mathbf{k} \frac{\partial \phi}{\partial z}$$



$$\mathbf{r} = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} = x.\mathbf{i} + y.\mathbf{j} + z.\mathbf{k}$$

$\phi$ : potentiel électrostatique en  $\mathbf{r}$

$\rho$ : densité des charges

$\epsilon_0$ : constante diélectrique du vide ( $8,85419 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \text{ m}^{-1}$ )

$\mathbf{r}$ : coordonnées cartésiennes d'un point ( un vecteur)

$\mathbf{i}, \mathbf{j}, \mathbf{k}$ : les vecteurs unitaires

# Electrostatique du vide

## ■ Le champ électrique:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = -\nabla\phi(\mathbf{r})$$

$$E_x(\mathbf{r}) = -\frac{\partial\phi}{\partial x}$$

$\mathbf{E}$ : champ électrique en  $\mathbf{r}$  (un vecteur)

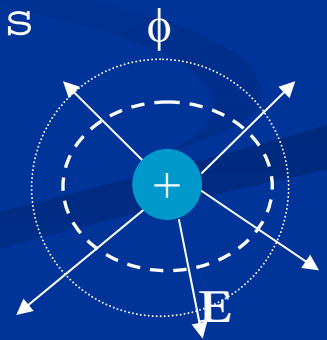
$\phi$ : potentiel électrostatique en  $\mathbf{r}$

$\mathbf{r}$ : coordonnées cartésiennes d'un point (un vecteur)

## □ Les lignes de champ électrique $\mathbf{E}$ d'une charge positive isolée dans le vide:

Une ligne de champ est une courbe tangente en chaque point au vecteur champ défini en ce point.

## □ On peut déterminer les **surfaces equipotentielles** en construisant des surfaces perpendiculaires aux lignes de champ.



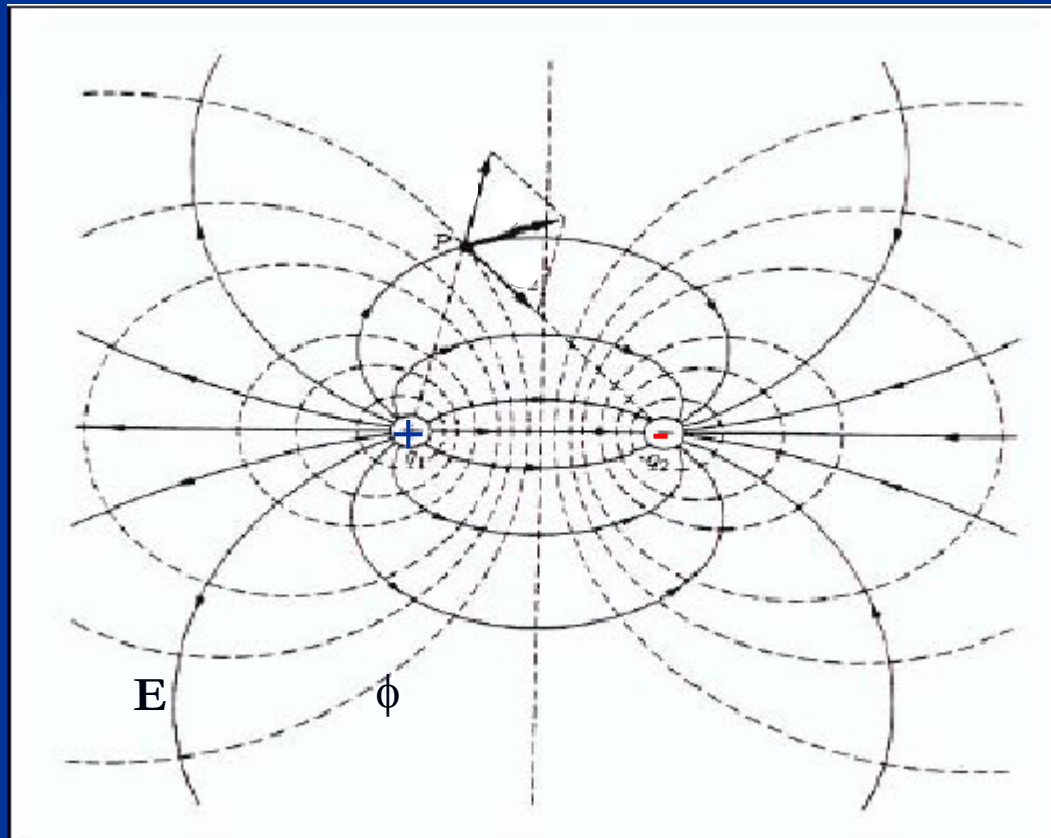
# Electrostatique du vide

- **Le principe de superposition:**

$$\mathbf{E} = \sum \mathbf{E}_i$$

$$\mathbf{F} = \sum \mathbf{F}_i$$

le champ créé par un dipôle électrique:



# Electrostatique du vide

- **Energie électrostatique :**

le travail qu'il faut fournir pour amener une charge de l'infini à sa position. On peut l'exprimer sous forme intégrale:

$$U = \int_0^Q \phi(q) dq$$

# Electrostatique du vide

## ■ Distribution des Charges Ponctuelles

- Une solution de l'équation de Poisson pour 2 charges ponctuelles  $q_1, q_2$  s'écrit sous forme de la loi de Coulomb:

$$U(r_{12}) = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}}$$

$$F_2 = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}^2}$$

$r_{12}$ : distance séparant deux charges

$\epsilon_0$ : constante diélectrique du vide

# Electrostatique en milieu homogène de conductivité unitaire

Les interactions électrostatiques sont plus faibles en milieu homogène de conductivité unitaire (gaz, liquide, solide) que dans le vide. Le champ électrostatique est diminué par une constante diélectrique  $D$  comptant dans l'atténuation de l'interaction électrostatique par l'environnement (solvant ou molécule elle-même). La constante  $D$  est dépendante de polarité et flexibilité du milieu.

- Equation de Poisson en milieu homogène :

$$-\nabla \cdot \nabla \phi(\mathbf{r}) = \frac{\rho(\mathbf{r})}{\epsilon_0 D}$$

$D, \epsilon$ : = 1 pour le vide,  
> 1 pour les gaz  
= 2-4 lipides et protéines  
= 80 pour l'eau à 20 C

# Electrostatique en milieu homogène de conductivité unitaire

## ■ Distribution des Charges Ponctuelles:

$$U(r_{12}) = \frac{q_1 q_2}{4\pi D \epsilon_0 r_{12}}$$

$$U(r_{12}) = \frac{332 q_1 q_2}{D r_{12}} \quad (\text{kcal/mol})$$



# Electrostatique en milieu non-homogène

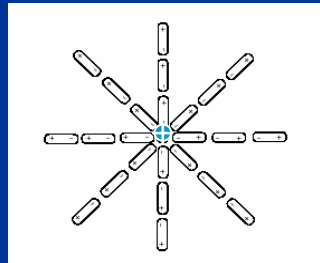
## □ Dipôle

deux charges égales, de signe opposé, situées à distance  $d$ .  
Le moment dipolaire est une grandeur vectorielle de module  $\mu=q.d$ .

le Debye:  $1d=0,33 \cdot 10^{-29} \text{ C.m}$

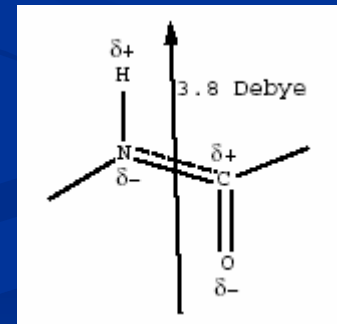
Les dipôles peuvent être:

### □ Induits



### □ Permanents

- Le dipôle de liaison peptidique:
- L'eau:  $d = 0,0958 \text{ nm}$ ;  $\mu=1,84d$



# Electrostatique en milieu non-homogène de conductivité

- Equation de Poisson en milieu non-homogène :

$$-\nabla \cdot [\boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{r}) \nabla \phi(\mathbf{r})] = \frac{\rho(\mathbf{r})}{\epsilon_0}$$

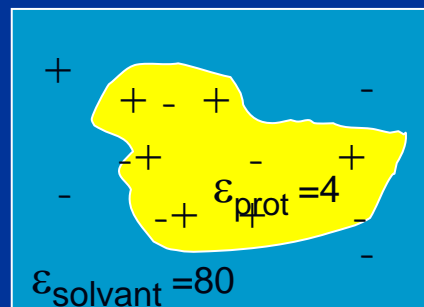
$\phi$ : potentiel électrostatique en  $\mathbf{r}$

$\rho$ : densité des charges

$\epsilon_0$  : constante diélectrique du vide

$\boldsymbol{\epsilon}(\mathbf{r})$ : constante diélectrique du milieu en  $\mathbf{r}$

□ Protéines :



# Electrostatique en milieu non-homogène de conductivité

## ■ Présence des contre-ions en solution

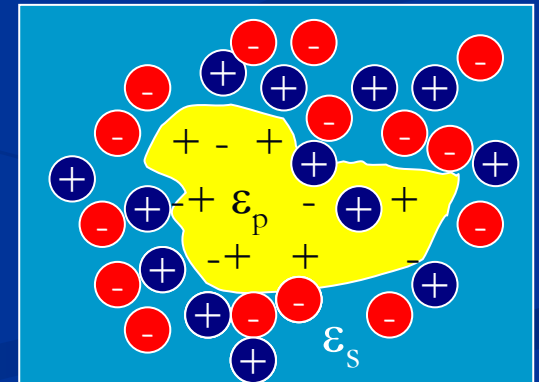
### □ La théorie de Debye-Huckel

utilise le facteur de Boltzmann pour estimer l'augmentation ou la diminution de la concentration locale des ions relativement à leur concentration en solution

### □ Equation de Poisson-Boltzmann:

$$\nabla[\epsilon(r)\nabla\phi(r)] - \kappa^2 \epsilon_s \phi(r) + 4\pi\rho(r) = 0$$

$\kappa = f(\text{force ionique})$



# Electrostatique des protéines: solvatation

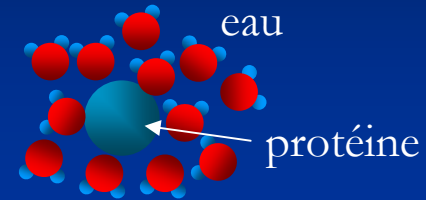
## ■ Modèle Microscopique:

Méthodes explicites:

Warshel 1984;

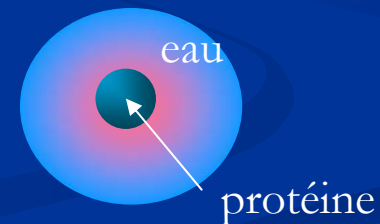
Simulations de dynamique moléculaire

Simulations de Monte Carlo.



## ■ Modèle Macroscopique:

Le solvant est un milieu continu et  
a une constante diélectrique .



# Modèle Macroscopique: Méthodes implicites

## ■ Méthodes Analytiques:

la fonction diélectrique est **dépendente de la distance** entre les charges

$$\phi(\mathbf{r}) = \sum q_i / \varepsilon(\mathbf{r}_{ij}) \cdot r_{ij}$$

- $\varepsilon(\mathbf{r}_{ij}) = 4r_{ij}$
- $\varepsilon(\mathbf{r}_{ij}) =$  fonction empirique sigmoïdale

# Modèle Macroscopique: Méthodes implicites

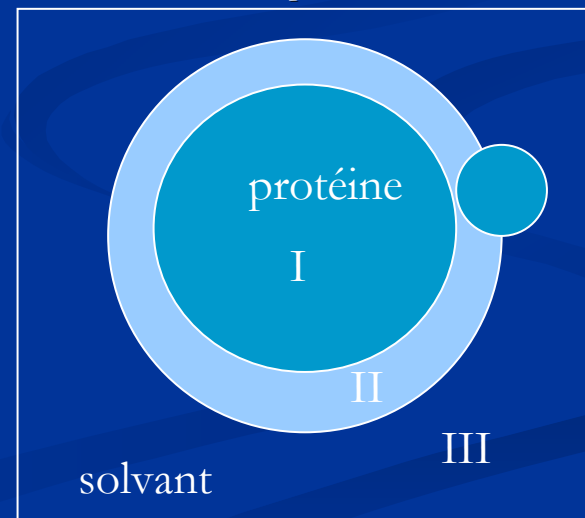
## ■ Résolution Analytique de PB: Méthode de Tanford-Kirkwood

On résout PB pour les régions I,II, et III:

I: sur la surface de la protéine présentée par une sphère avec  $\epsilon_{\text{prot}}$ ;

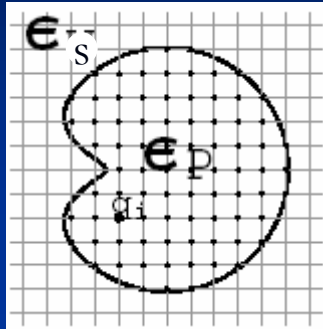
II: région sans contre-ions avec  $\epsilon_{\text{solvant}}$

III: région avec des contre-ions avec  $\epsilon_{\text{solvant}}$



# Modèle Macroscopique: Méthodes implicites

- Résolution numérique de PB: **Méthode des différences finies**  
( FDPB Finite Difference Poisson-Boltzmann )



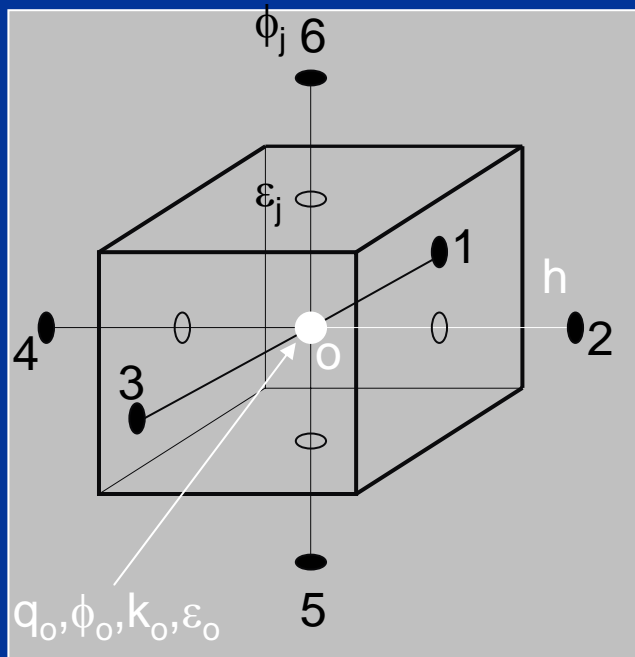
Equation de PB:

$$\nabla[\varepsilon(\mathbf{r})\nabla\phi(\mathbf{r})] - \mathcal{K}^2 \varepsilon_s \phi(\mathbf{r}) + 4\pi\rho(\mathbf{r}) = 0$$



$$\phi_o = \frac{\sum_1^6 \varepsilon_j \phi_j + 4\pi q_o / h}{\sum_1^6 \varepsilon_j + k_i^2 h^2}$$

$\mathcal{K} = f(\text{force ionique})$



# Modèle Macroscopique: Méthodes implicites

## ▪ Approximation de Born Généralisé

### • Equation de Born

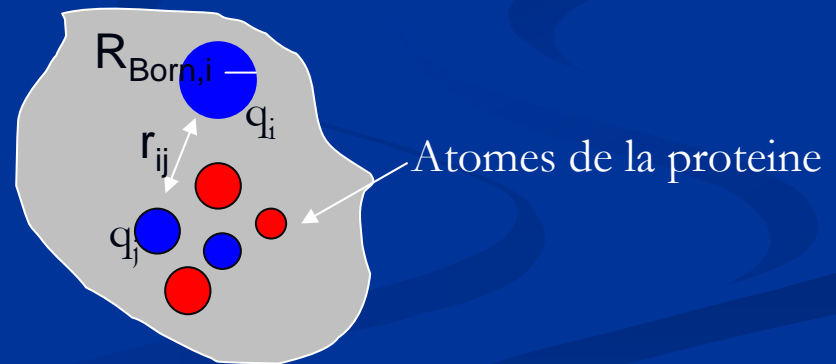
le travail qu'il faut fournir pour amener une sphère (rayon  $a$ ) avec une charge  $q$  du vide à solution

$$\Delta G_{\text{Born}} = - \frac{q^2}{2a} \left[ 1 - \frac{1}{\epsilon_s} \right]$$



### • Méthode de Born Généralisé pour une protéine

$$\Delta G_{\text{POL}} = - \frac{1}{2} \left( 1 - \frac{1}{\epsilon_s} \right) \sum_{j \neq i} \frac{q_i q_j}{f_{GB}}$$

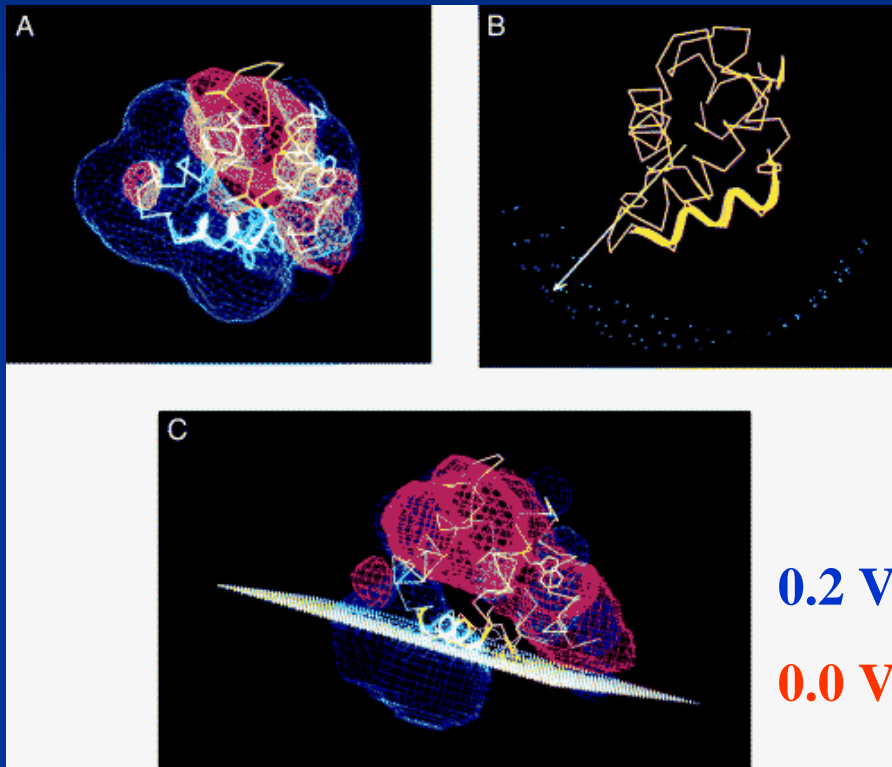


$$f_{GB} = f(R_{\text{Born},i}, r_{ij})$$

$$R_{\text{Born},i} = f(\text{paramètres empiriques, taille atomique})$$

## ➤ Mécanisme d'action de la protéine NK-lysin

NK-lysin montre une activité cytolytique sur certaines bactéries et des cellules de tumeur par formation de pore dans les membranes.



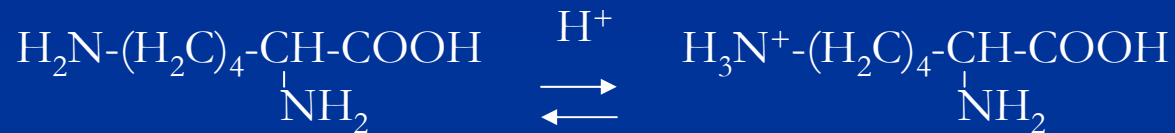
- A. Potentiel en solution
- B. Sphère de potentiel positif le plus élevé.
- C. Potentiel en présence de membrane.

- **potentiel > 0.2V** → formation de pore
- **l'hélice 3 montre une activité cytolytique**

# pKas des protéines

## ■ Les équilibres de dissociation des acides et des bases:

les constantes d'équilibre  $K_A$  et  $K_B$  expriment la force des couples acide AH/A<sup>-</sup> et base B/BH<sup>+</sup> par rapport à l'eau:



$$K_A = [\text{A}^-] \cdot [\text{H}^+] / [\text{AH}]$$

$$\text{pKa} = -\log K$$

$$\Delta G_{\text{ion}} = 2.3RT \cdot (\text{pH} - \text{pKa})$$

Lorsque  $\text{pH} = \text{pKa}$  ( $\text{pK}1/2$ )  $\rightarrow$   $[\text{A}^-] = [\text{AH}]$

$\Delta G_{\text{ion}}$  - l'énergie libre d'ionisation

# pKas des protéines

## ■ Groupes titrables: pKa en solution (pKa<sub>model</sub>)

### NEGATIVES:

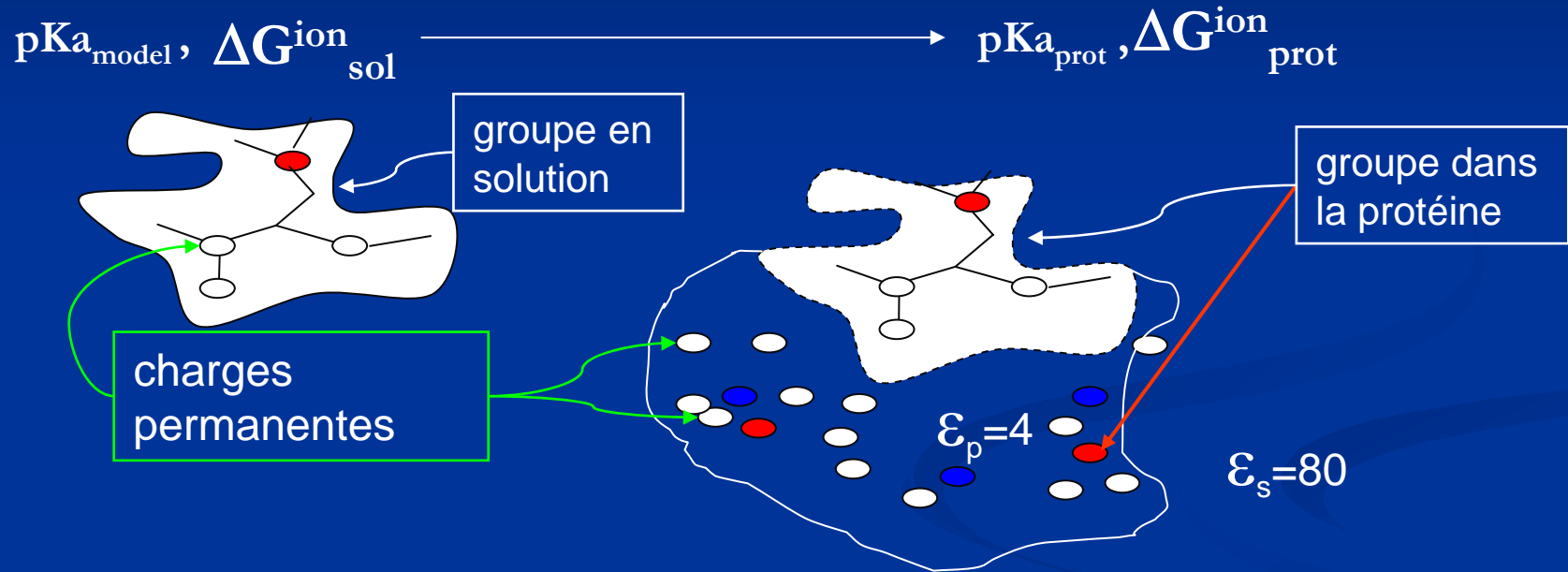
Acide Aspartique	Asp	4.0
Acide Glutamique	Glu	4.4
Cystéine	Cys	8.2
Tyrosine	Tyr	9.6
C-terminus		4.0

### POSITIVES:

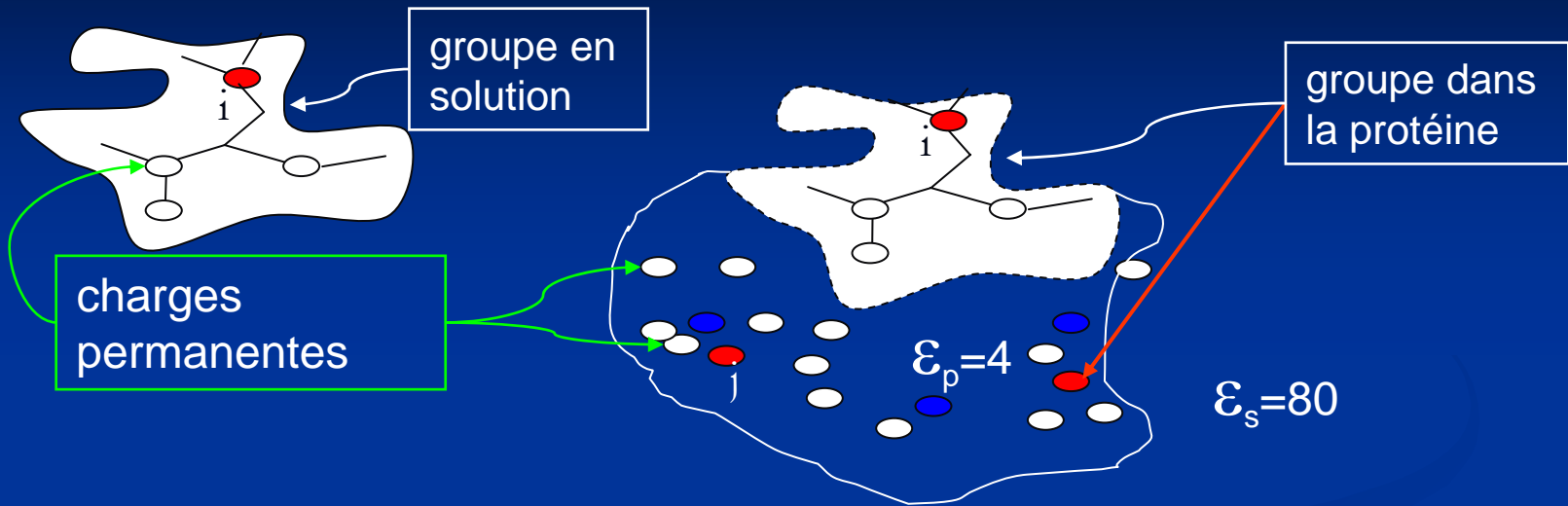
Lysine	Lys	10.4
Arginine	Arg	12.0
Histidine	His	6.6
N-terminus		7.5

# pKas des protéines

- Modèle macroscopique :



# pKas des protéines



$$\Delta G^{\text{ion}} = 2.3RT(\text{pH} - \text{pK}_a)$$

$$\text{pK}_a = \text{pK}_a^{\text{model}} + \Delta \text{pK}_a$$

- **énergie de solvation** ( énergie de **Born** ) due au transfert du groupe en solution ( $\epsilon_s=80$ ) vers la protéine ( $\epsilon_p=4$ )
- interactions avec **des charges permanentes** ( dipôles peptidiques)
- interactions avec **des groupes ionisés**

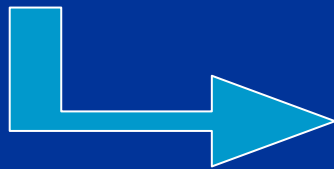
# pKas des protéines

## Corrections $\Delta pK$ :

$$\Delta pK_{ai}^{sol} = -\frac{1}{2.3RT} \left[ q_i \cdot \phi_i^{prot}(r_i) - q_i \cdot \phi_i^{mod}(r_i) \right]$$

$$\Delta pK_{ai}^{per} = -\frac{1}{2.3RT} \sum_{j \neq i} q_j^{per} \cdot \phi_i(r_j)$$

$$\Delta pK_{ai}^{ion} = -\frac{1}{2.3RT} \sum_{j \neq i} q_j \cdot \phi_i(r_j)$$



$\phi$  → Equation de PB

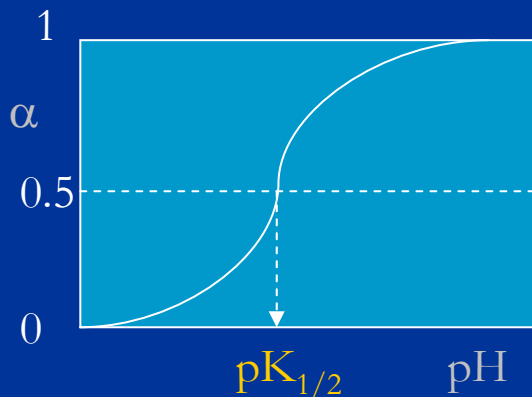
$q$  → Equation de Henderson-Hasselbach:

$$\lg[\alpha_i / (1 - \alpha_i)] = \text{pH} - \text{pKa}_i$$

$\alpha_i$ : degré de dissociation de H+

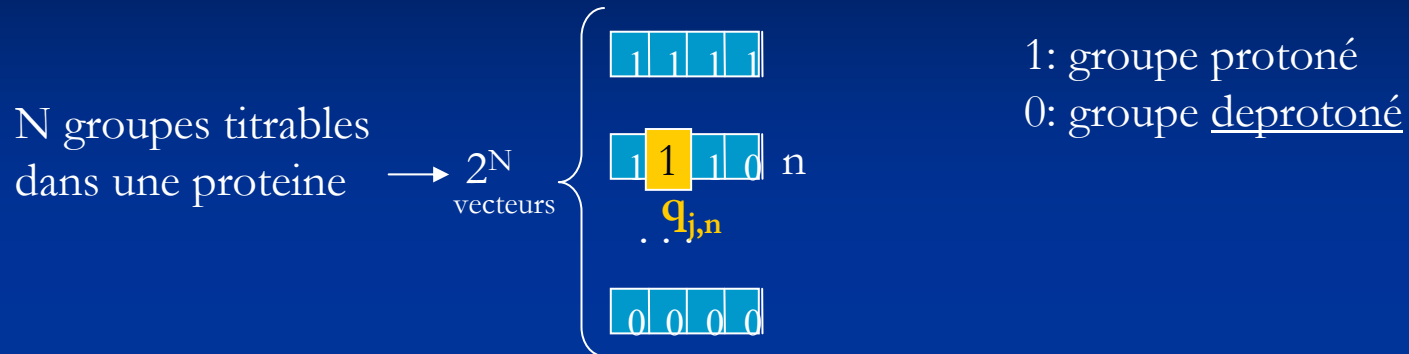
$q = -\alpha_i$  (groups negatives)

$q = 1 - \alpha_i$  (groups positives)



# pKas des protéines

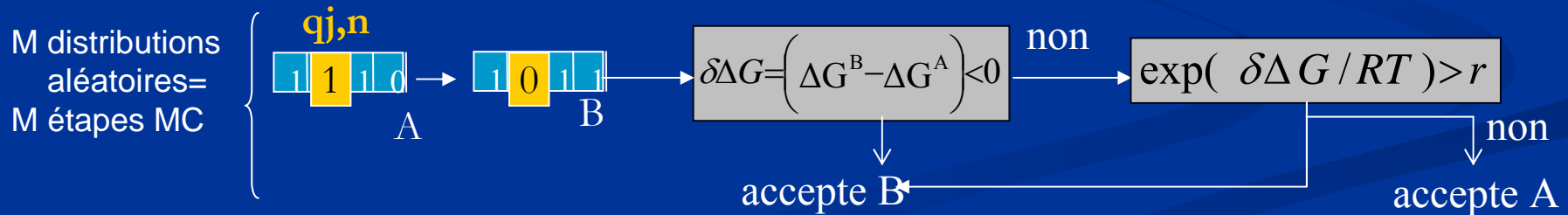
- **Problème de Multi-sites:**  
plusieurs groupes titrables dans une protéine



- **la statistique de Boltzmann :**

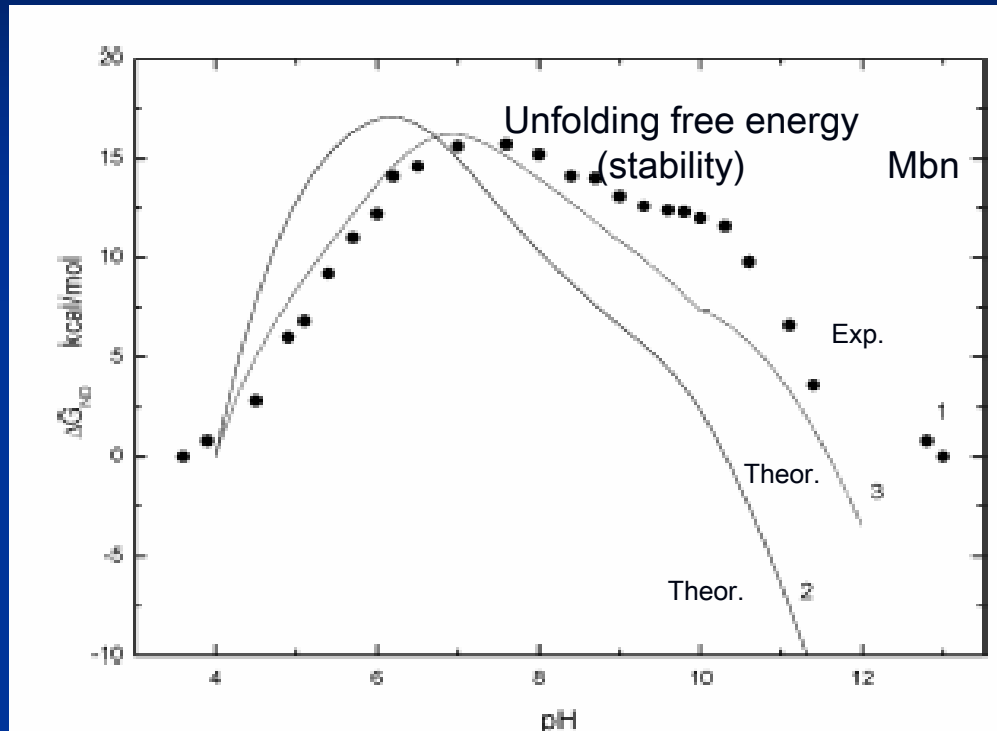
$$\langle q_j \rangle = \frac{\sum_1^{2^N} q_{j,n} \cdot \exp(-\Delta G^n / kT)}{\sum_1^{2^N} \exp(-\Delta G^n / kT)}$$

- **Méthode de Monte Carlo :**



$$\langle q_j \rangle = \sum q_{j,n} / M$$

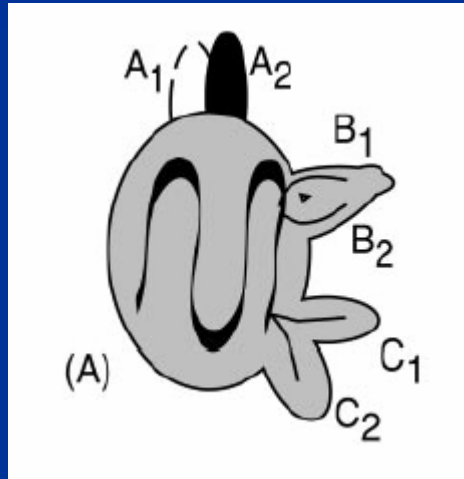
- Prédire: la stabilité  $\Delta G(\text{pH})$  d'une protéine:



( Shosheva et al. Eur Bioph J 2003;  
Kundrotas & Karshikoff Prot. Sci 2002)

# pKas des protéines

- **Flexibilité dans les calculs électrostatiques:**
  - Chaînes latérales: plusieurs rotamers

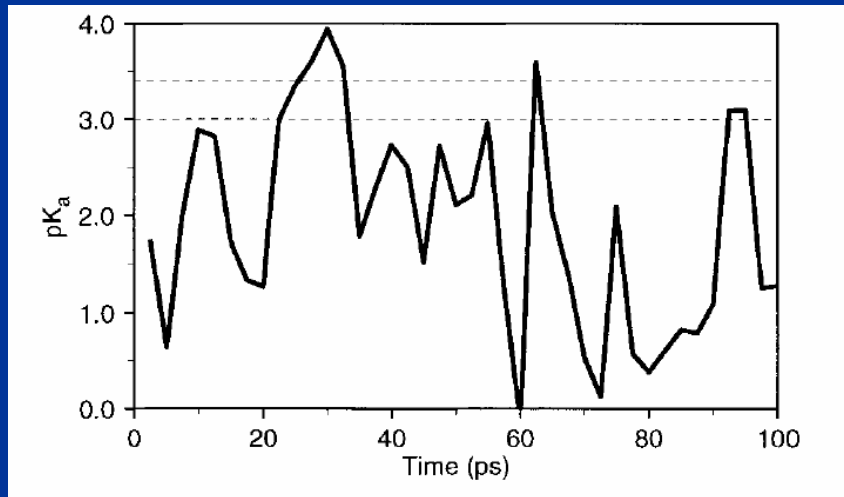


(You & Bashford 1995; Georgescu, Alexov & Gunner 2002)

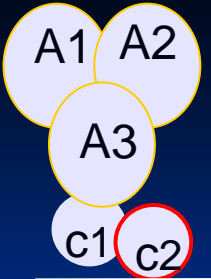
# pKas des protéines

## ■ Flexibilité dans les calculs électrostatiques:

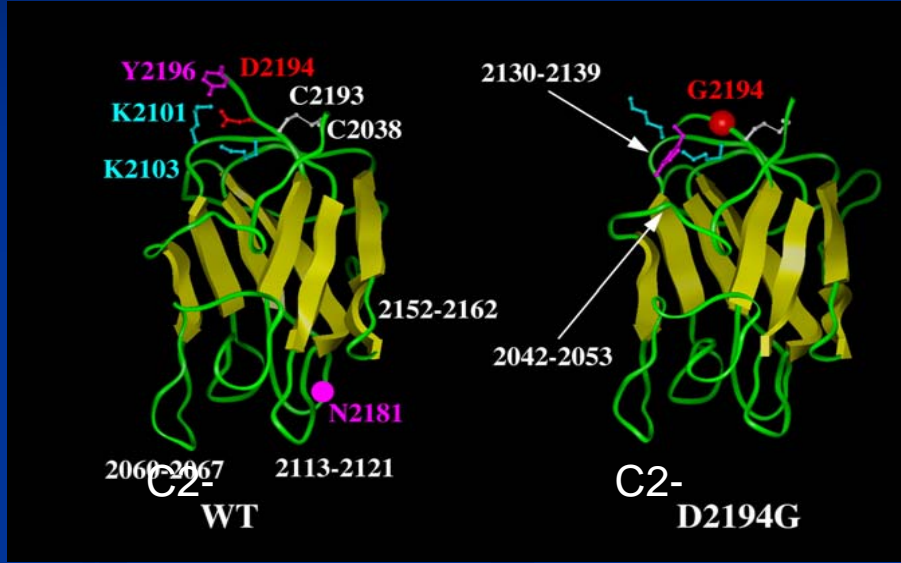
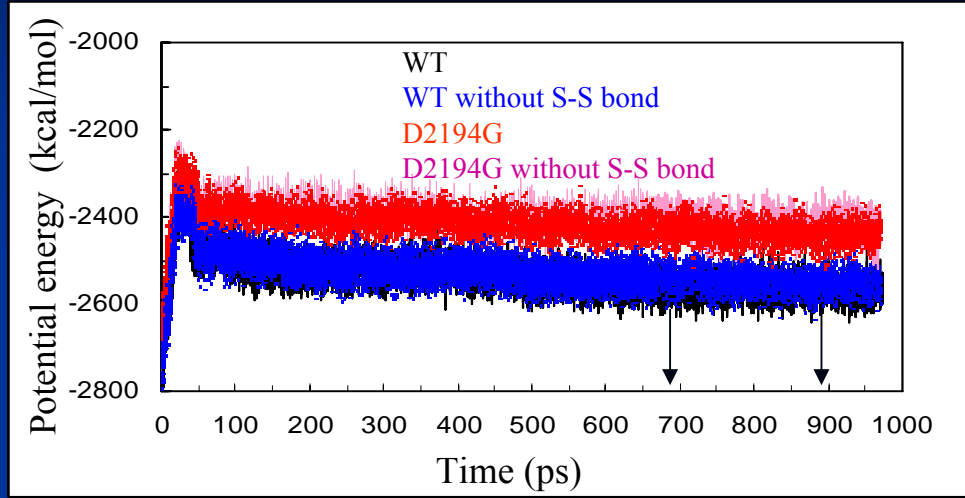
- Plusieurs Conformations de simulation de DM /MC
- Structure moyenne de simulation de DM /MC



Calculated pKa (FDPB) of Asp 50 of BPTI for structures every 5 ps from the MD trajectory.  
(van Vlijmen et al. 1998)



## Mutation D2194G dans le domaine C2 du Facteur V de coagulation



• 1 ns simulations MD (méthode GB) du C2-FV

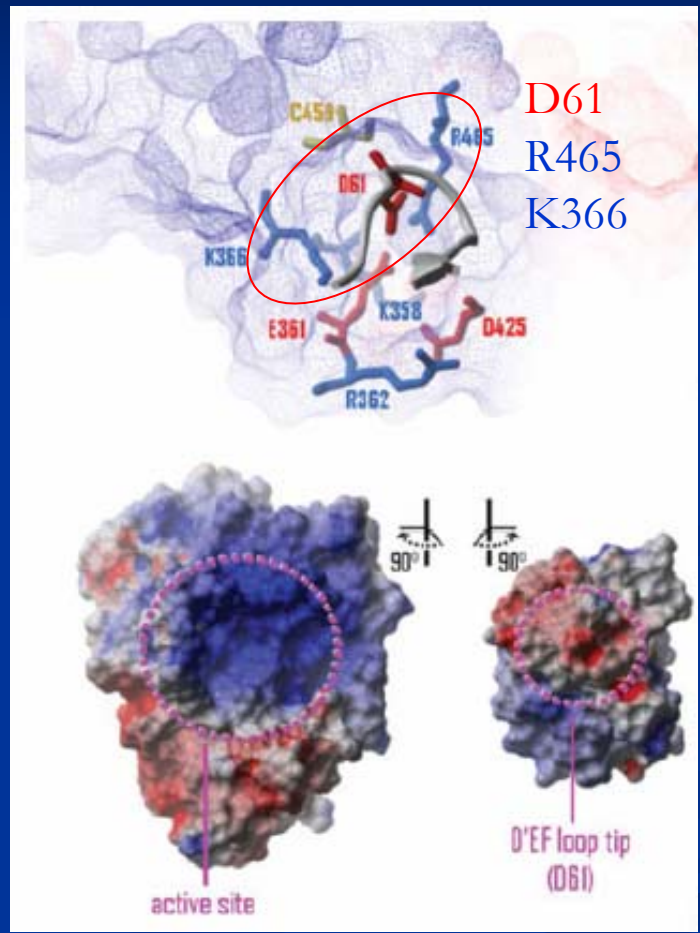
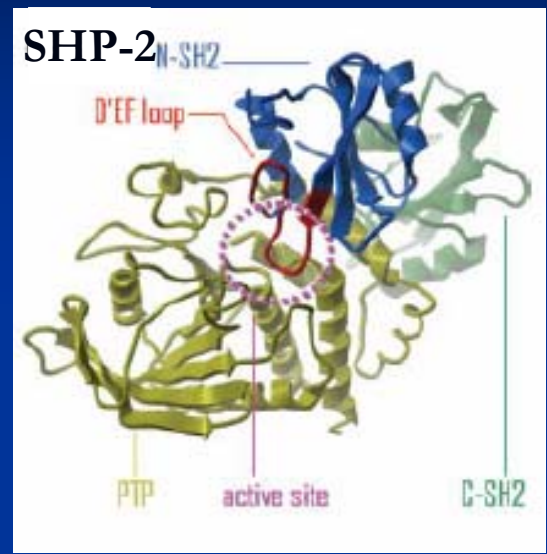
Miteva et al. Biophys J. (2004)

30 MD conformations

pKas des 30 MD conformations (méthode FDPB)

$\searrow$   $pK_a^{aver}$ ,  $\Delta G^{aver}$   $\longrightarrow$   $\Delta\Delta G_{sta}^{el} \sim 3 \text{ kcal/mol}$

## ➤ Mutation D62del dans la phosphatase SHP-2 dans les syndromes de Noonan, Leopard



$\epsilon_{in}$	$\Delta\Delta G_{el}^{tot}$	
	salt-bridge	triad
4	-7.4	-5.4
11	-4.7	-3.3

**pKa,  $\Delta G_{el}$  : FDPB**

(Lee et al. Proteins 2004)

# Programmes: Calculs électrostatiques

- **FDPB :**

UHBD (University of Houston Brownian Dynamics ) (McCammon et al.)  
DelPhi (Honig et al.); APBS (Gilson et al.); MEAD ( Bashford et al.)...

- **$\phi$ , pKa(pH)**

Plateforme "RPBS" Paris: PCE

**Serveur Web:** <http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/>

(Miteva et al. 2005;)

programme: MEAD (Bashford 1992)

Méthodes:  $\phi$ : FDPB;  $q$ : Statistique Boltzmann

## ■ Applications:

- transfert d'électrons / protons
- Interactions: protéine - protéine  
protéine - membrane  
Protéine – ligand: Drug Design

## Remerciements:

- Dr. B.O.Villoutreix ( Inserm, Univ.Paris5)  
Dr. P. Tuffery (Inserm, Univ. Paris7)
- Dr. D.Perahia (CNRS, Orsay)
  
- Dr. A.Karshikoff (Inst.Karolinska , Stockholm)
- Dr. B.Atanasov (Inst.Org.Chem., Sofia)
- Dr. E.Alexov (Clemson Univ. USA)
- Dr. V.Spassev (Accelrys, San Diego)

# References:

- Antosiewicz, J., McCammon, J. & Gilson, M. (1996) *Biochemistry*, **35**, 7819-7833.
- Bashford D, Karplus M. *Biochemistry*. 1990 29:10219-25.
- Georgescu RE, Alexov EG, Gunner MR: *Biophys J* 2002,83:1731-1748
- Gilson M. & Honig B. *Nature*. 1987 330:84-6.
- Gilson, M., and B. Honig. 1988. *Proteins*. 4:7-18.
- Gilson M. 2002 INTRODUCTION TO CONTINUUM ELECTROSTATICS, WITH MOLECULAR APPLICATIONS <http://gilsonlab.umbi.umd.edu>
- Hassan, S.A., Guarnieri, F., Mehler, E.L. (2000) *A General Treatment of Solvent Effects Based on Screened Coulomb Potentials*. *J. Phys. Chem.*, **104**: 6478-6489.
- Honig, B. & Nicholls, A. (1995). *Science* **268**, 1144-1149.
- Kundrotas P.J. & A. Karshikoff. (2002) *Prot.Sci* 11, 1681-1686.
- Kirkwood, J. G. (1934) *J. Chem. Phys.* **2**, 351-361.
- Miteva M, Demirev P., Karshikoff A. *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 9645-9650
- Miteva MA, Brugge JM, Rosing J, Nicolaes GA, Villoutreix BO. *Biophys J*. 2004 Jan;86(1 Pt 1):488-98.
- Simonson T *Curr Opin Struct Biol* 2001,11:243-252.
- Spassov, V. Z., A. D. Karshikoff, and R. Ladenstein. 1994. *Protein Sci*. 3:1556-1569.
- Tanford, C. & Kirkwood, J. G. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5333-5339.
- van Vlijmen H., Schaefer M, Karplus M. *PROTEINS* 33:145-158 (1998)
- Warshel, A. & Russell, S. T. (1984) *Q. Rev. Biophys.* **17**, 283-422.
- Warwicker J, Watson HC: *J Mol Biol* 1982,157:671-679.
- Yang AS, Gunner MR, Sampogna R, Sharp K, Honig B. *Proteins*. 1993 Mar;15(3):252-65.
- You, T. J. & Bashford, D. (1995) *Biophys. J.* **69**, 1721-1733.
- T.L. HILL, DOVER, NEW YORK, AN INTRODUCTION TO STATISTICAL THERMODYNAMICS. Chapter Debye-Huckel theory and the Poisson-Boltzmann equation 1986.