

Elméleti módszerek lipidek és membránfehérjék tanulmányozására

Hegedűs Tamás

tamas@hegelab.org

MTA-SE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport
SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



Fehérjék szerkezetének és dinamikájának jelentősége

A betegség molekuláris szintű oka?
A gyógyszer-kötő zseb alakja?

37°C-on, oldatban nem egy szerkezet létezik,
hanem egy konformációs sokaság.

Számítógépes modellezés jelentősége

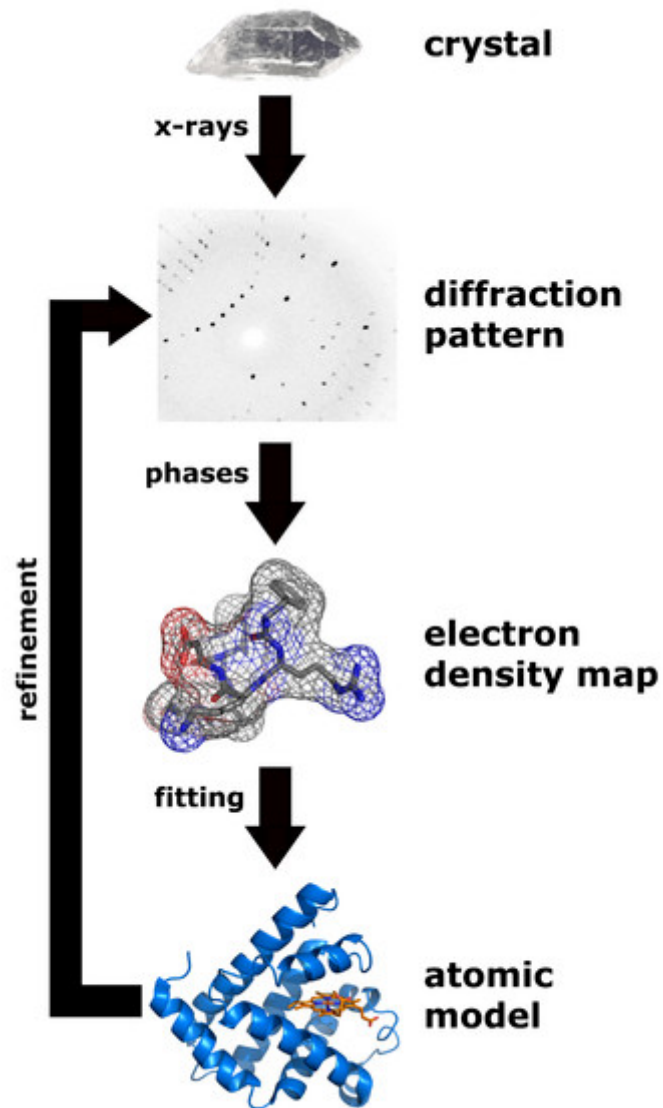
Atomi szintű információt ad mozgásokról.

**Kísérletes módszerek
általában nem szolgáltatnak
közvetlen információt az atomi szintű történésekről.
(pl. EPR, X-links: nem, NMR: igen, de korlátoltan)**

Membránfehérjék szerkezeti modellezése

- Kísérleti adatok alapján
- Elméleti módszerekkel
 - homológia modellezés
 - mélytanulásos módszerek

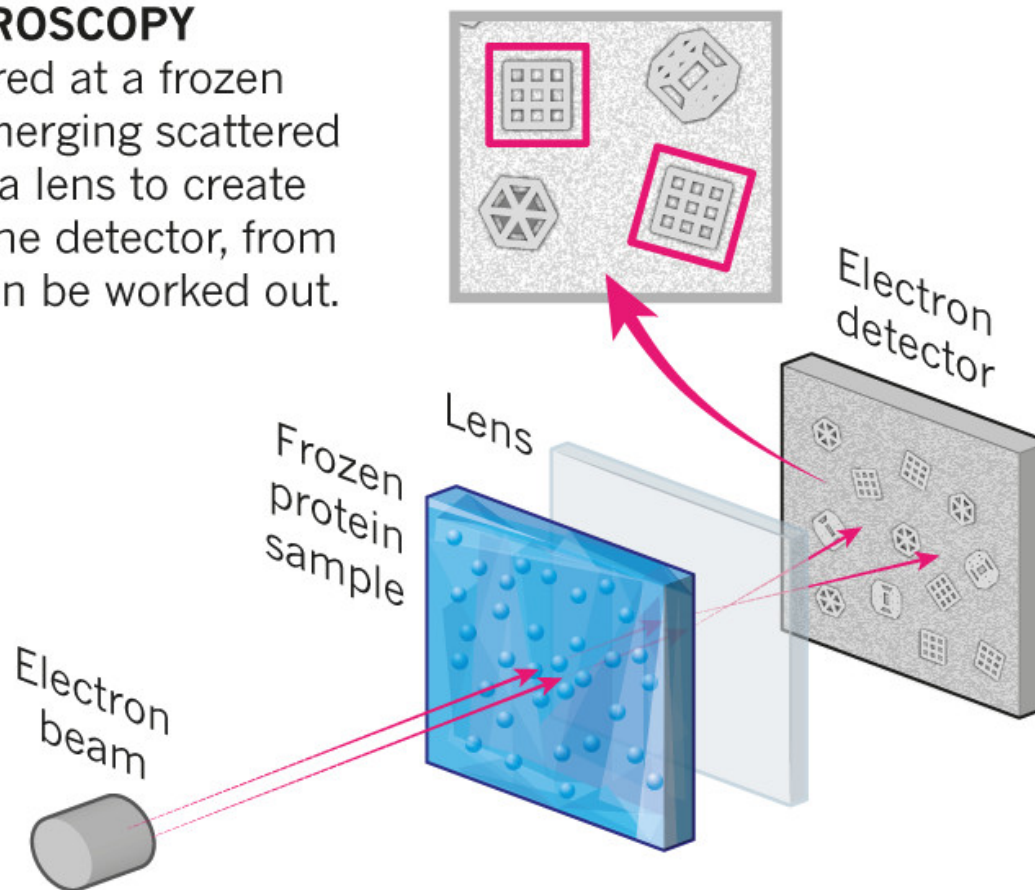
Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



Szerkezet meghatározás – krio-EM

CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

A beam of electron is fired at a frozen protein solution. The emerging scattered electrons pass through a lens to create a magnified image on the detector, from which their structure can be worked out.



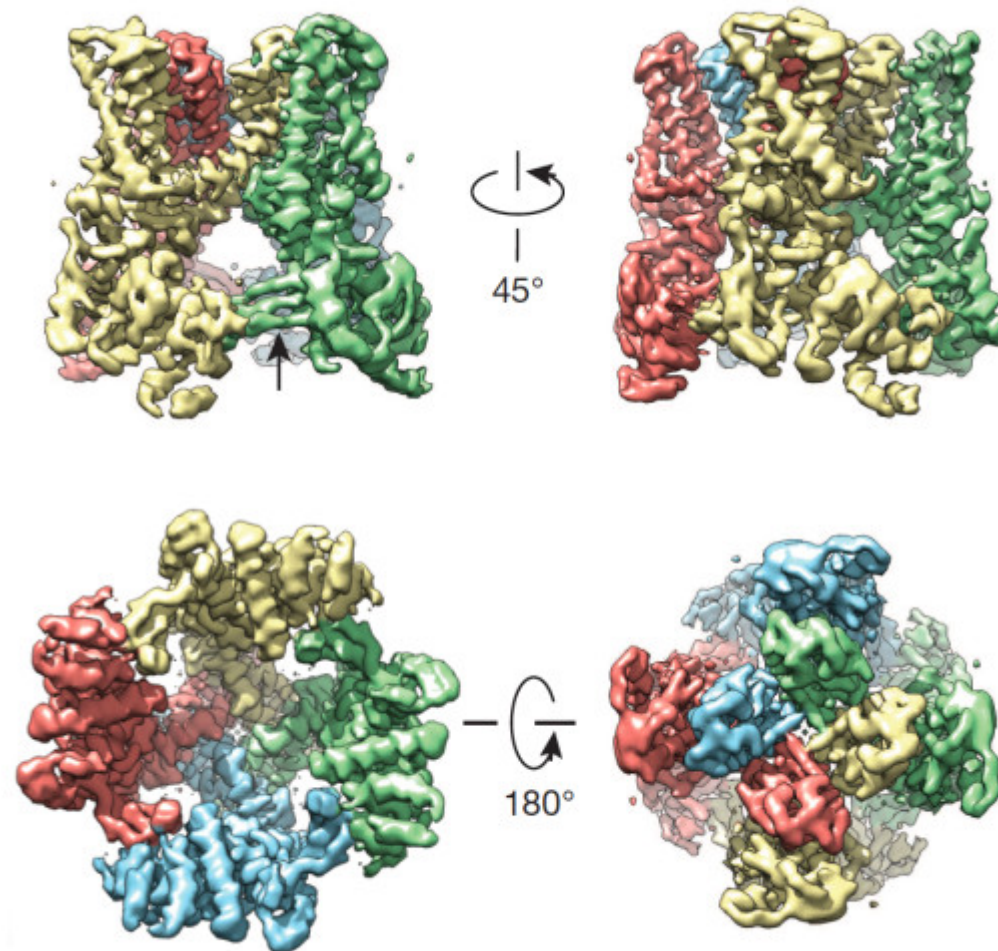
© nature

Ewen Callaway, Nature | News Feature

The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology, 09 September 2015

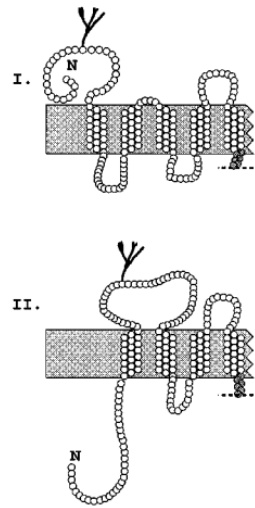
Szerkezet meghatározás – „single particle”

The TRPV1 channel detects the burn of chilli peppers, and this 3.4-Å structure is considered super-hot in the structural-biology world.

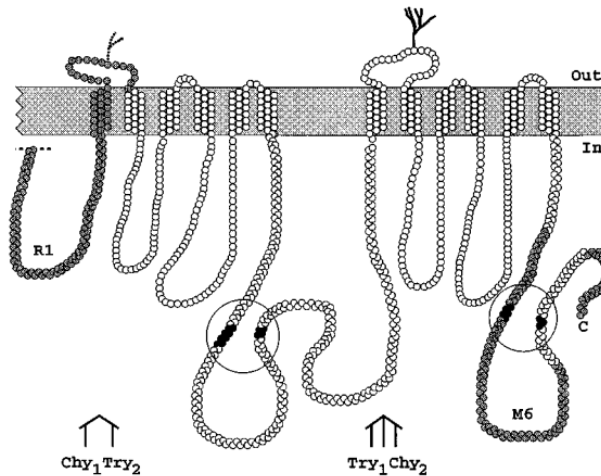


Membránfehérjék topológiája

MRP



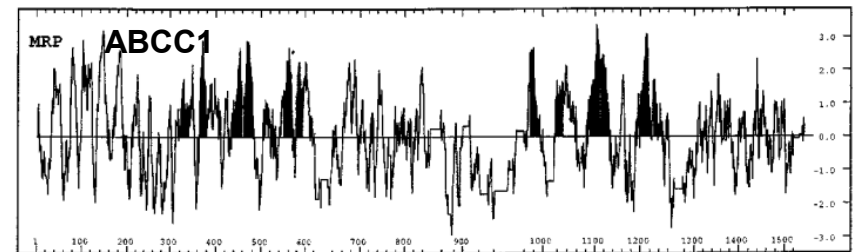
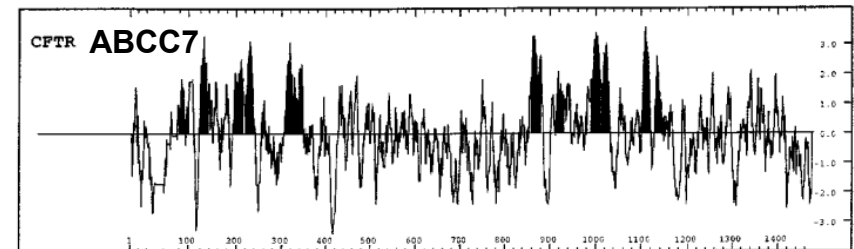
Bakos *et al.* JBC 1996



CFTR

MRP

Hidrofóbicitási görbék:



CFTR topológiája kísérletekből ismert
Chang *et al.* J Biol Chem. 1994 269(28):18572-5

Kísérletes topológia meghatározási módszerek:

- Glikozilációs hely és mintázat
- *tag* – felismerés
- Cys hozzáférhetőség

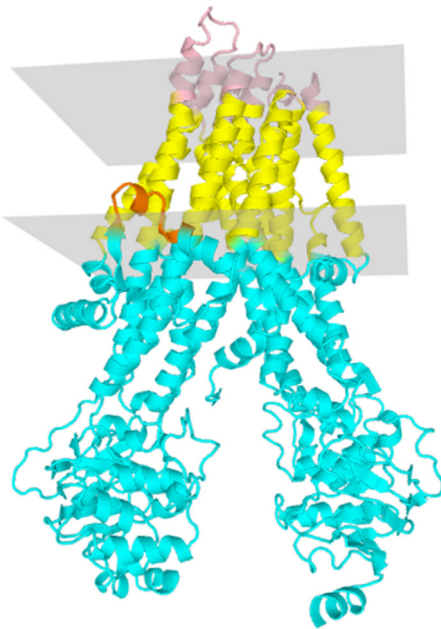
Membrántopológia és TM hélixek predikciója szekvencia alapján

- Szekvencia alapján
 - *positive-inside rule*
 - TM hélixek és nem-TM részek aminosav eloszlása más
- Biológiai tudás figyelembevételének lehetősége
- Több prediktor integrálása
pl. CCTOP.enzim.hu

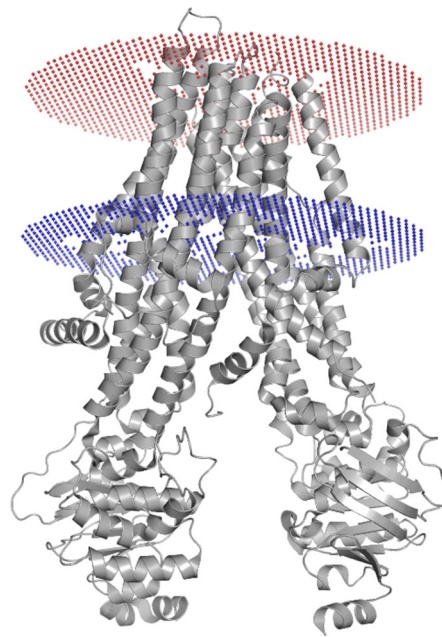
TM hélixek predikciója szerkezet alapján

1. „water accessible area”, lipid kettősréteg lehetséges helye, pontozás – fitness függvény
2. molekula dinamika szimulációk

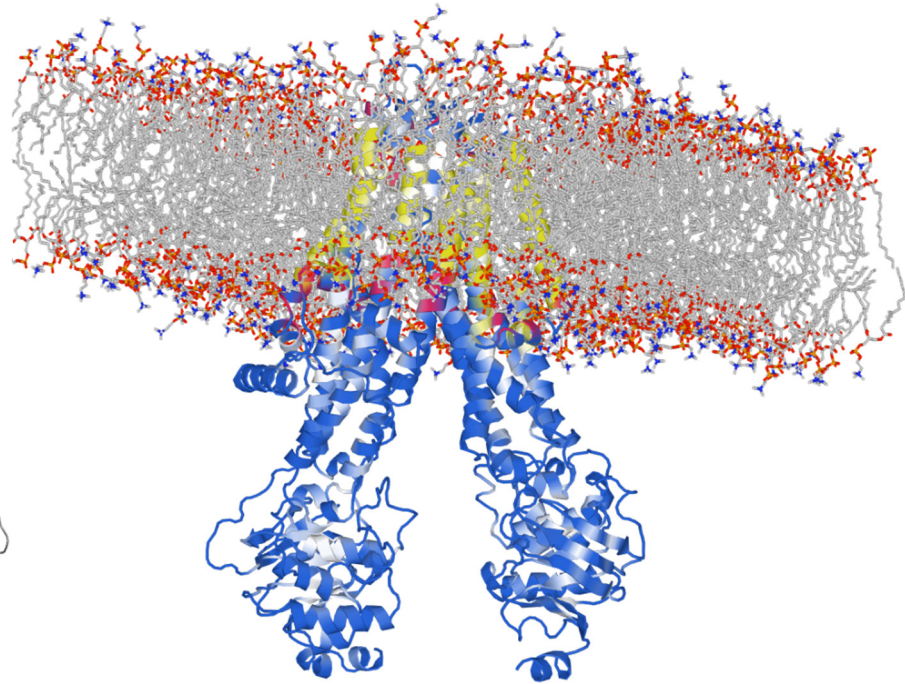
TMDet
PDBTM



PPM
OPM

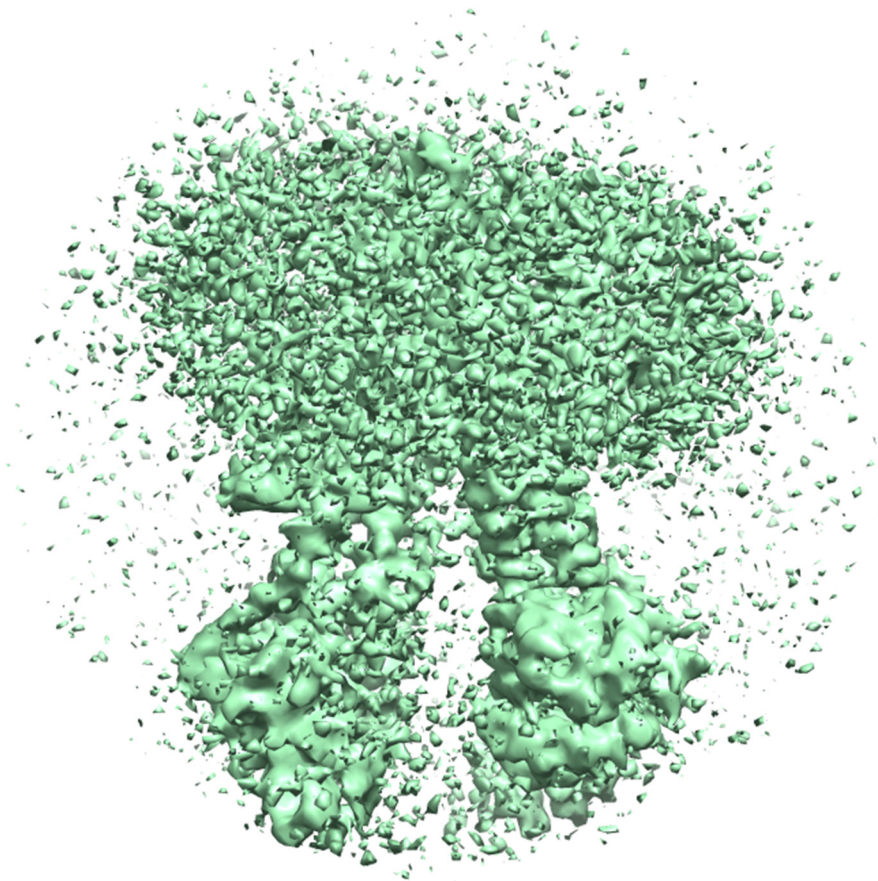


MemProtMD

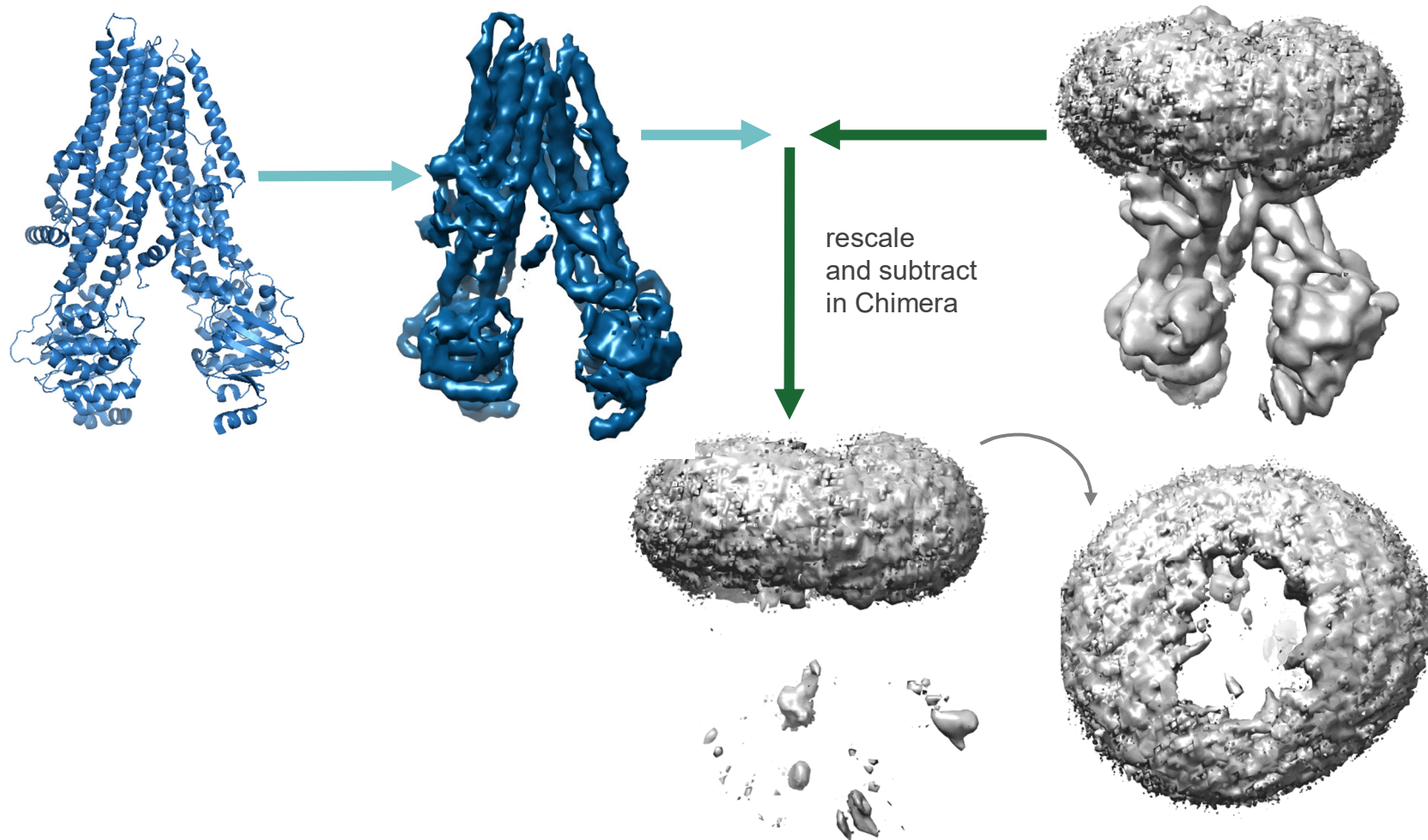


Membrane embedding data is in the
electron density maps

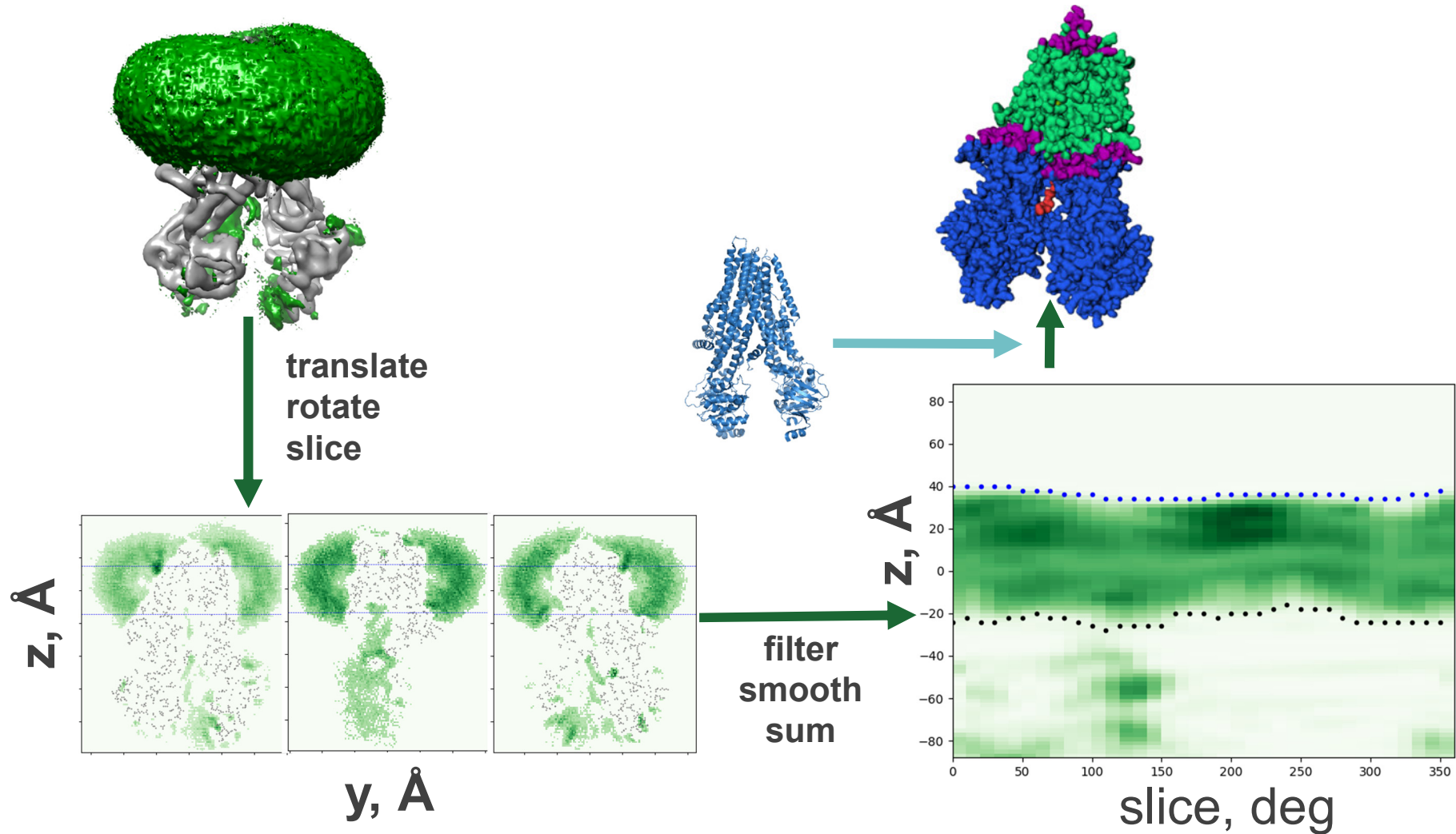
CFTR (PDBID: 5UAK) EMD



A membrane blob can be extracted from the electron density map



The MemBlob can be converted to membrane boundaries



Homológia modellezés I.

- **Templát keresés**
- **Szekvencia illesztés**
- **Modellezés**
- **Energia-minimalizálás**

BLOSUM (BLOCKs of Amino Acid SUBstitution Matrix) matrix
is a substitution matrix

BLOSUM (BLOCKs of Amino Acid SUBstitution)
is a substitution matrix

	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Ala	4																			
Arg	-1	5																		
Asn	-2	0	6																	
Asp	-2	-2	1	6																
Cys	0	-3	-3	-3	9															
Gln	-1	1	0	0	-3	5														
Glu	-1	0	0	2	-4	2	5													
Gly	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
His	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
Ile	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
Leu	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
Lys	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
Met	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
Phe	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
Pro	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
Ser	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
Thr	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
Trp	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Tyr	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
Val	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

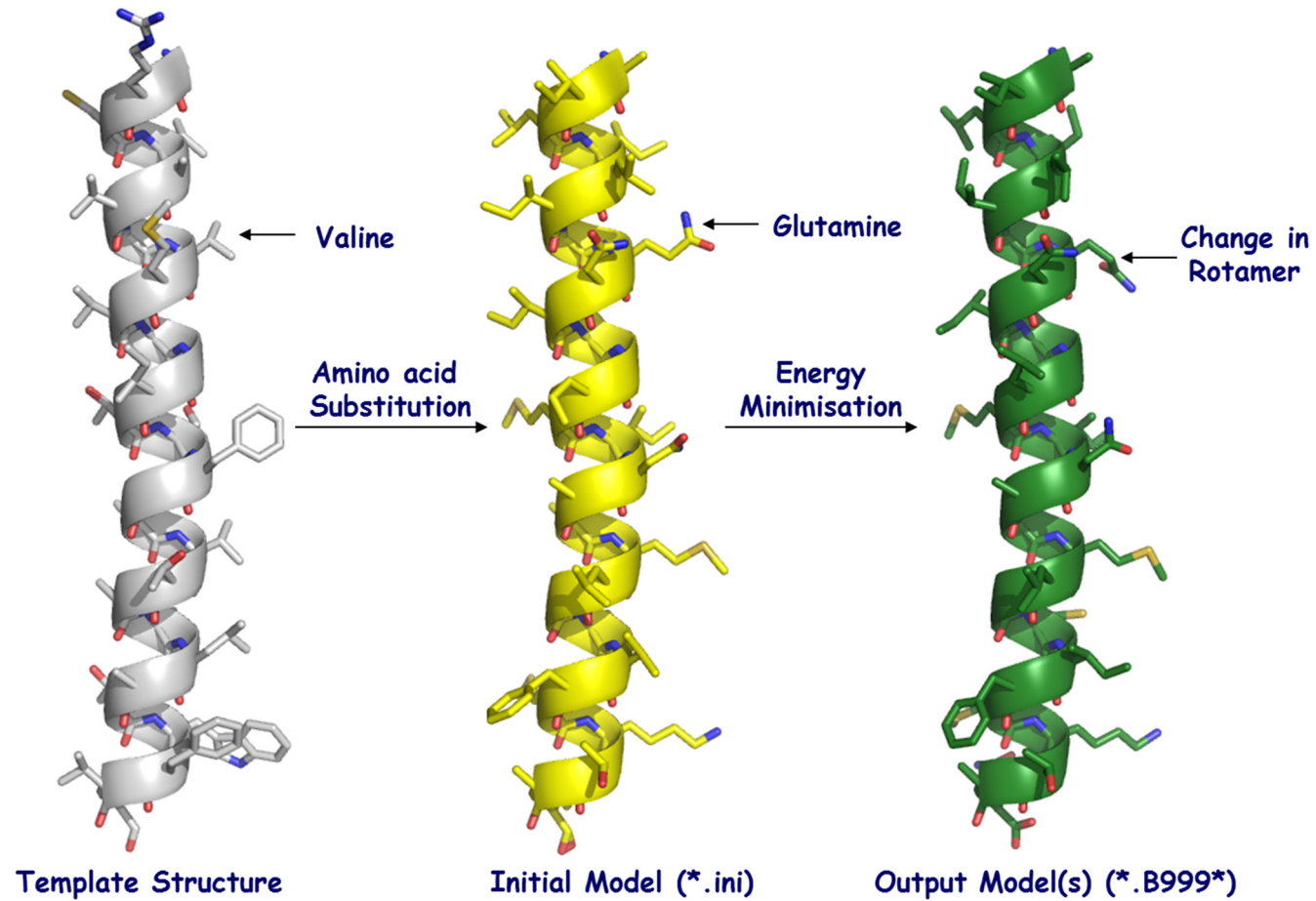
Alignement – pl. ClustalW

```

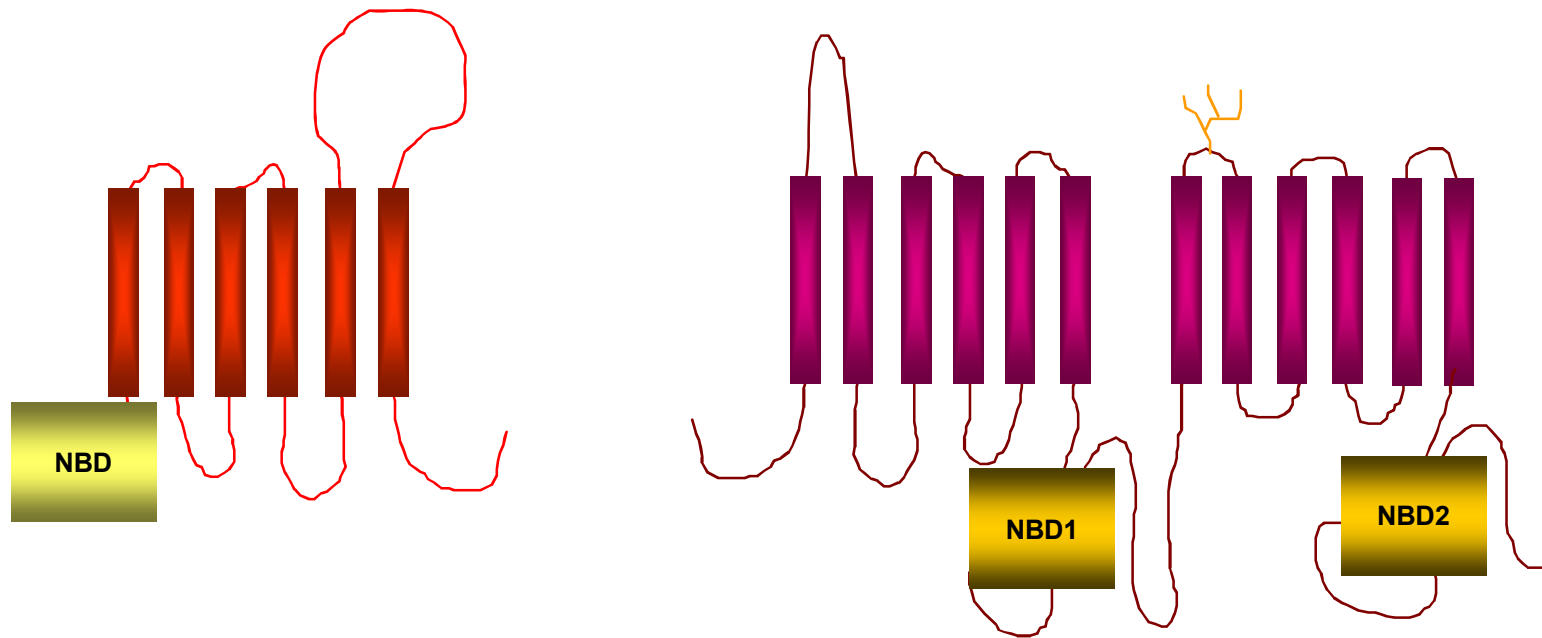
2HYD      -----MIKRYLQFVK-----PYKYRIFATIIVGIIKFGIPMLIP
3B5X      -----WQTFKRLWTYIR----LYKAGLVVSTIALVINAAADTYMI
CFTR_HUMAN MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDSADNLS
                *      :      :      *      :      :      *      :      :

```

Homológia modellezés II.

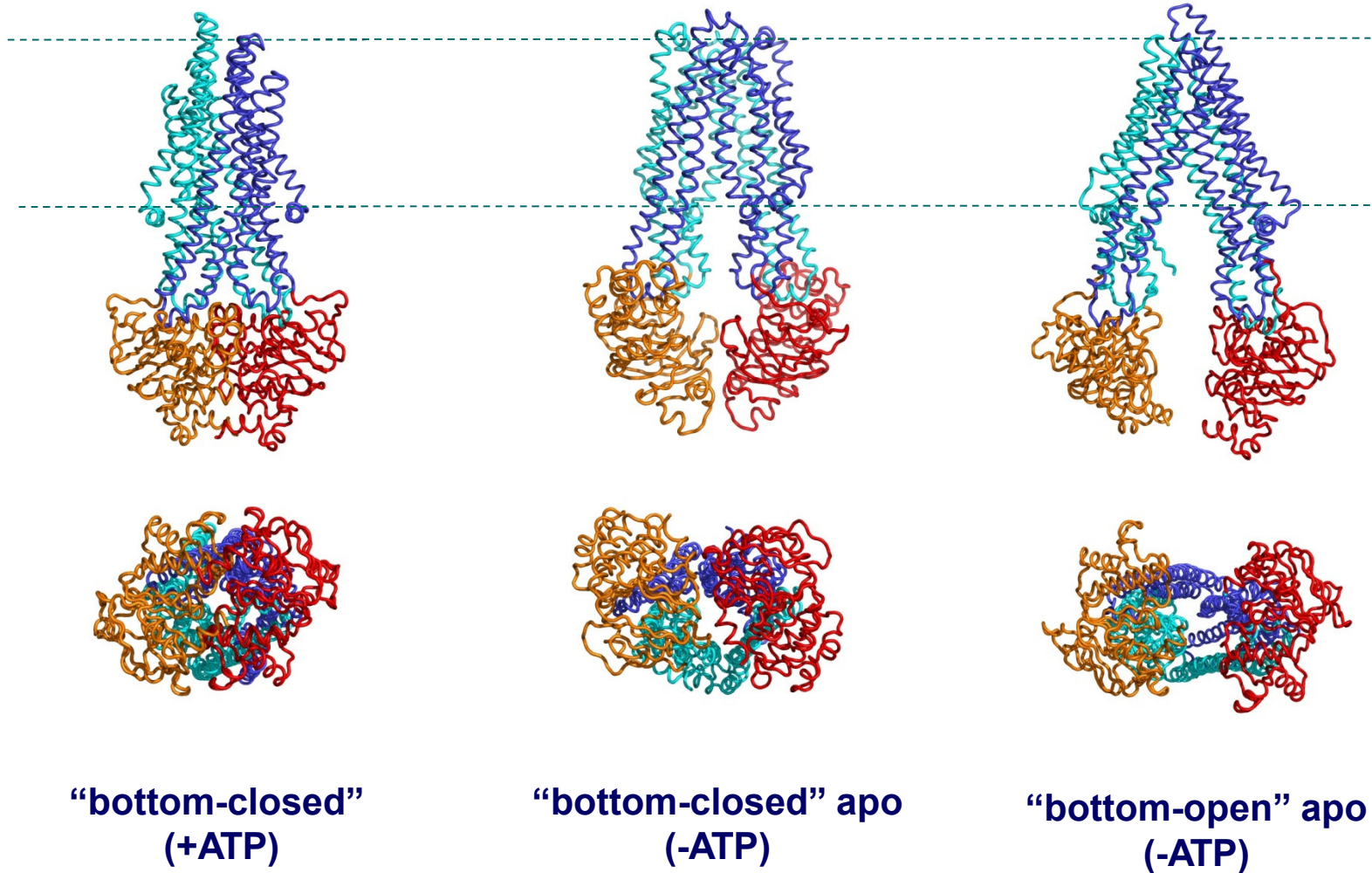


ATP Binding Cassette (ABC) proteins

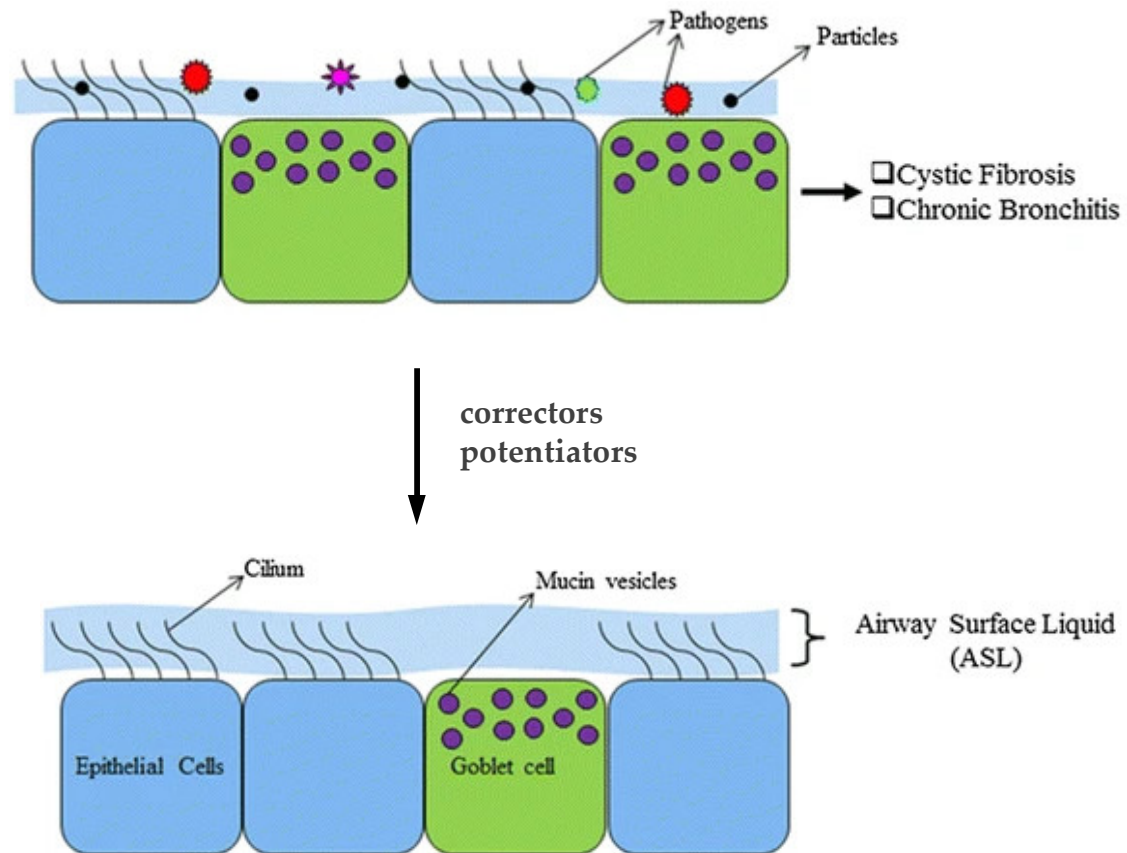


Conformation of ABC proteins

(Pgp-like)

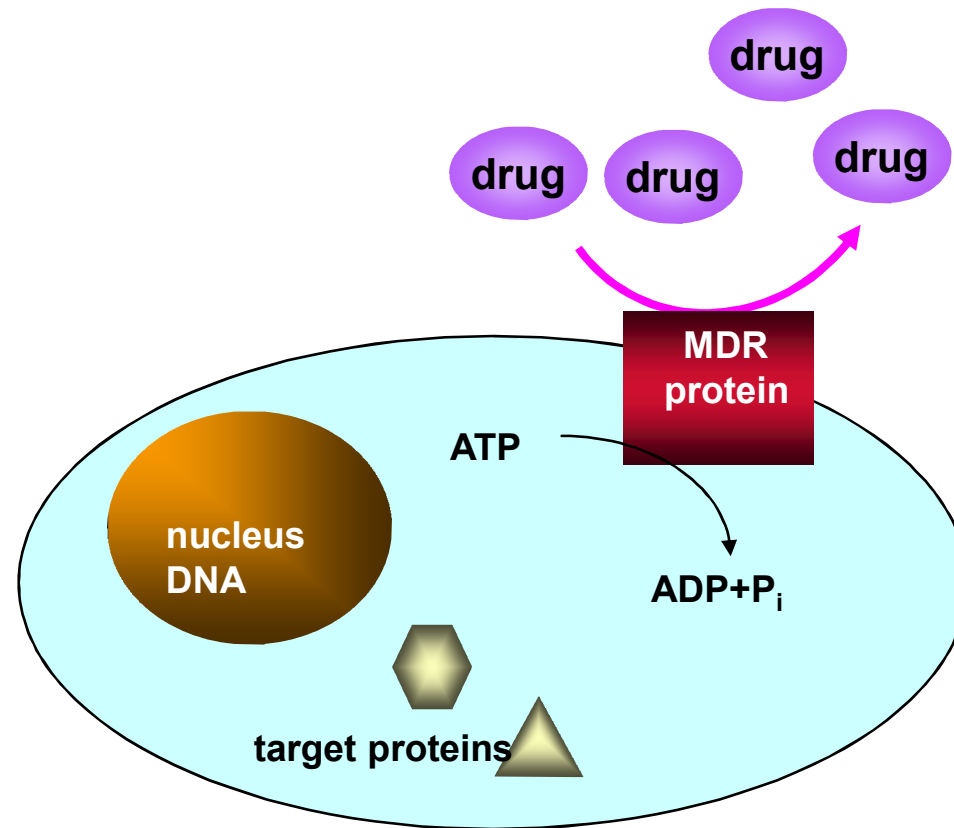


Cystic fibrosis (CF)



Ghosh, Boucher, Tarran,
CMLS 2015

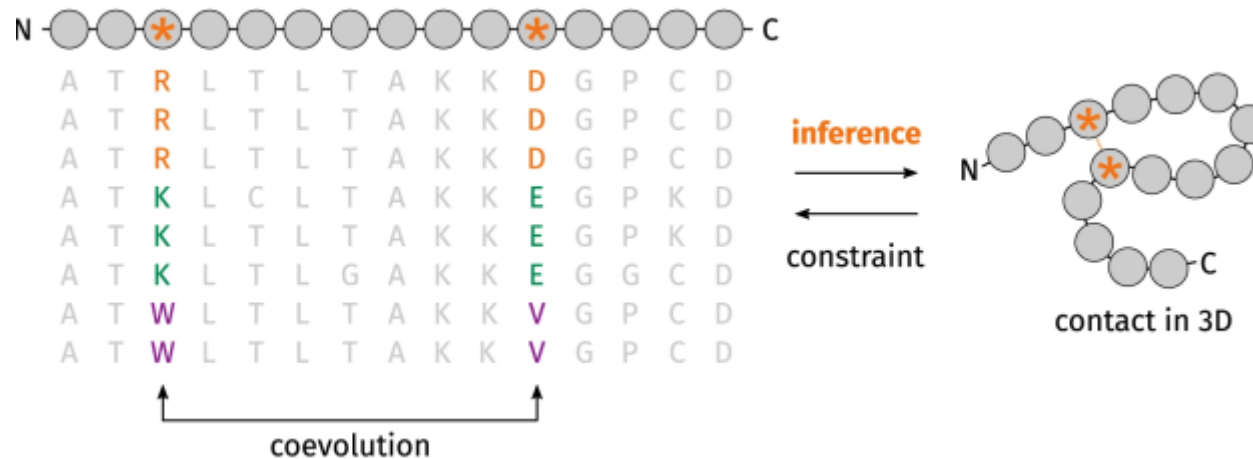
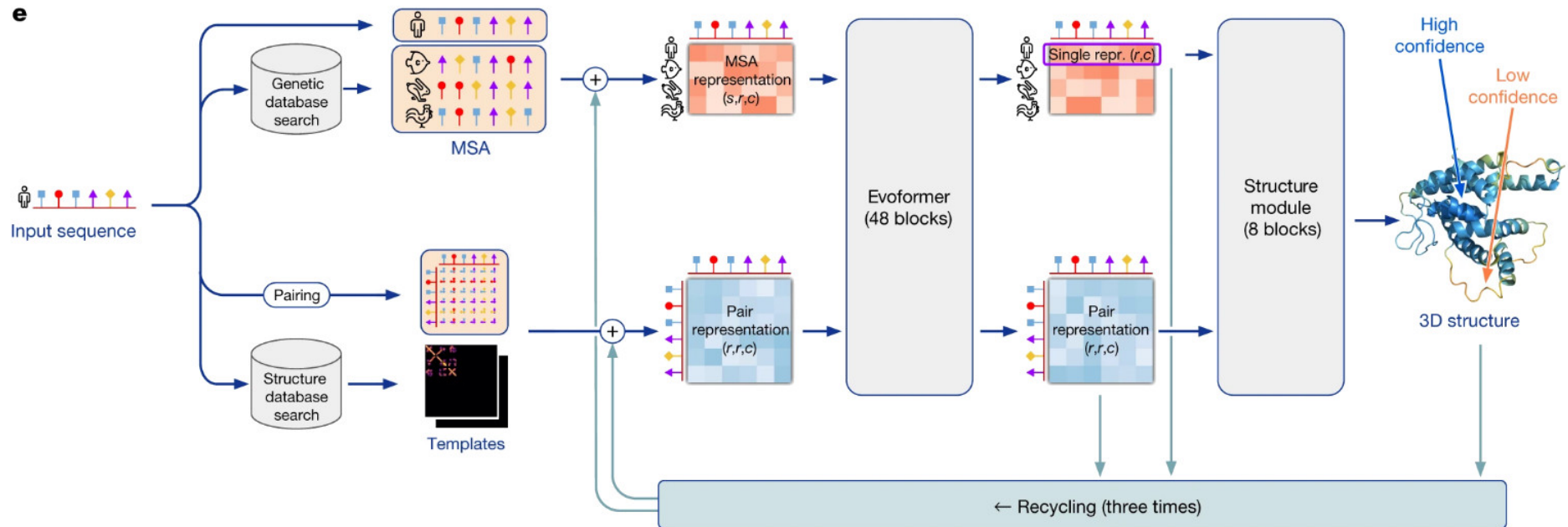
Multidrug transport – ABC proteins



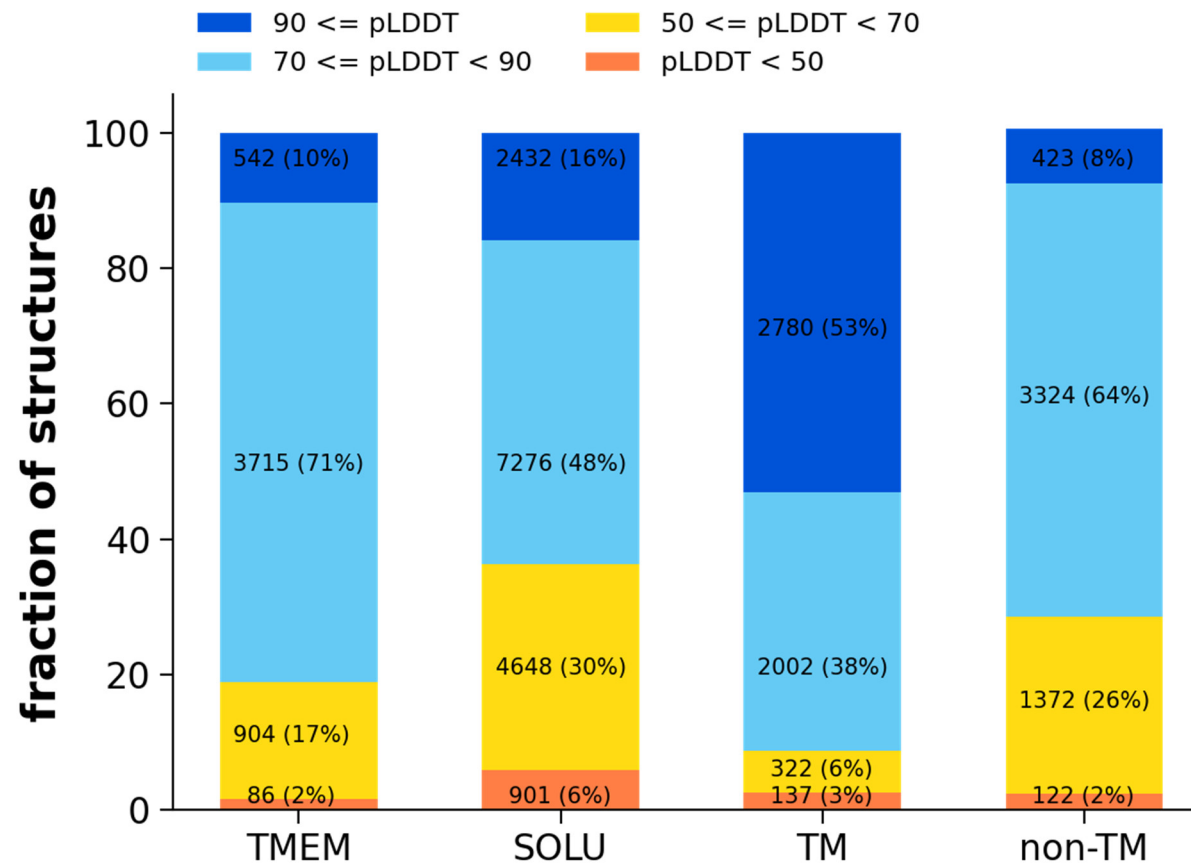
AlphaFold2

machine learning, deep learning, AI

Jumper et al. Nat 2021

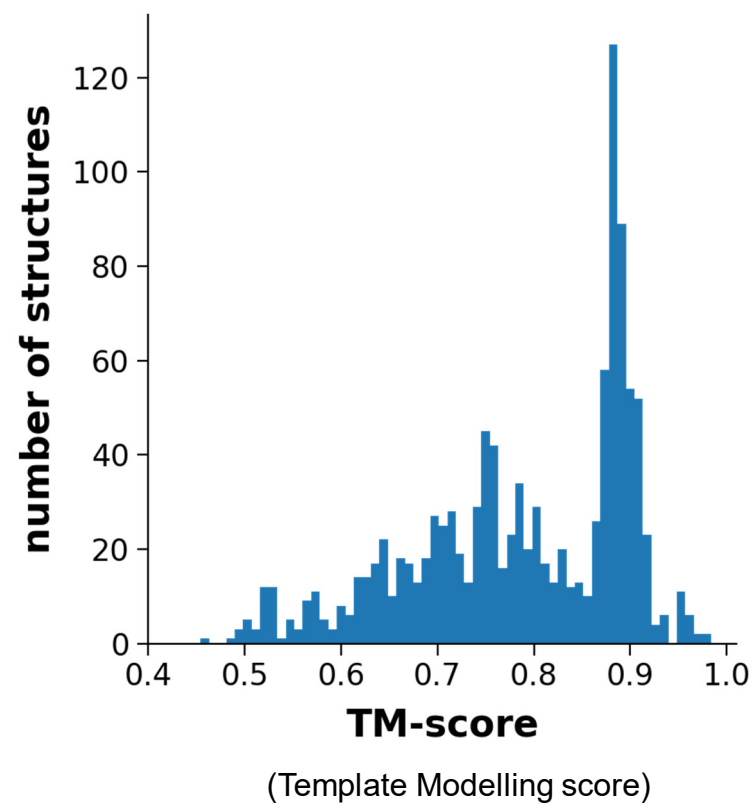
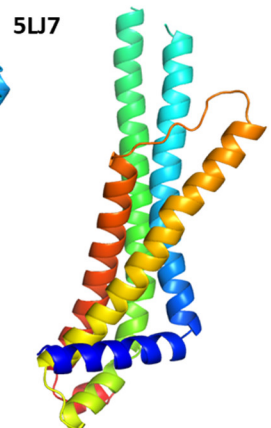
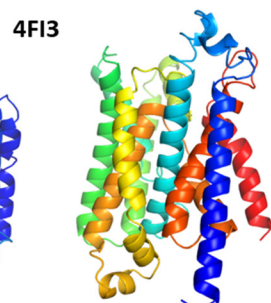
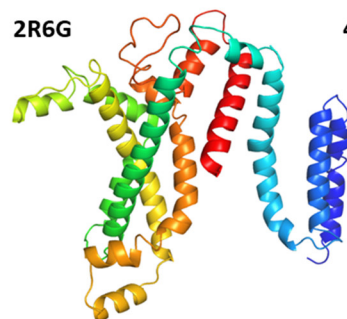
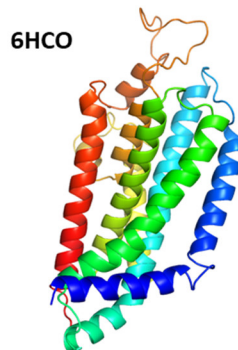


TM protein structure prediction by AF2

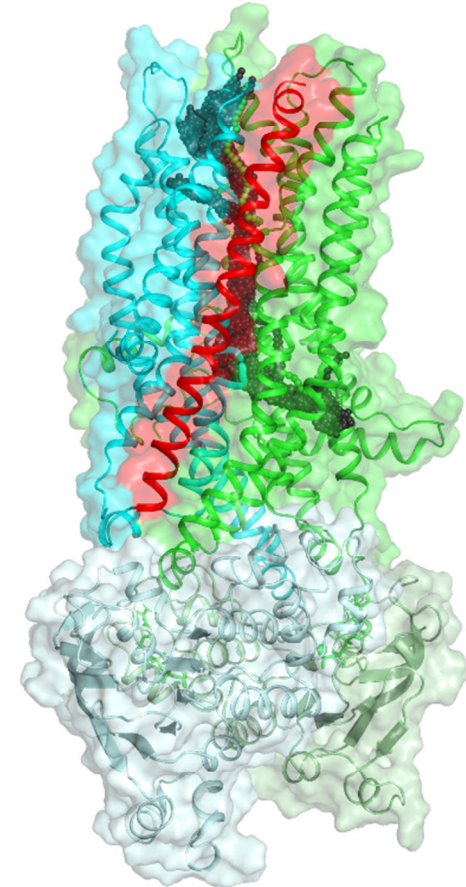
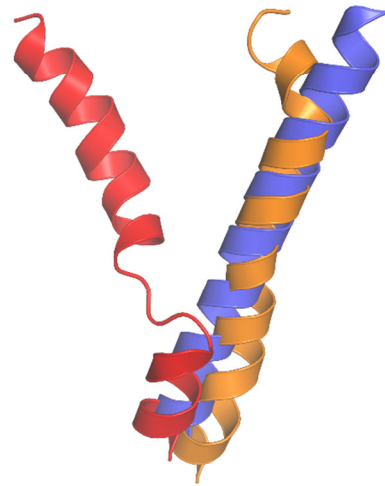
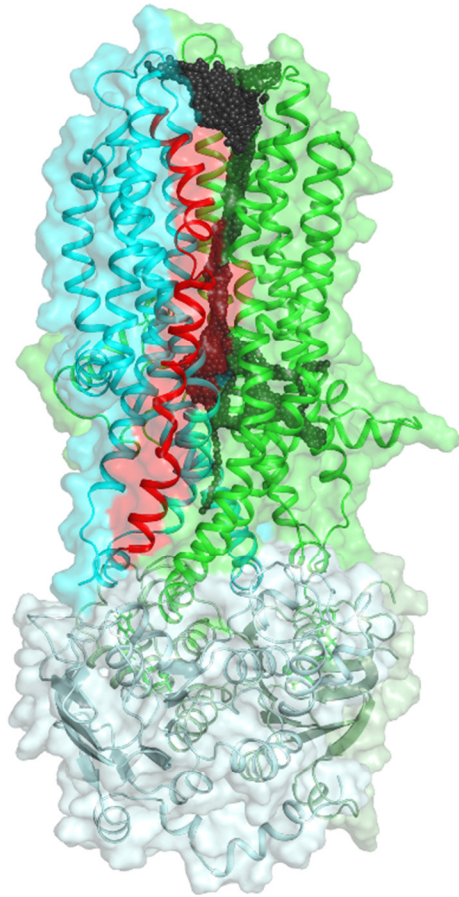


ABC protein folds

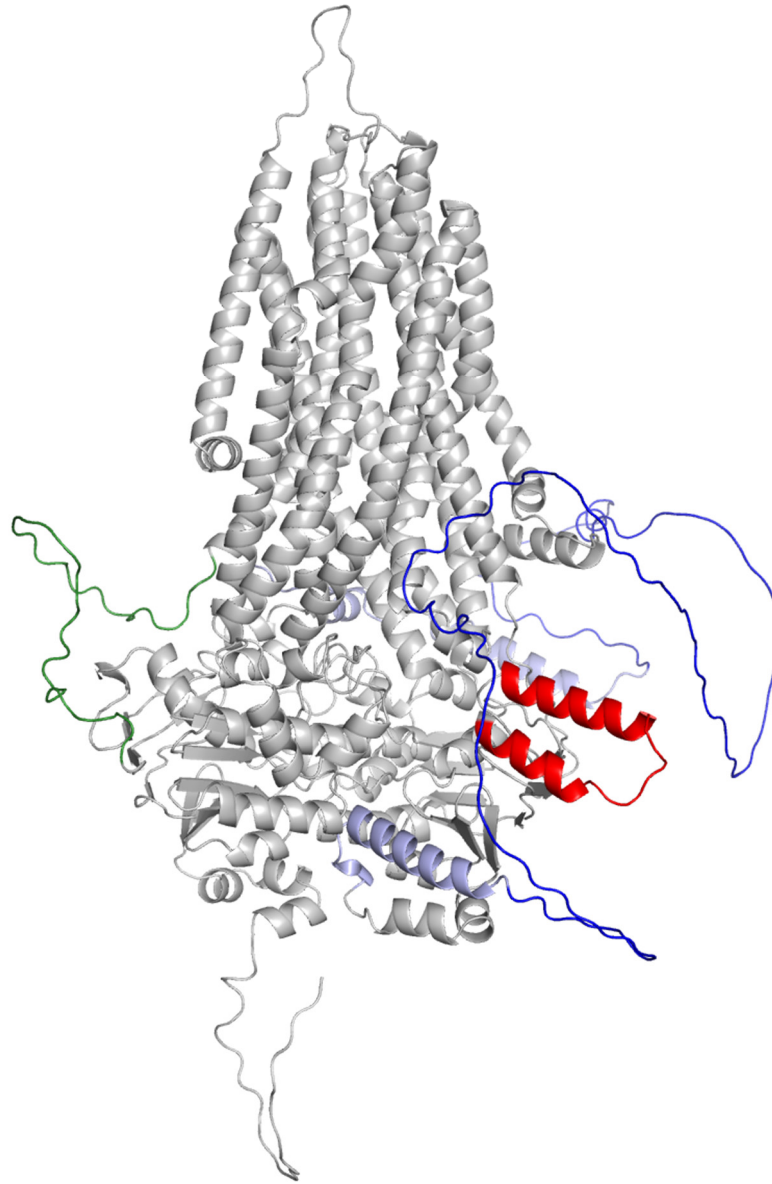
fold class	reference PDB
Pgp-like	4M1M
ABCG2-like	6HCO
MalFG-like	2R6G
BtuC-like	4FI3
EcT-like	4HUQ
LptFG-like	5X5Y
MacB-like	5LJ7
MlaE-like	7CH0



CFTR TM8

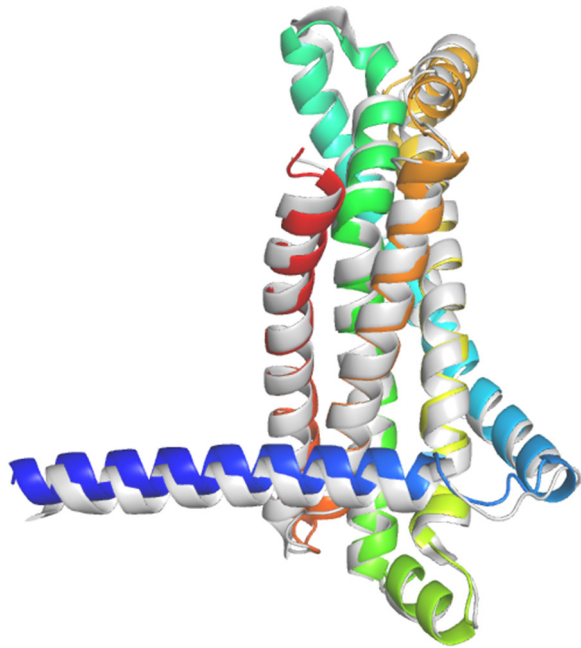


CFTR – disordered regions



pLDDT score - IDR prediction

Prediction of new TM folds



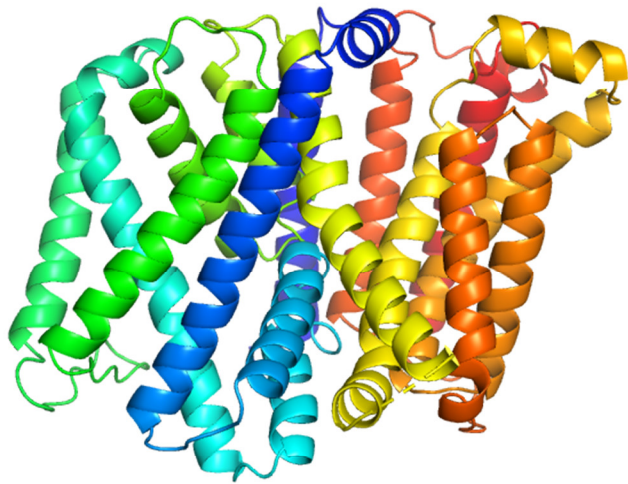
MlaE-like fold
PDBID: 7ch0
RMSD of 1.28 Å



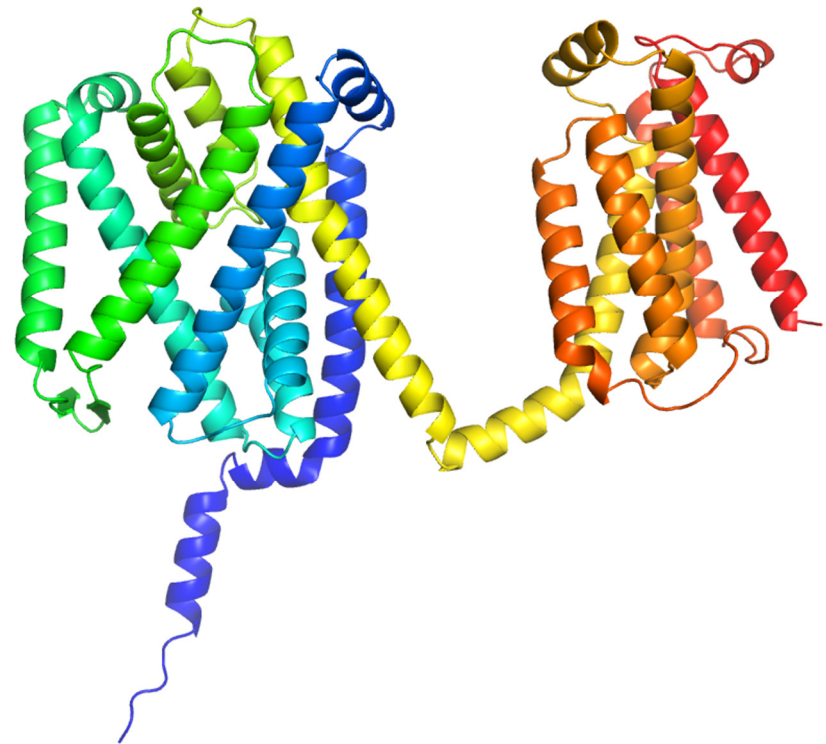
ER membrane protein complex subunit 6
PDBID: 6ww7
RMSD of 0.96 Å

Prediction of new TM folds

MprF (PDBID: 7DUW)



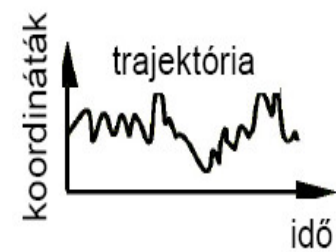
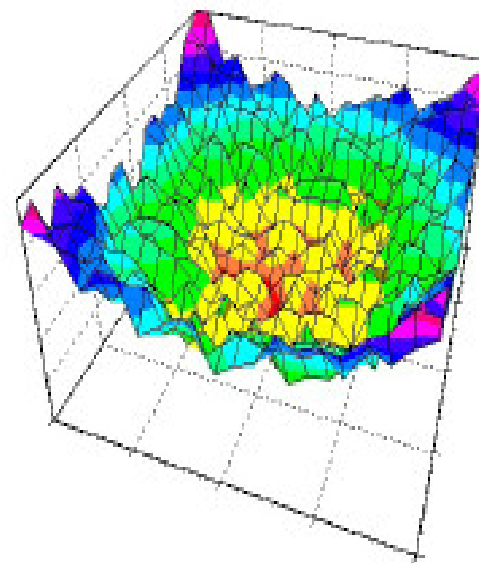
AF2



Van szerkezet, mozgassuk meg!

Molekula dinamika/Molecular dynamics

- valós potenciálfelület
- mozgásegyenletek
idő-lépésenkénti numerikus megoldása
- trajektória



A „force field”

Baker (2007)

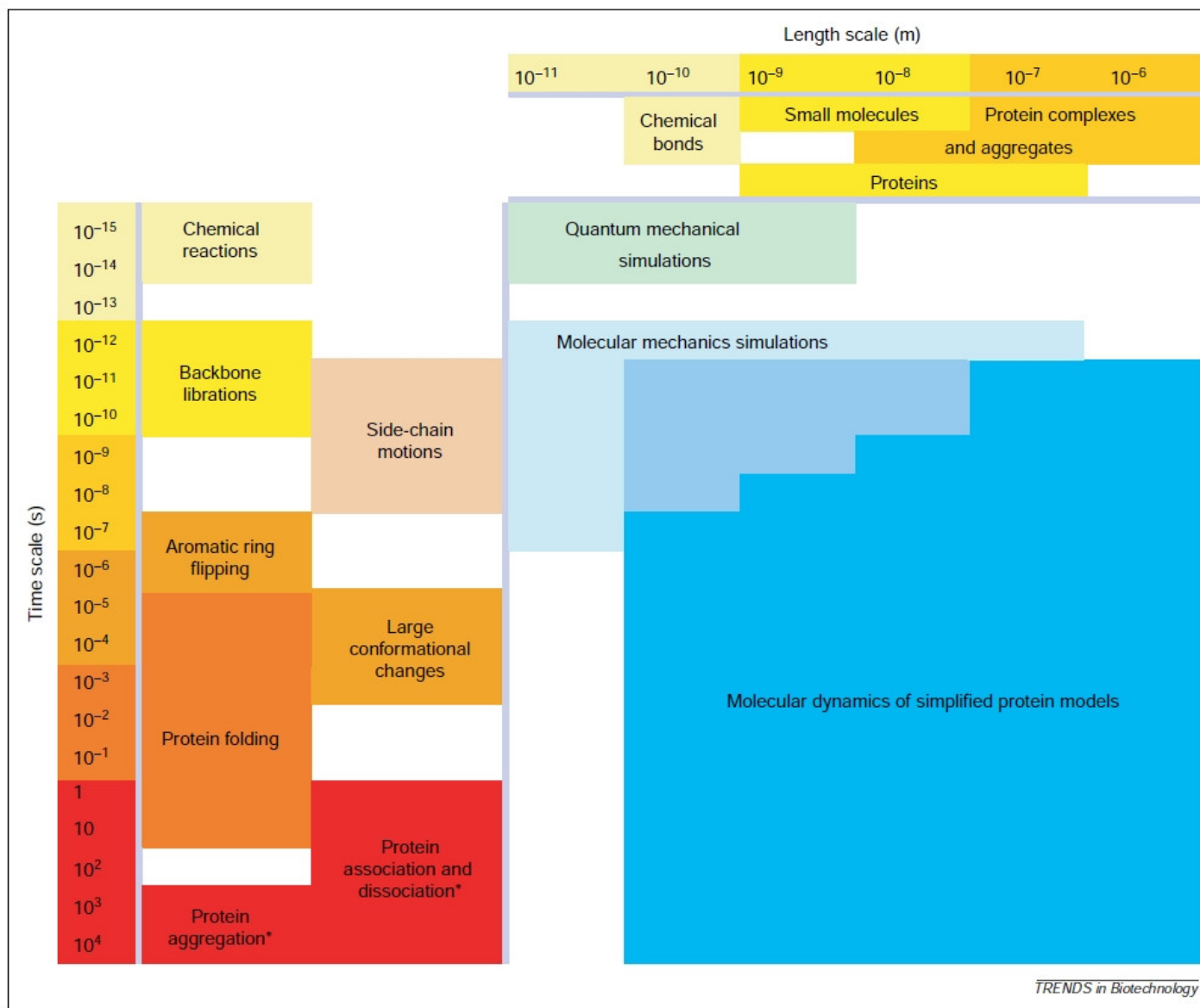
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

$$E_{\text{mbenv}} = \sum_i^{\text{natom}} \Delta G_i^{\text{ref}}(z') \quad \Delta G_i^{\text{ref}}(z') = (1 - f(z')) * (\Delta G_i^{\text{ref,chex}} - \Delta G_i^{\text{ref,water}})$$

TABLE II. Atomic Contribution to the Solvation Free Energy in Water and Cyclohexane

	Water	Chex		Water	Chex
CR	-0.890	-1.350	NH3	-20.000	-1.145
CH1E	-0.187	-0.645	NC2	-10.000	-0.200
CH2E	0.372	-0.720	N	-1.000	-1.145
CH3E	1.089	-0.665	OH1	-5.920	-0.960
CR1E	0.057	-0.410	O	-5.330	-1.270
NH1	-5.950	-1.145	OC	-10.000	-0.900
NR	-3.820	-1.630	S	-3.240	-1.780
NH2	-5.450	-1.145	SH1E	-2.050	-1.855

Események időskálája



F. Ding and N.V. Dokholyan, TRENDS in Biotechnology, 23:450 (2005)

Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

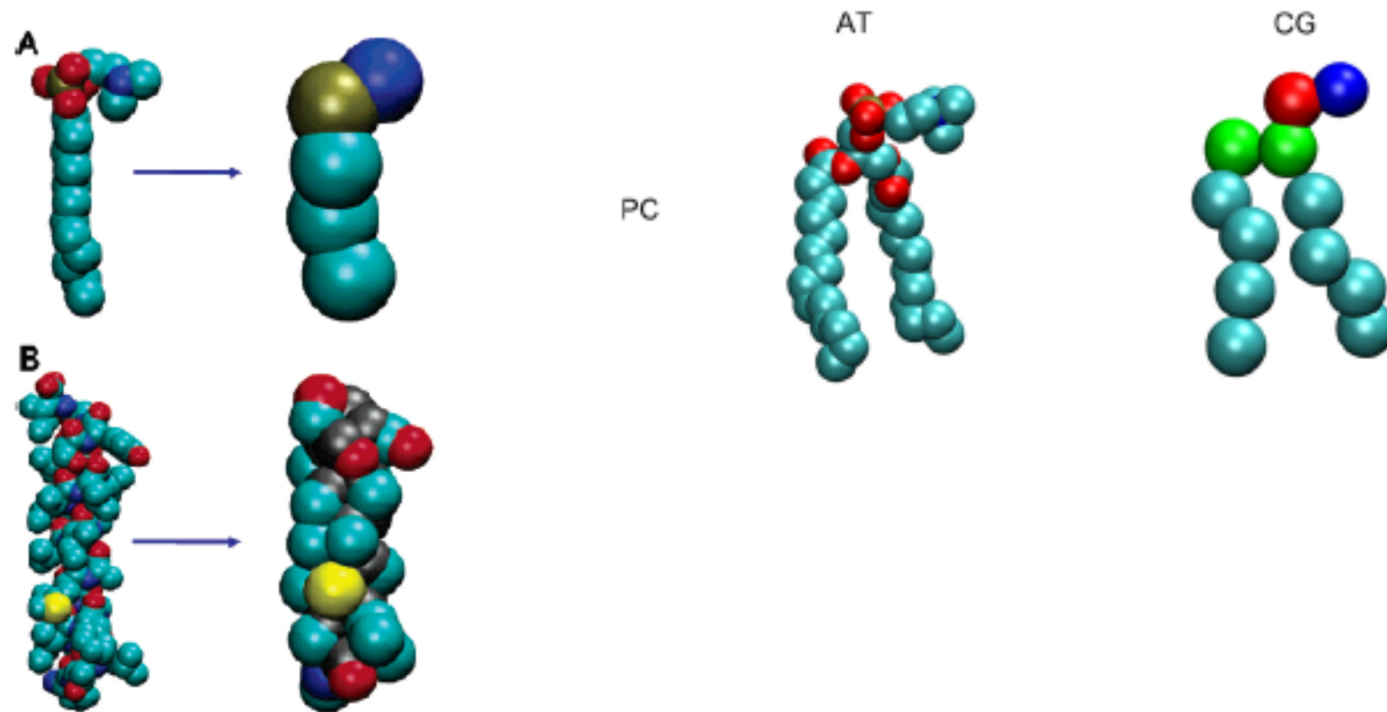
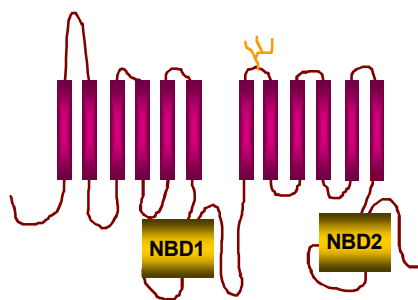


Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

Sansom, Oxford University
Marrink, Groningen, MARTINI force field

Fehérjék konformációinak stabilitása



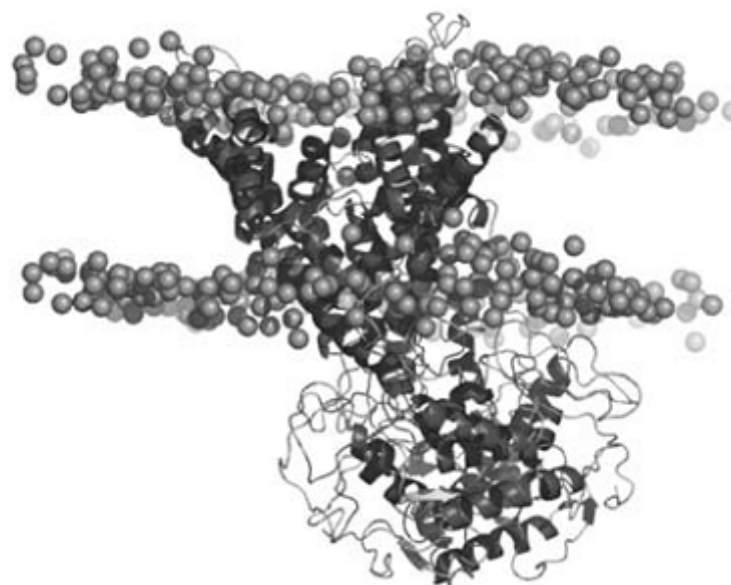
Eur Biophys J (2008) 37:403–409

B



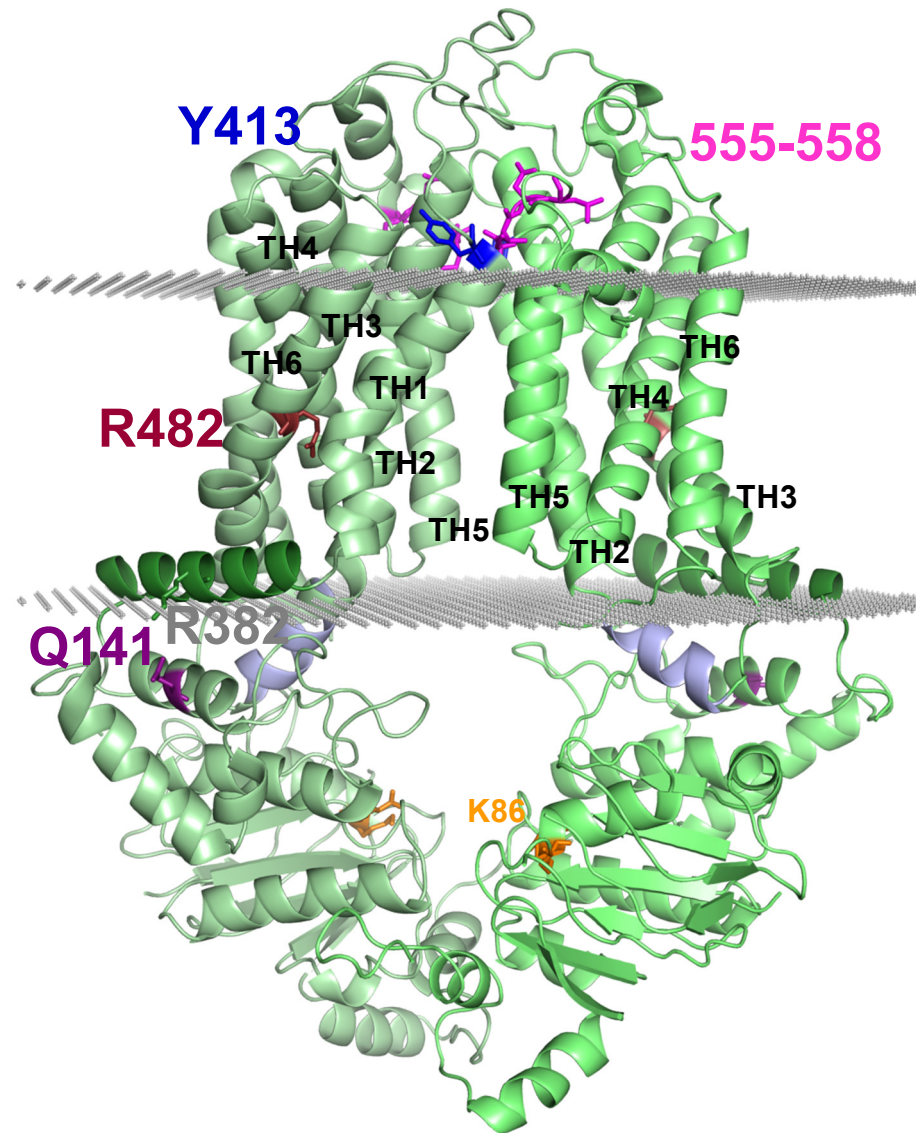
0 ns

C

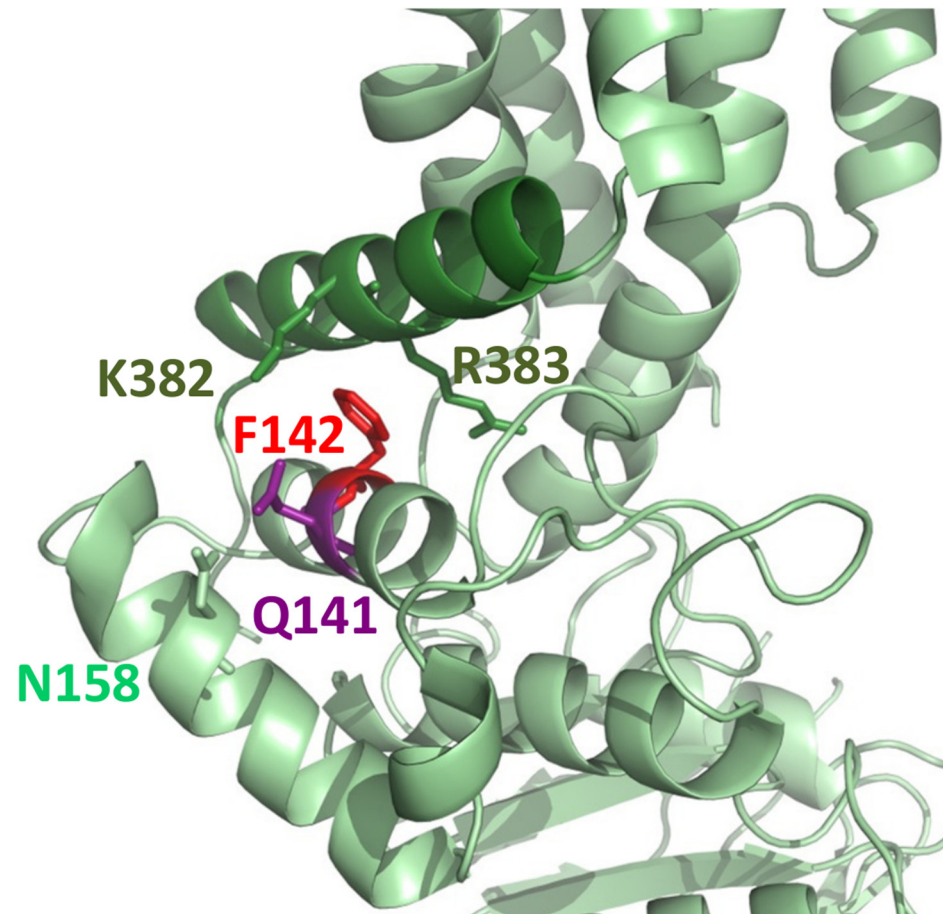


20 ns

Az ABCG2 modell



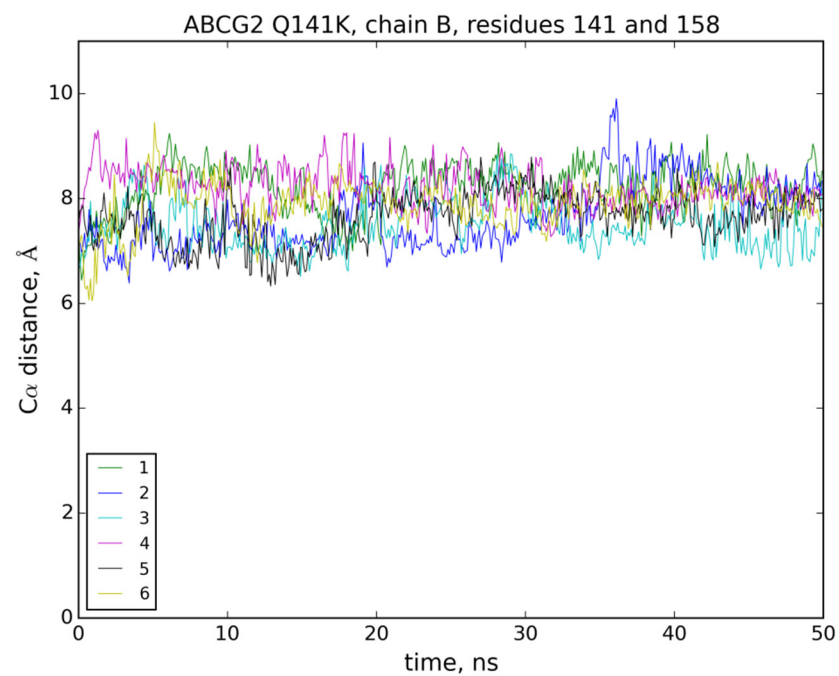
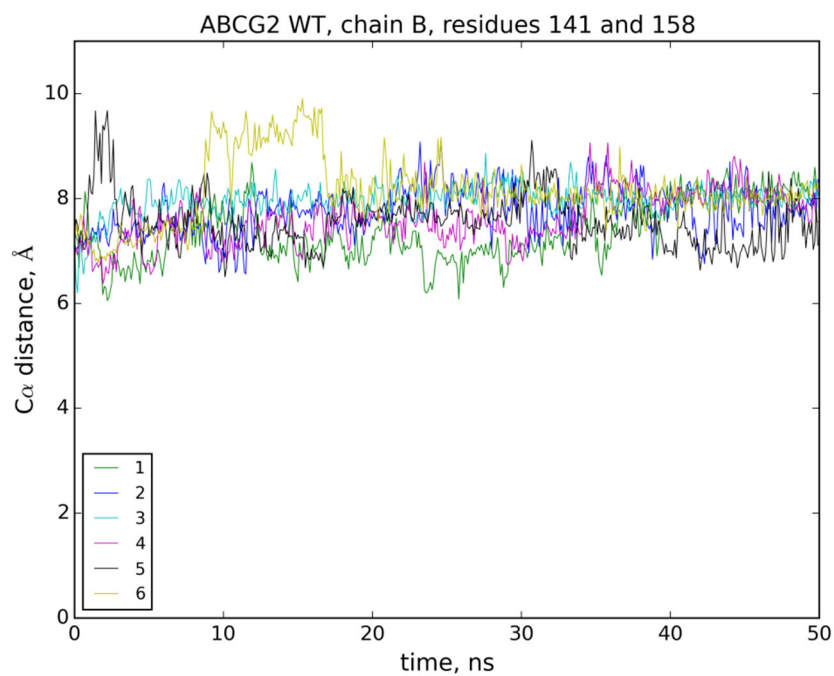
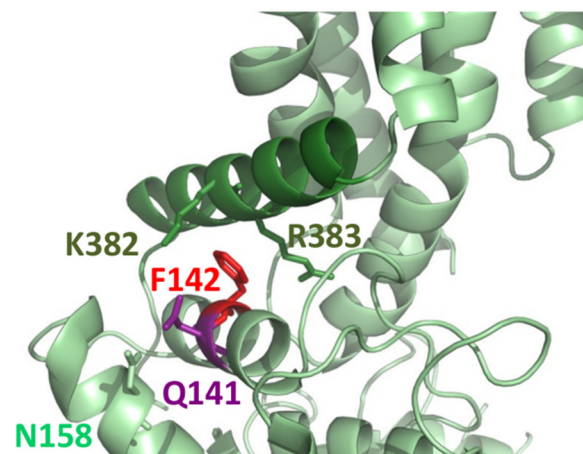
A Q141 helyzete



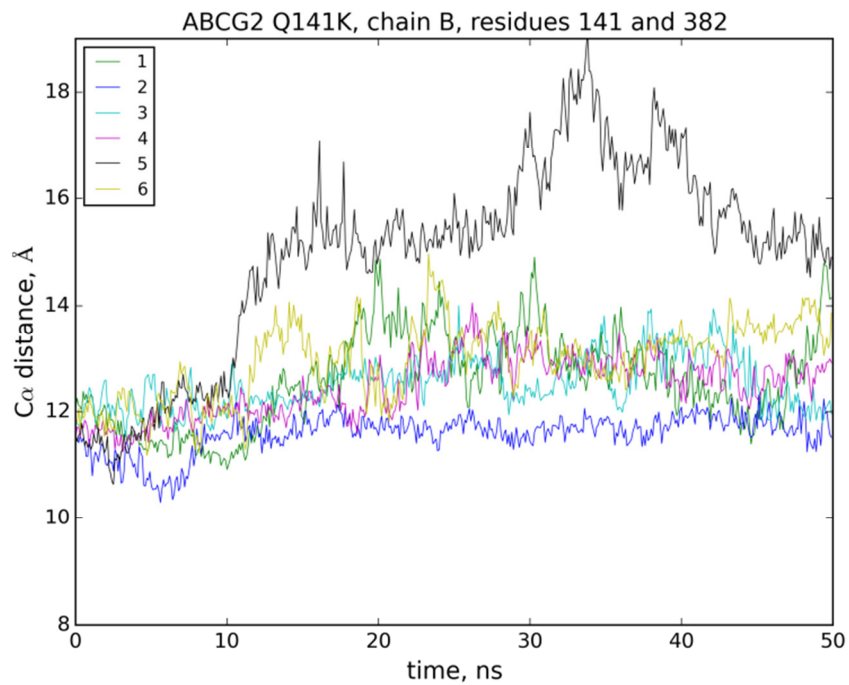
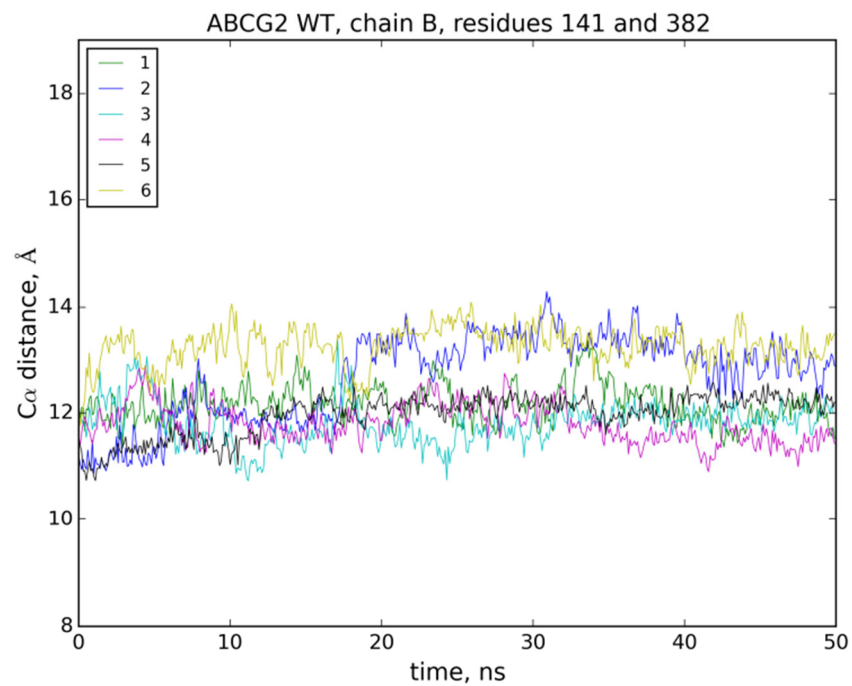
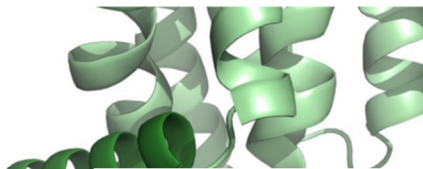
Molekula Dinamika (MD) szimulációk

- Az ABCG2 fehérjét membrán kettősrétegbe helyeztük (POPC)
- Az a.a. oldalláncok, lipidek és vízmolekulák elhelyezkedésének optimalizálása:
 - energia minimalizáció
 - egyensúlyba hozás (6 db párhuzamos)
 - minimális gerinc-mozgás (position constrains)
- Production run
 - no constraints
 - 50 ns x 6 = 300 ns;
- WT és variánsok összehasonlítása
(pl. Q141K, R482G)

Q141K csere hatása a 141/158 kölcsönhatásra



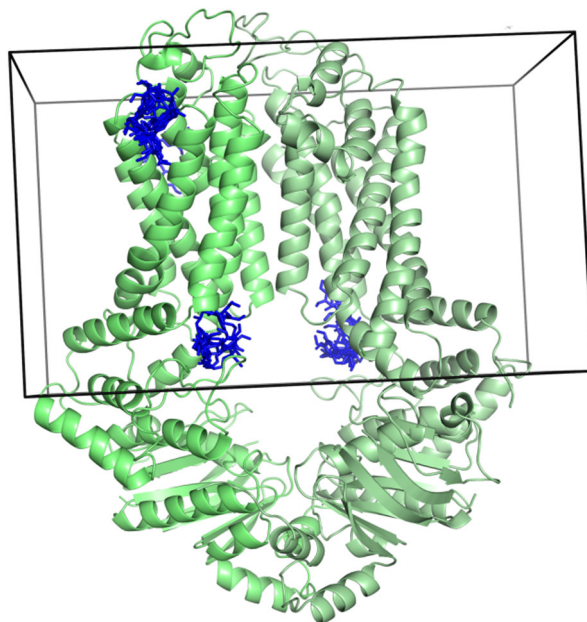
A Q141K hatása a 141/382 (NBD/TMD) kapcsolatra



Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

AutoDock Vina

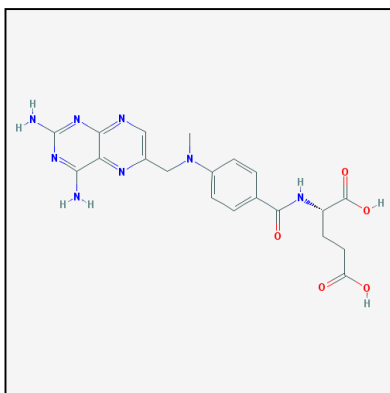
- Fix fehérje, flexibilis ligand
- Több konformáció (6 db, egyensúlyba hozott)
- Doboz; ligand odapróbálása nagyon sokszor (ebből 20/futás)



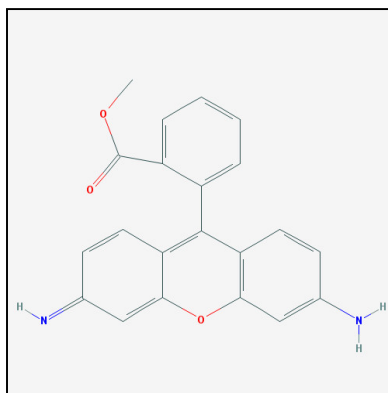
Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással AutoDock Vina

- Fix fehérje, flexibilis ligand
- Több konformáció (6 db, egyensúlyba hozott)
- Doboz; ligand odapróbálása nagyon sokszor (ebből 20/futás)
- Mindent oda lehet dokkolni... ezért szubsztrát + nemszubsztrát

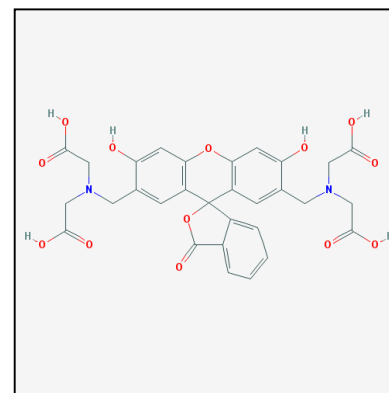
methotrexate



rhodamine123

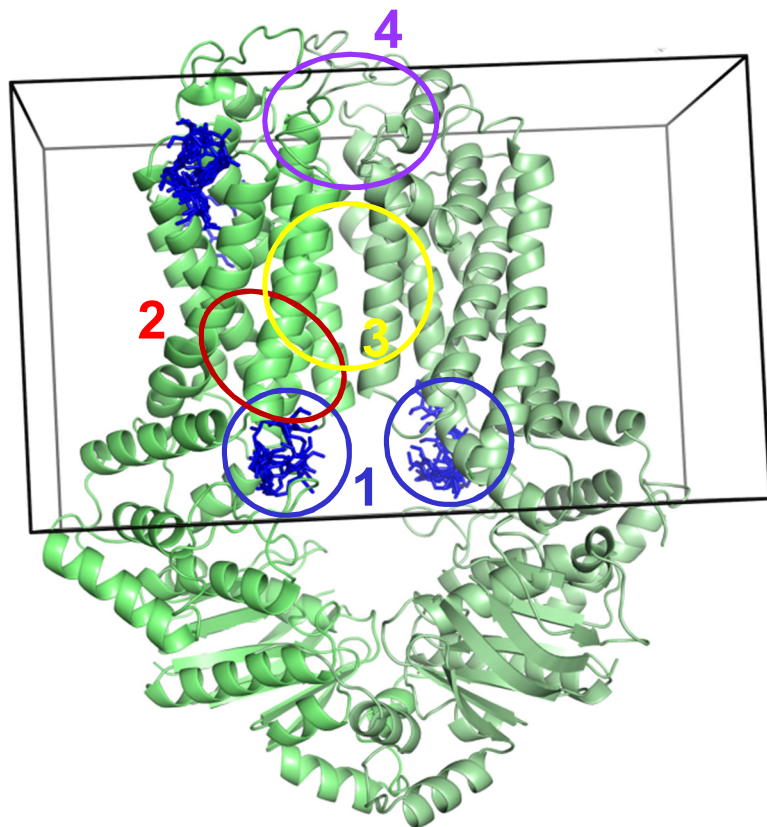


calcein

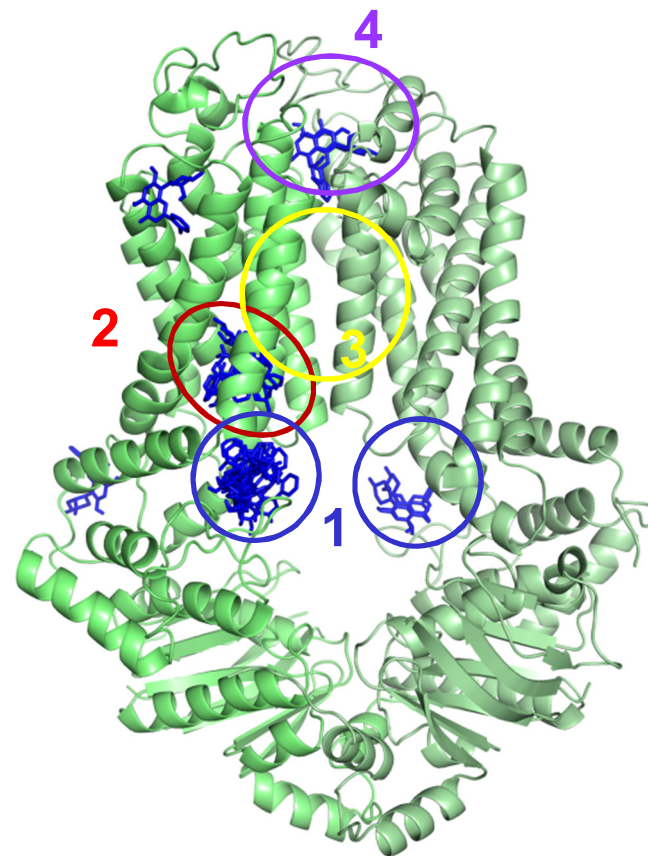


Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

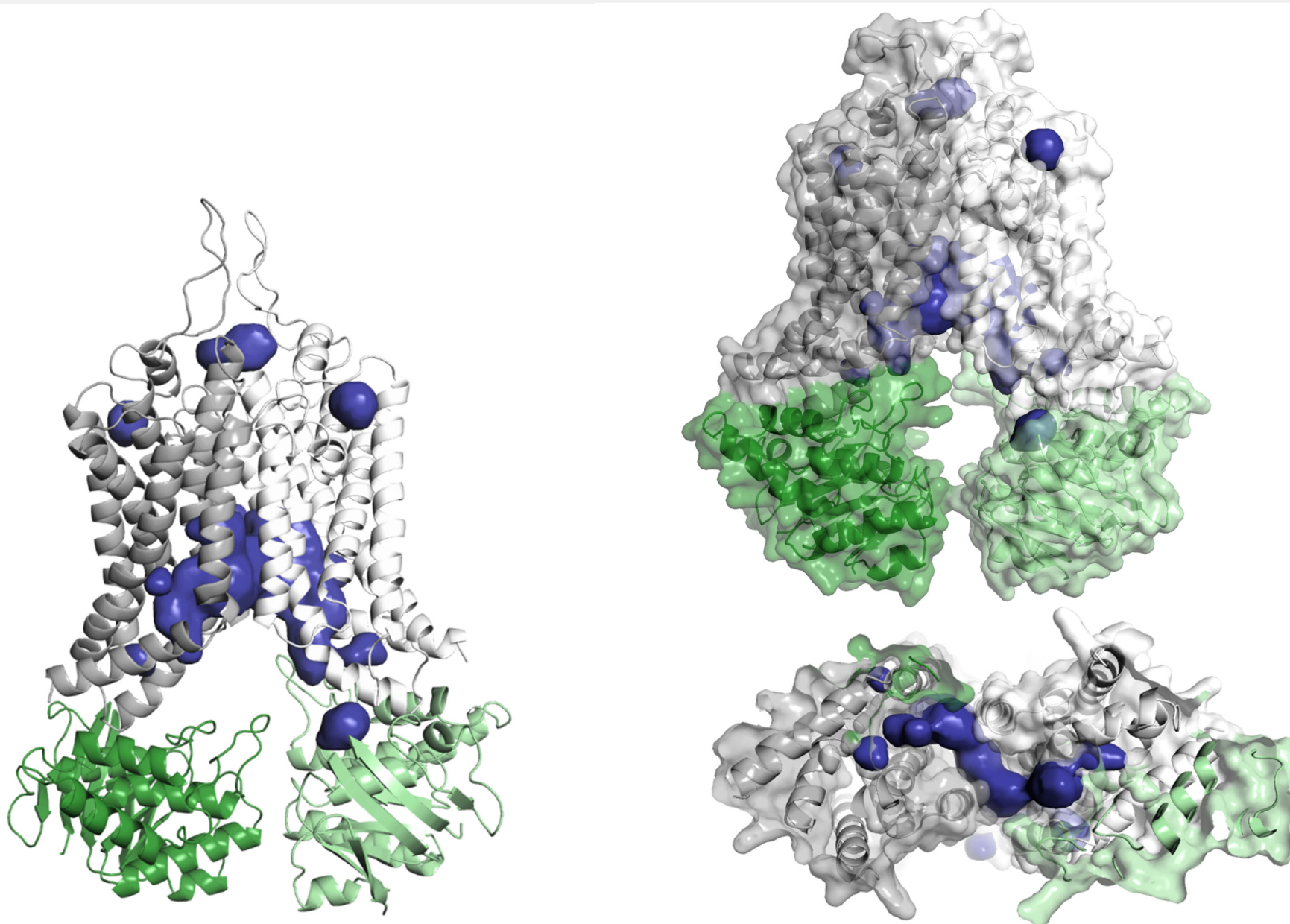
verapamil



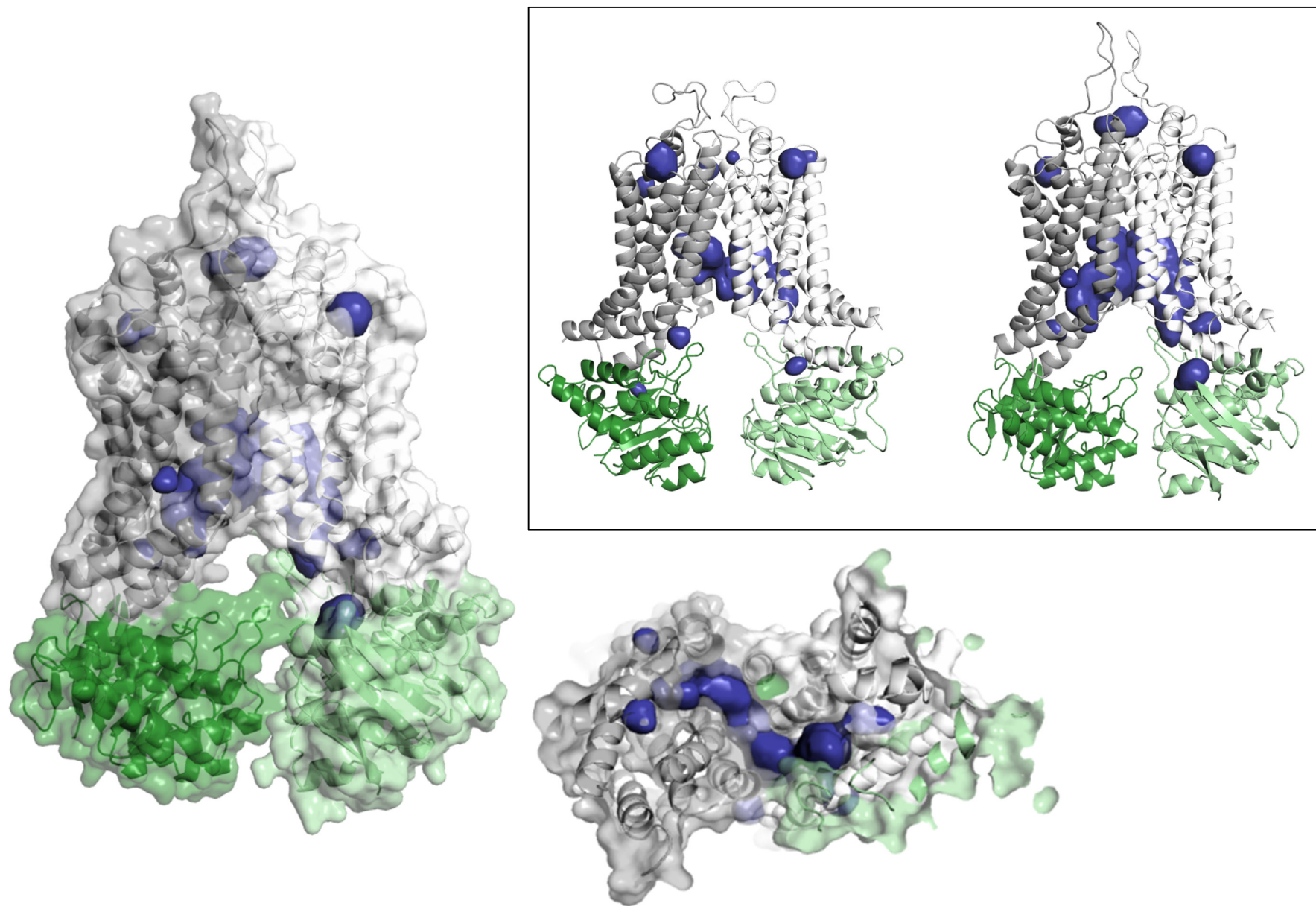
flavopiridol



A drog-kötő zsebek dinamikus változása

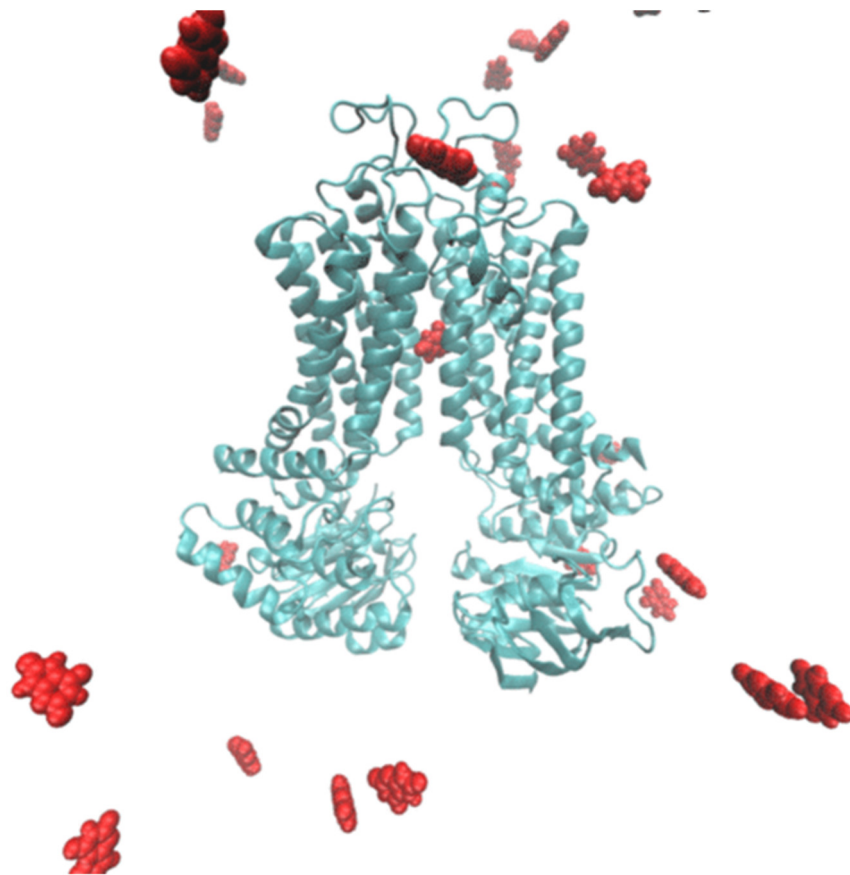


A drog-kötő zsebek dinamikus változása



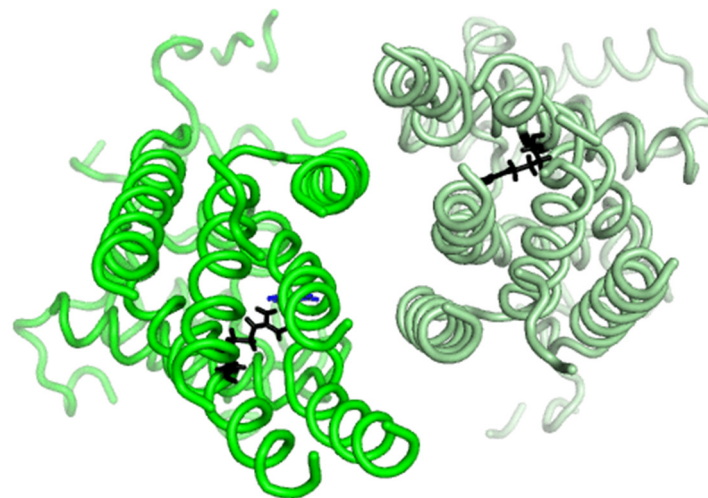
Describing the transport using MD

equilibrium simulations, uric acid molecules

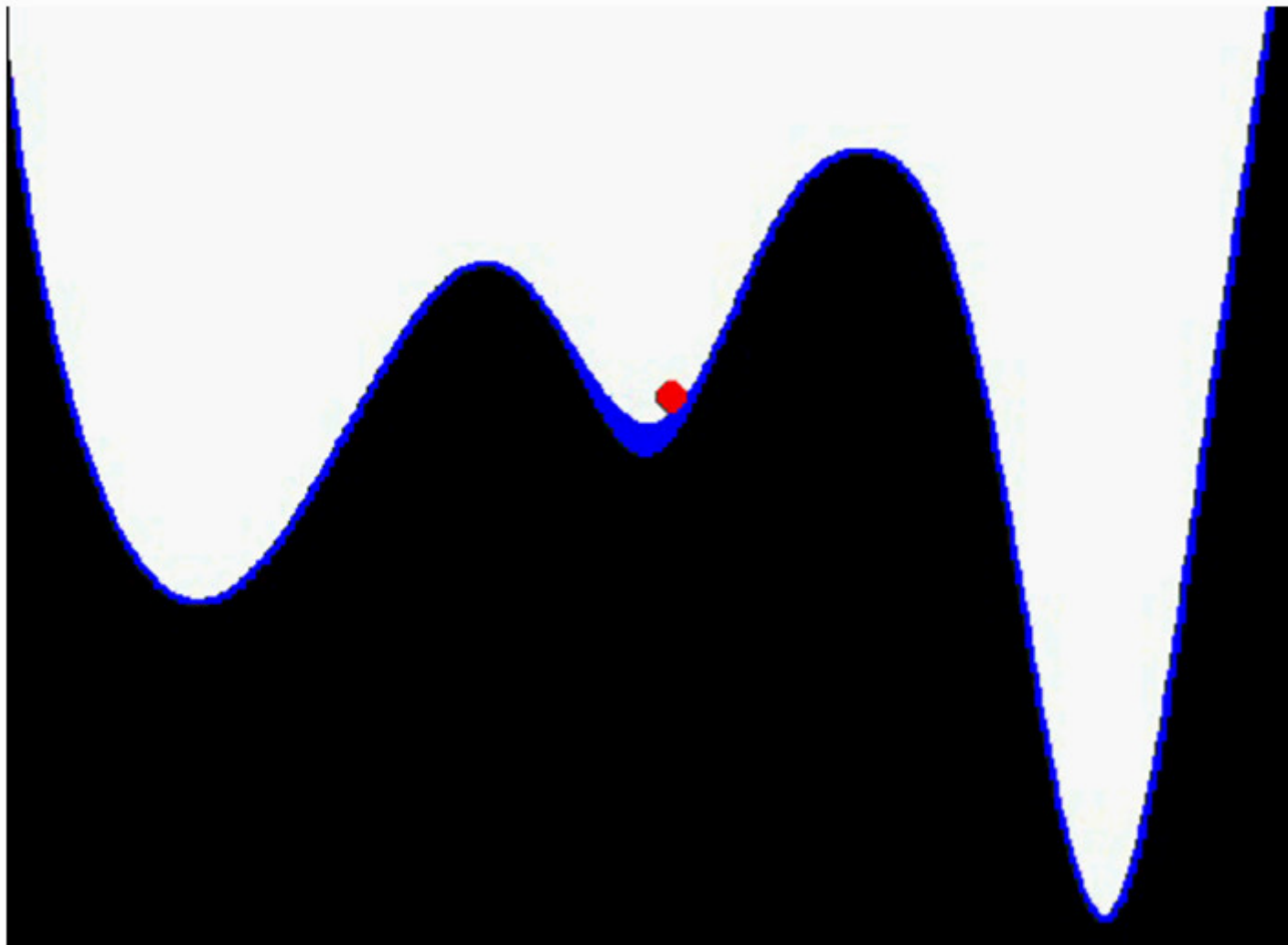


Describing the transport using MD

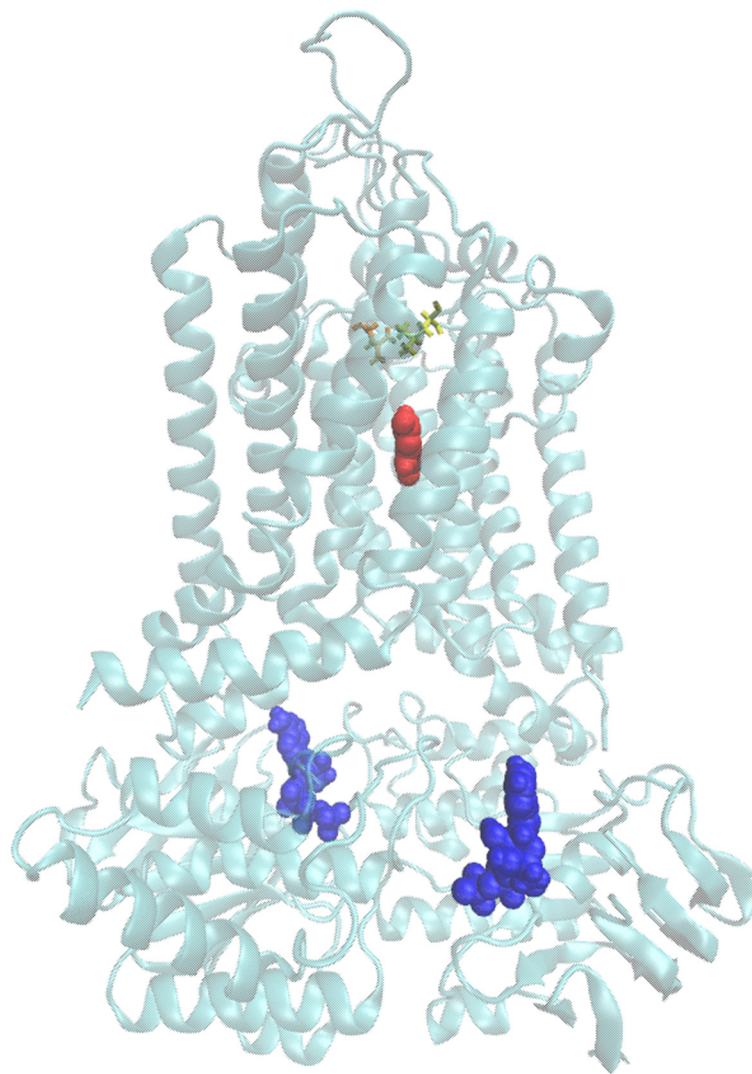
equilibrium simulations, uric acid molecules



A „exit” jellemzése metadinamikával

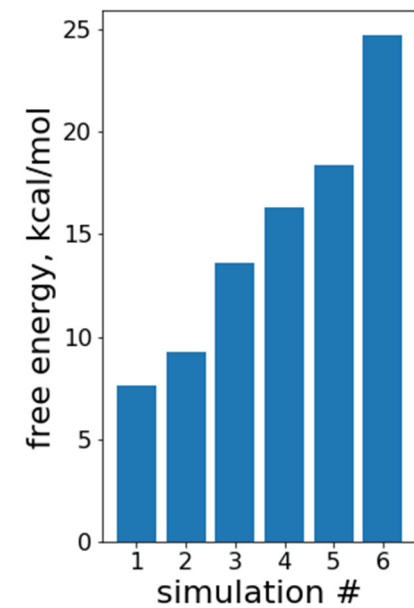
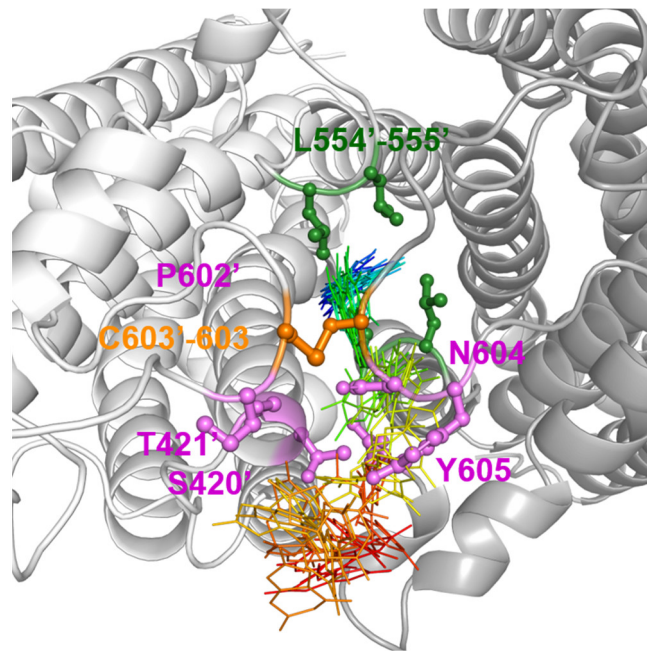
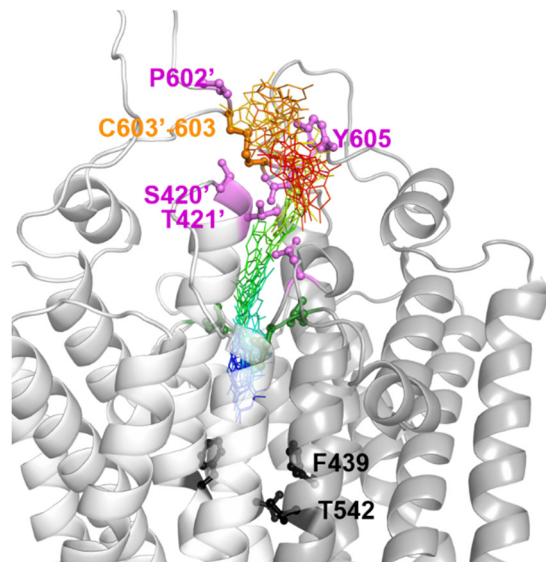


A „exit” jellemzése metadinamikával

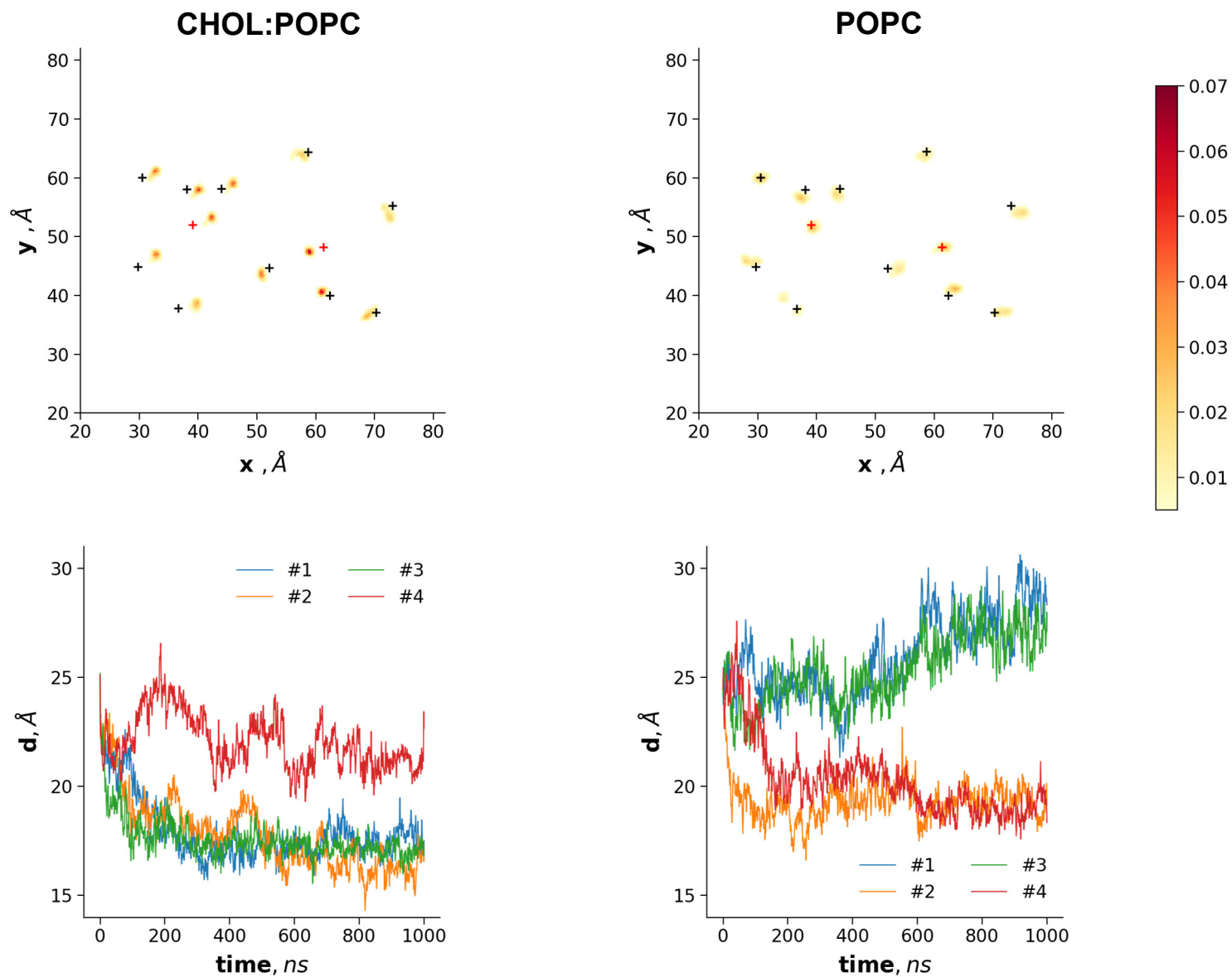


A 3D ribbon diagram of a protein structure, likely a dimeric enzyme or transporter, shown in light blue. The protein is composed of several alpha-helices and beta-sheets. A small molecule ligand, represented by a stick model with yellow, orange, and red atoms, is bound within the protein's active site. Two clusters of residues are highlighted in blue spheres: one cluster is located near the bottom left, and the other is near the bottom right, both appearing to be part of the protein's exit pathway or binding site.

A „exit” jellemzése metadinamikával

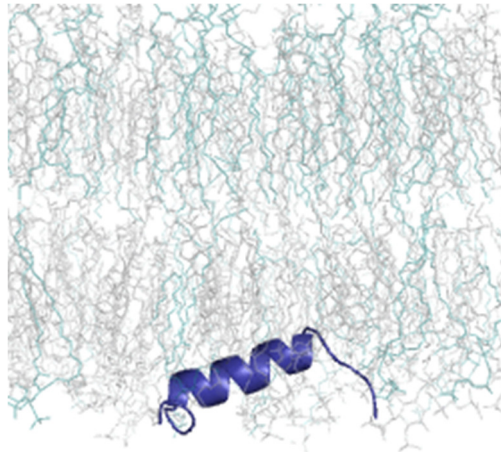


A koleszterin elősegíti a transzportot megelőző záródást



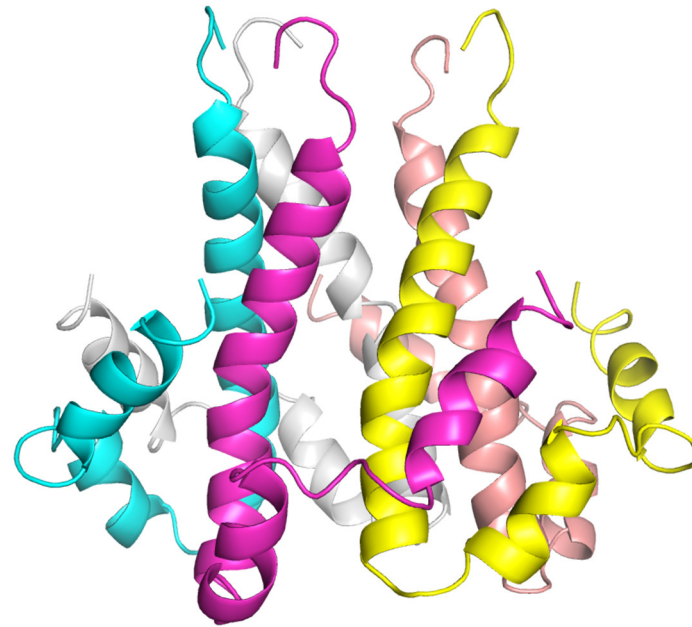
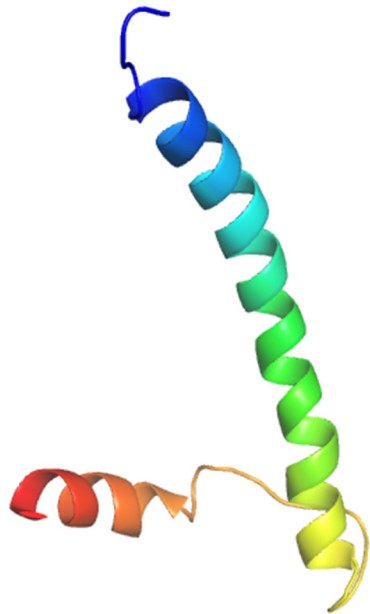
MemMoRFs

Membrane Molecular Recognition Features, <https://memmorf.hegelab.org>

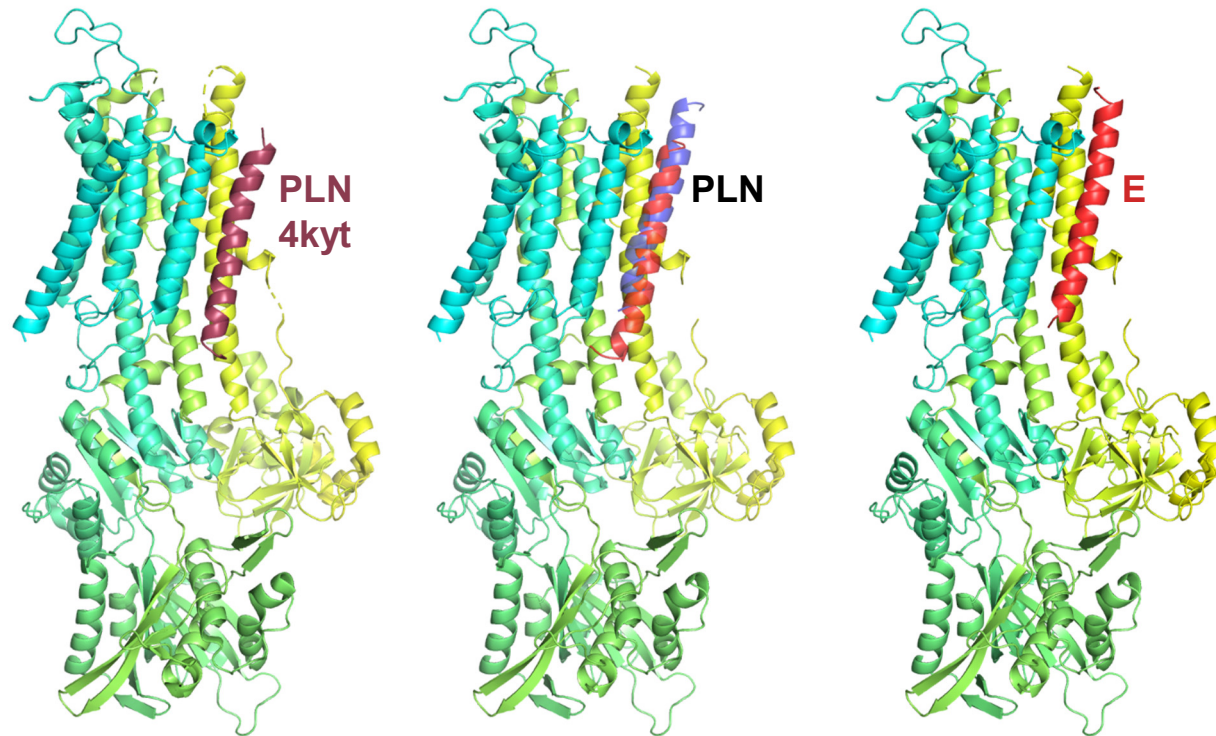


SARS CoV-2, E protein

E protein

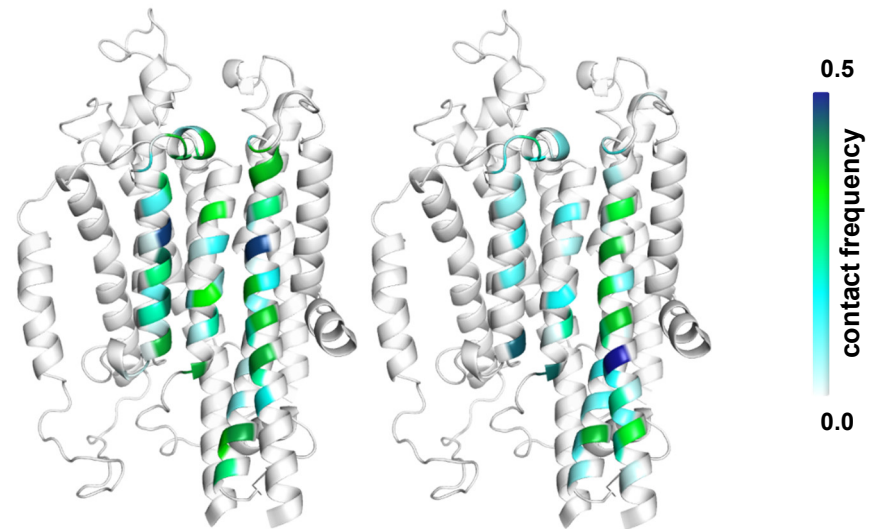
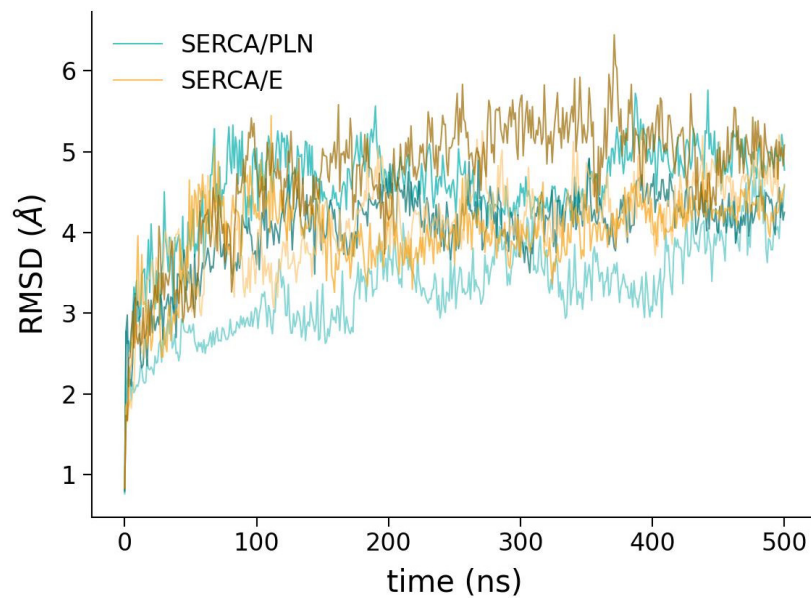


SARS CoV-2, E protein



SERCA/regulin komplexek stabilitása

MD szimulációk



Összefoglalás

➤ Fehérje dinamika

1. Szerkezet
2. Szolvatálás
3. Energiaminimalizálás
4. Egyensúlyba hozás
5. *Production run*

➤ Számításos módszerek igen fontosak

➤ Fehérjék működésének és mutációk hatásának megismerése

➤ Gyógyszertervezés

www.hegelab.org
hegedus.tamas@hegelab.org