

Elméleti módszerek lipidek és membránfehérjék tanulmányozására

Hegedűs Tamás

tamas@hegelab.org

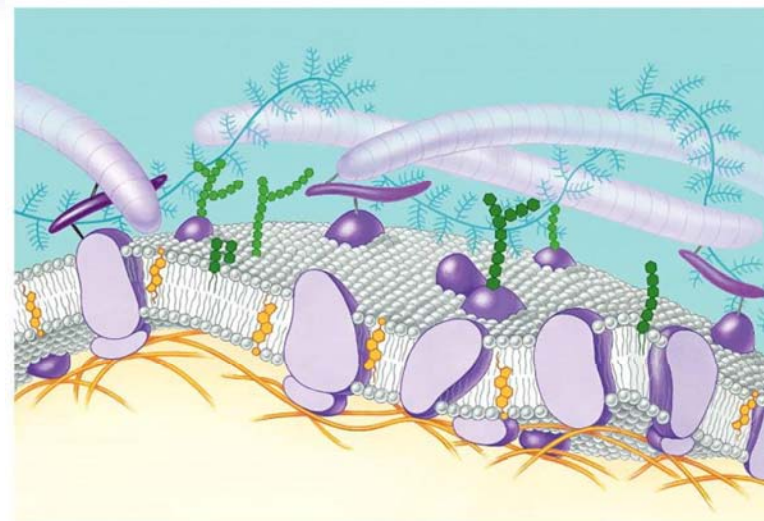


MTA-SE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport
SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



A projekt a Magyar Kormány támogatásával a Kísérleti és
Technológiai Innovációk és Transzmissziók Nemzeti Programjának keretében valósul meg.

Membránok és membránfehérjék



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

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.

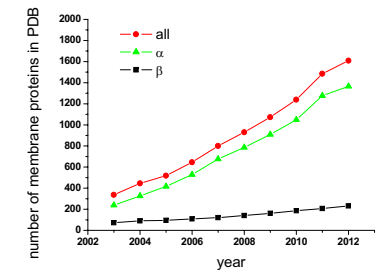
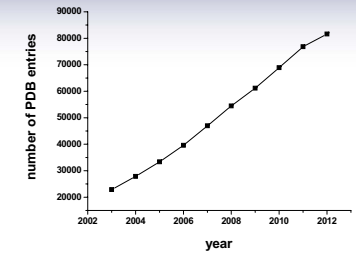
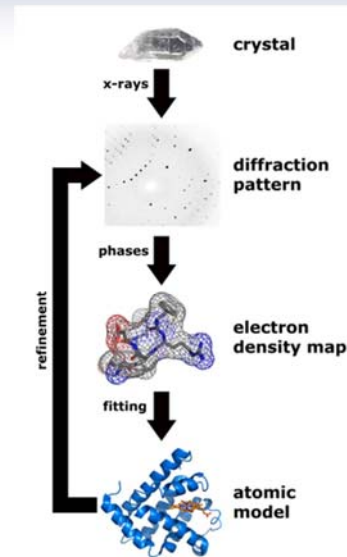
Kísérletes módszerek általában nem
szolgáltatnak közvetlen információt az
atomi szintű történésekről.

PI. NMR és MD - igen

Membránfehérjék szerkezeti modellezése

- Kísérleti adatok alapján
- Homológia modellezés
- „Threading” v. ”fold recognition”

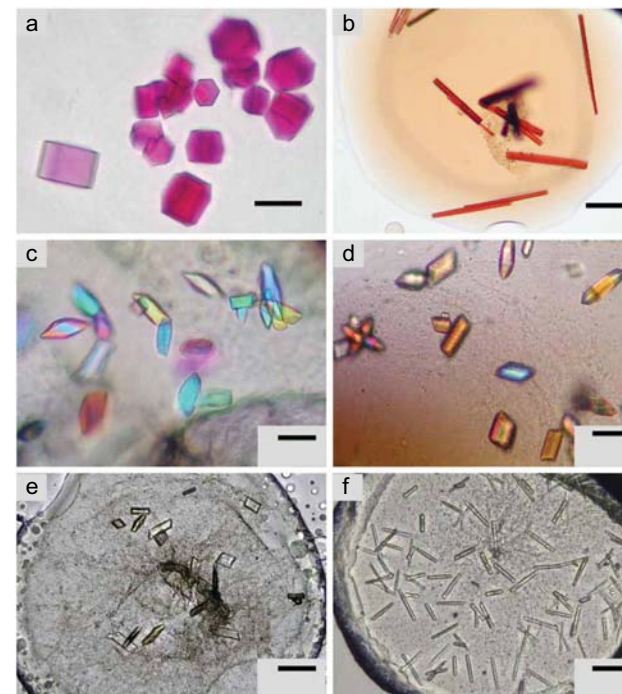
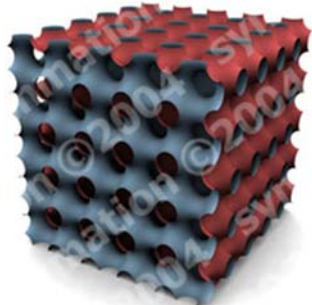
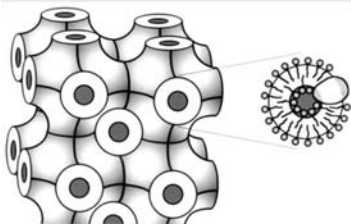
Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



pdhtm.enzim.hu, Tudsnády Gábor

Szerkezet meghatározás – cubic phase

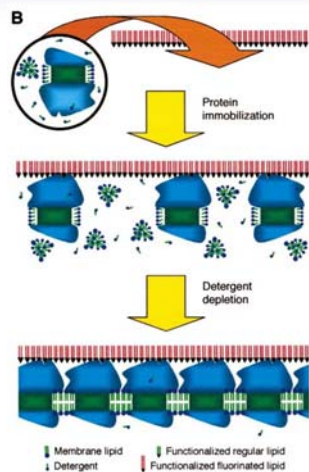
monoolein/water



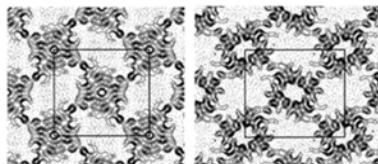
Crystals of membrane proteins growing in the lipidic mesophase.

- (a) Bacteriorhodopsin
- (b) light-harvesting complex II
- (c) adhesin/invasin OpcA
- (d) vitamin B12 transporter BtuB
- (e) human b2 adrenergic receptor-T4 lysozyme chimera
- (f) Carbohydrate transporter from *Pseudomonas*.

Szerkezet meghatározás – 2D kristály



2D kristály



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	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Ala	4																		
Arg	-1	5																	
Asn	-2	0	6																
Asp	-2	-2		6															
Cys	0	-3	-3	-5	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	-1	-2	0	-1	-3	0	0	-2	8										
Ile	-1	-3	-3	-3	-1	-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	-2	-3	5								
Phe	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-2	-1	2	1	5							
Pro	-1	-2	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	-3	0	6						
Ser	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	4					
Thr	1	0	1	0	0	1	0	-1	-2	0	-1	-2	0	-1	5				
Trp	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
Tyr	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-3	-1	-1	-4	-3	-2	11		
Val	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	-2	-1	-2	-1	-3	-3	-2	-2	2	7	4

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Alignement – pl. ClustalW

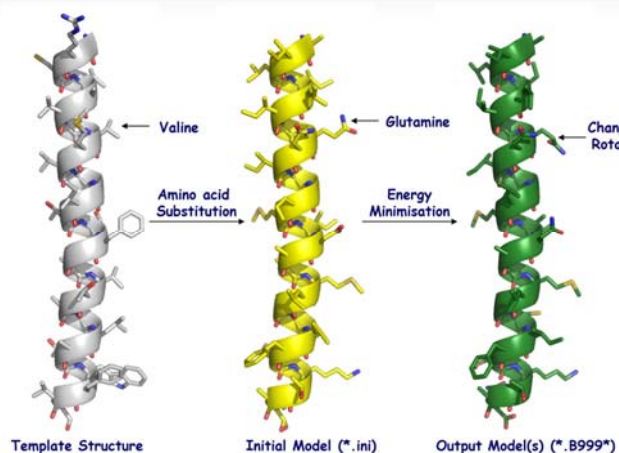
```

2HYD      -----MIKRYLFQVK-----PYKYRIFATIIVGIIKFGIPMLIP
3B5X      -----WQYFKRLWTYIR-----LYKAGLVVSTIALVINAAADTYMI
CFTR_HUMAN MQRSPLEKASVVSKKFFSWTRPILRKGYRQRLESDSIYQIPVSADSADNLS
              *               *               *               *

```

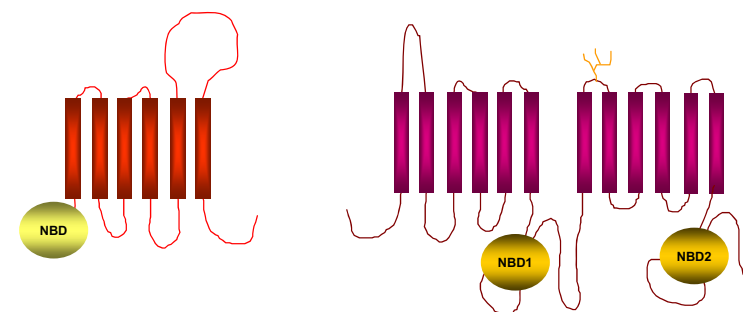


Homológia modellezés II.

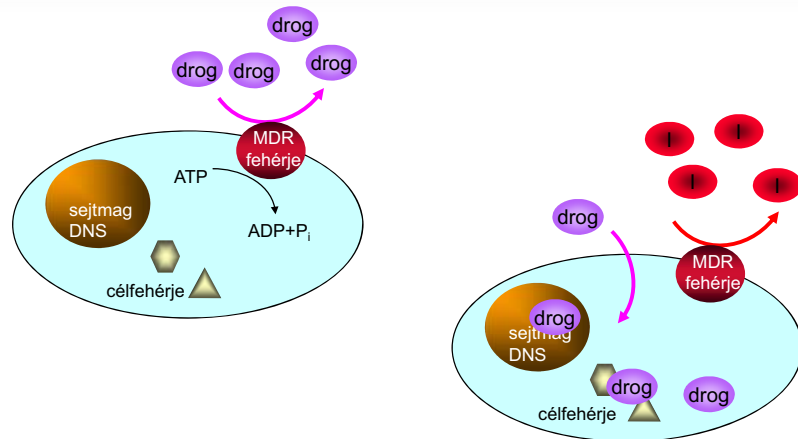


forrás: SBCB, Oxford, UK

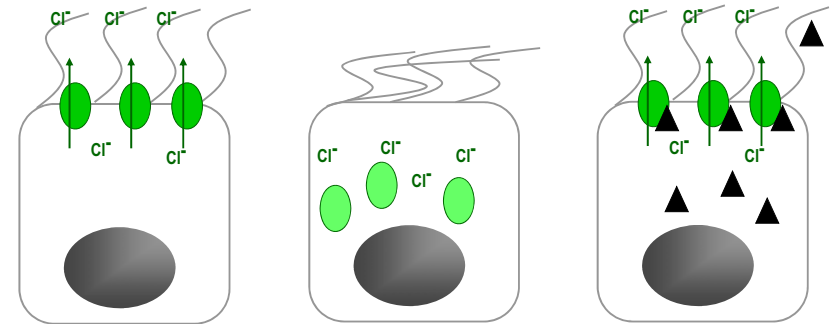
ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése



Cisztás fibrózis



Membránfehérjék nanodisc-ben

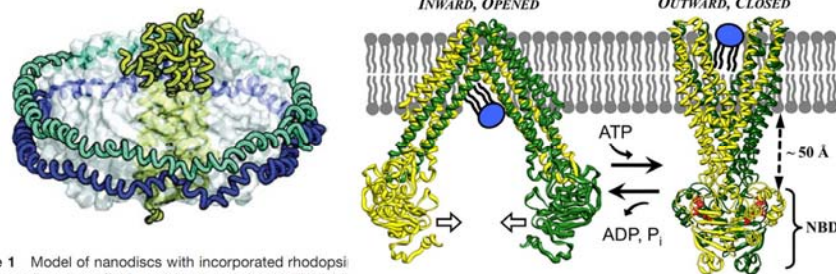
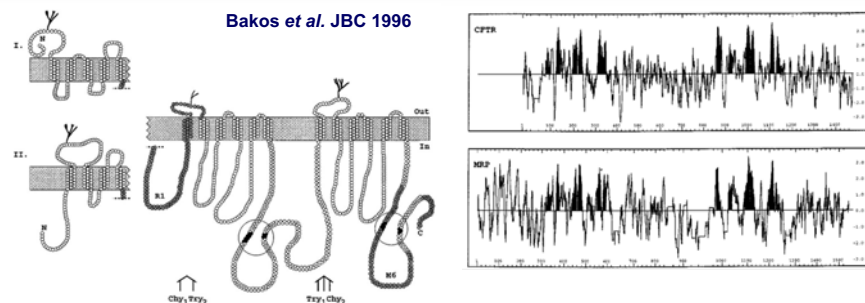


Figure 1 Model of nanodiscs with incorporated rhodopsin. Blue: membrane scaffold protein; gray: phospholipid bilayer, green: rhodopsin. The model was adapted from Nath et al. (2007a).

Szimulációk problémái

- A vizsgálni kíván membránfehérje térszerkezete nem ismert
Sokszor a membránfehérjék membrán topológiája sem ismert
- Lipid-lipid, lipid-fehérje kölcsönhatások fizikai alapjai kevésbé ismertek

Membránfehérjék topológiája



Membrántopológia és TM hélixek predikciója

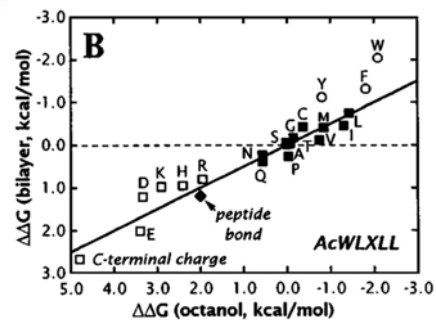
HMMTOP.enzim.hu

- Szekvencia alapján
- Nem specifikus aminosavak feldúsulása a TMH-ban
- TMH és más részek között más az aminosav eloszlás

TMDDET.enzim.hu

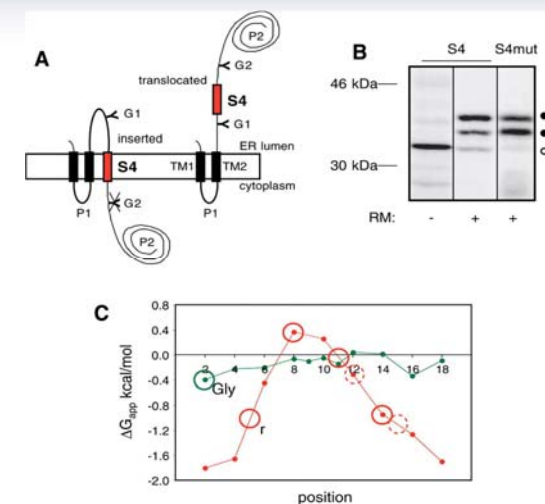
- Szerkezet alapján
- „water accessible area”
lipid kettősréteg lehetséges helye
pontozás – fitness függvény

TMH beépülésének kísérletes jellemzése

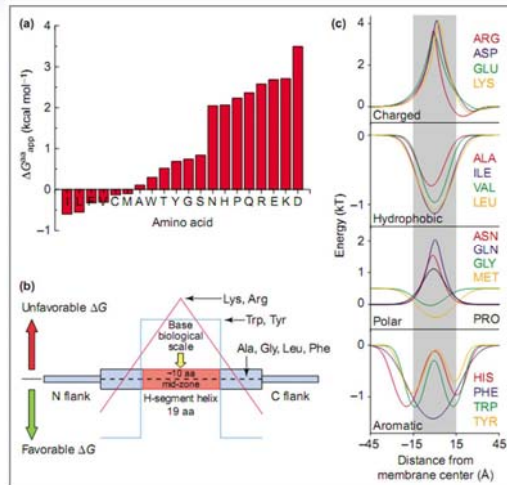


White and Wimley
Ann Rev Biophys and Biomolecular
Structure, 1999

TMH beépülésének kísérletes jellemzése



Aminosavak megoszlása

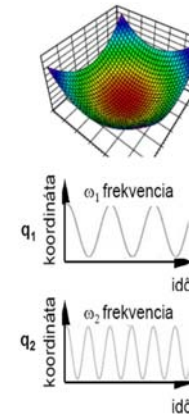


White and von Heijne, Current opinion in structural biology, 2005

Fehérjék dinamikájának vizsgálata

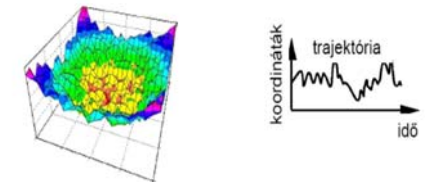
Normál-módus elemzés

- harmonikus potenciál
- analitikus mozgásegyenletek
- normál módusok



Molekuláris dinamika (MD)

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



- idő (CPU, valós)
- potenciál kiszámolása a szűk keresztmetszet
- numerikus integrálás hibája
- fs-os integrációs lépések
- oldószer (explicit/implicit)
- „boundary condition”

A „force field”

Baker (2007)

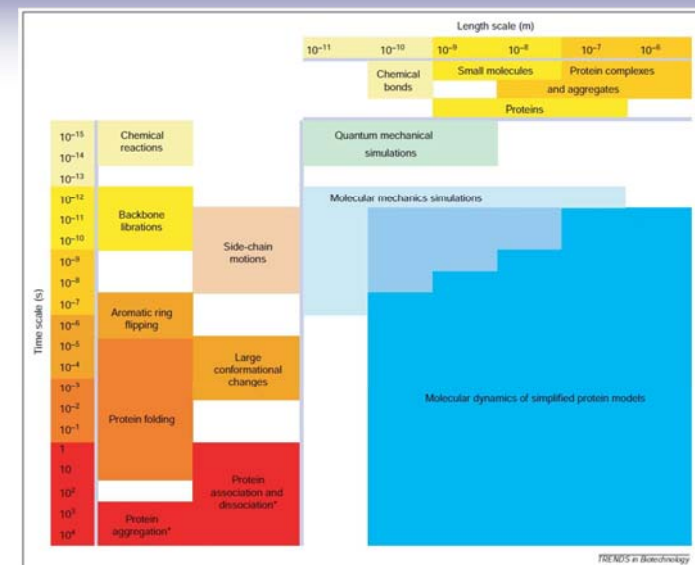
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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

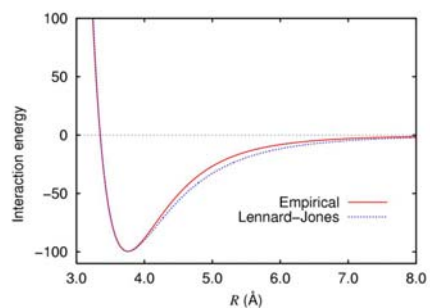
	Water	Chex		Water	Chex
CR	-0.890	-1.350	NH3	-20.000	-1.145
CH1E	-0.187	-0.645	NC2	-10.000	-0.200
CH2E	0.372	-0.720	N	-1.000	-1.145
CH3E	1.089	-0.665	OH1	-5.920	-0.960
CR1E	0.057	-0.410	O	-5.330	-1.270
NH1	-5.950	-1.145	OC	-10.000	-0.900
NR	-3.820	-1.630	S	-3.240	-1.780
NH2	-5.450	-1.145	SH1E	-2.050	-1.855

„Események” időskálája

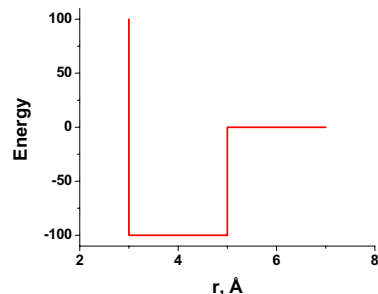


F. Ding and N.V. Dokholyan, TRENDS in Biotechnology, 23:450 (2005)

Diszkrét Molekuláris Dinamika (DMD)



wikipedia



Ding, F., Dokholyan, N. V. PLoS Comput Biol 2:e85

Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

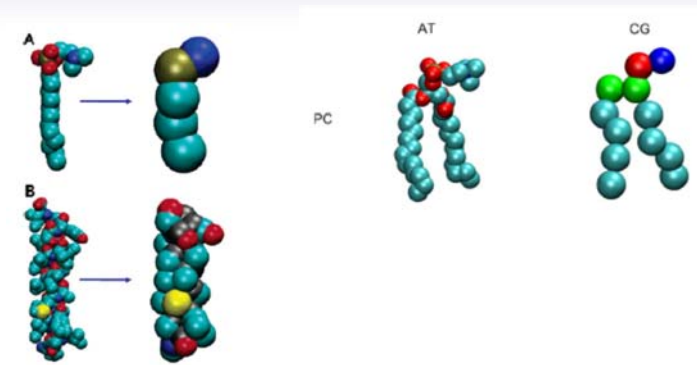
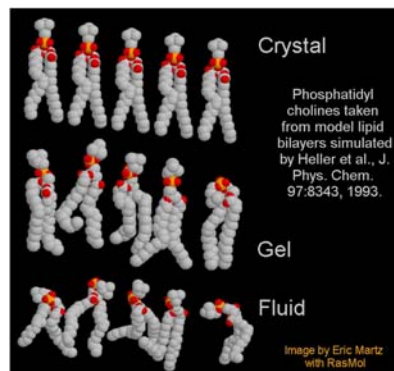
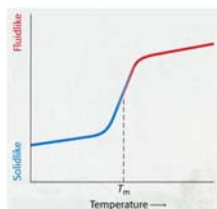


Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

Sansom, Oxford University
Marrink, Groningen, MARTINI force field

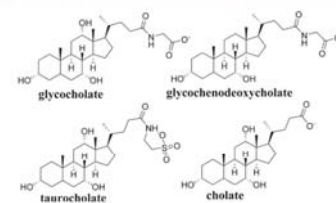
A membrán fluiditása, fázisátmenetei

1. Hőmérséklet
 2. Összetétel
- fázisátalakulás
- láncossz
 - *cis*-kötések
 - koleszterin



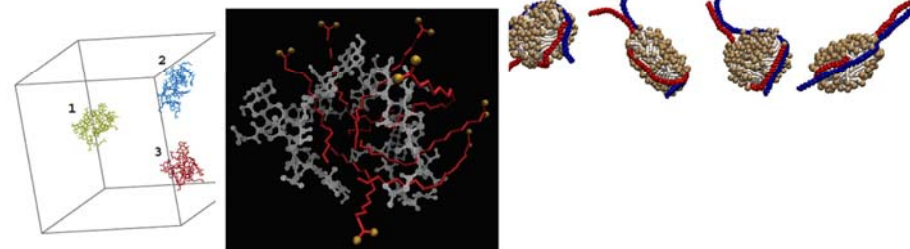
Lipid struktúrák összeszerelődése

Molecular dynamics simulations of
glycocholate-oleic acid mixed micelle assembly.
Langmuir 2010, 26(7), 4687–4692

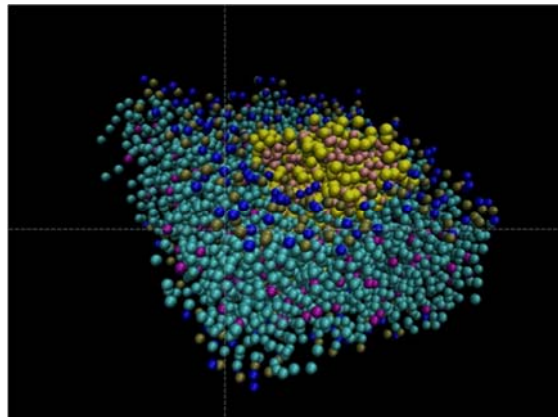


A. Y. Shih et al. / *Journal of Structural Biology* 157 (2007) 579–592

Figure 1. Chemical structures of the four common bile salts: glycocholate, glycochenodeoxycholate, taurocholate, and cholate.

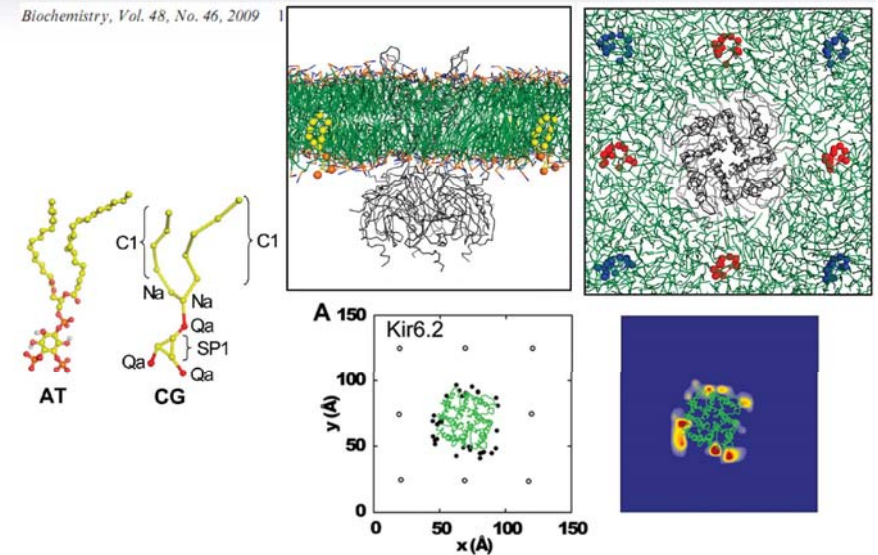


Kettősréteg felépülése a fehérje köré



PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

Biochemistry, Vol. 48, No. 46, 2009



Lipid-összetétel – lokális működés szabályozás

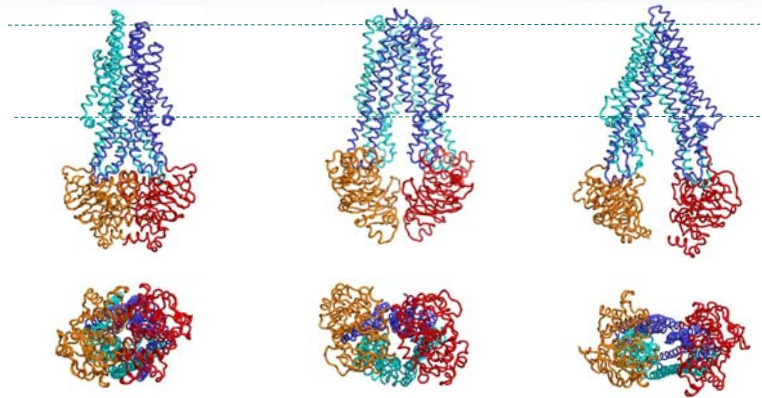
	chol	PC	PE	PS	PI	PG	CL
plazmamembrán	30	18	11	9	4	0	0
Golgi-komplex	8	40	15	4	6	0	0
SER	10	50	21	0	7	0	2
RER	6	55	16	3	8	0	0
magmembrán	10	55	20	3	7	0	0
lizoszóma membr.	14	25	13	0	7	0	5
mitokondriális							
belső membrán	3	45	24	1	6	2	18
külső membrán	5	45	23	2	13	3	4

Fehérjék konformációinak stabilitása

Eur Biophys J (2008) 37:403–409



ABC fehérjék konformációi

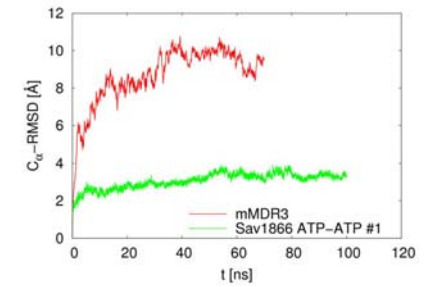
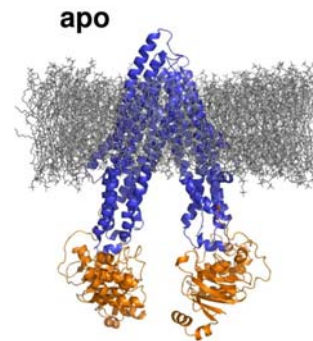


“alul-zárt” holo
(+ATP)

“alul-zárt” apo
(-ATP)

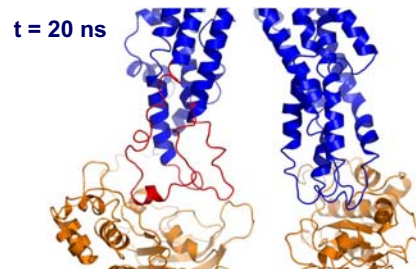
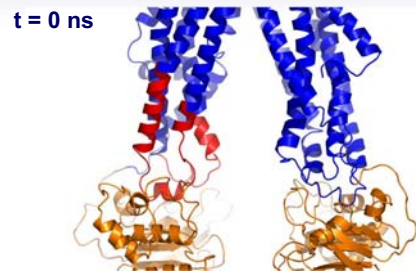
“alul-nyitott” apo
(-ATP)

Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil



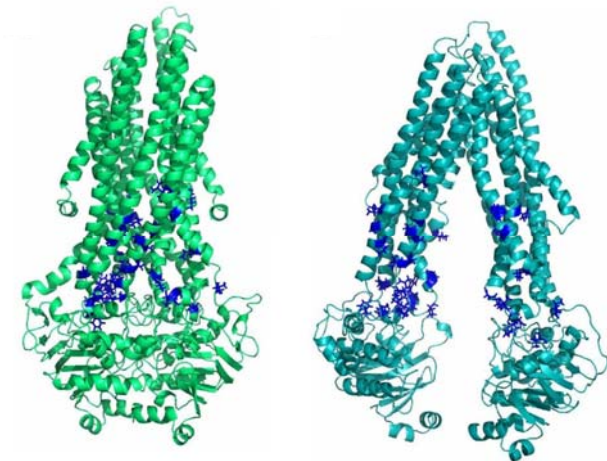
Gyimesi et al. BBA 2012

Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil



rendszer	megtartott hélix tartalom
Sav1866 ATP/ATP #1	90.04%
hMDR1 holo	91.84%
hMDR1 apo	64.30%
mMDR3	63.13%

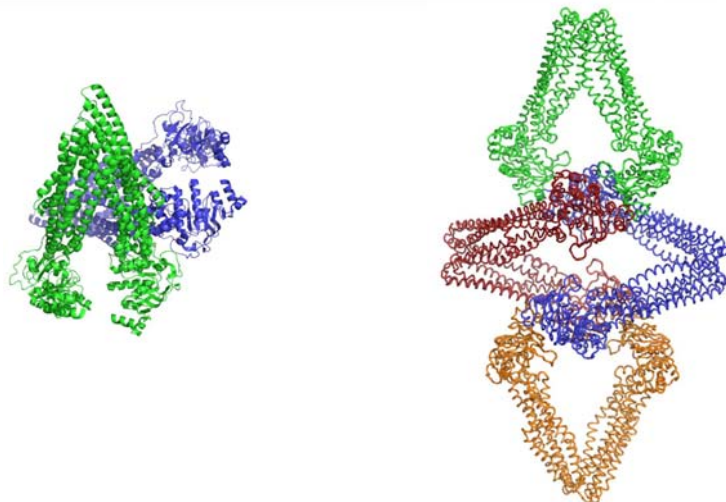
Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre



Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U

MsbA, PDBID:3B5W



Események modellezése

- Hogyan befolyásolja az ATP hidrolízise a fehérje dinamikáját?
Pl. steered MD
- Hogyan történik meg az átmenet az „alul-zárt” konformációból az „alul-nyitott” konformációba?
Pl. targeted MD

Köszönetnyilvánítás

www.hegelab.org

Jakab Kristóf
Sarankó Hajnalka
Szöllősi Dániel
Tordai Hedvig
Tóth Attila

Erdei Áron
Harmat Zita

Sarkadi Balázs

OVSZ, MTA TTK

Kellermayer Miklós

SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



A projektet a Magyar Kormány támogatásával a Kutatási és Technológiai Innovációs Alap finanszírozásával valósítottuk meg.

KTIA-AIK-12-2012-0025



OTKA K 111678

