

Elméleti módszerek lipidek és membránfehérjék tanulmányozására



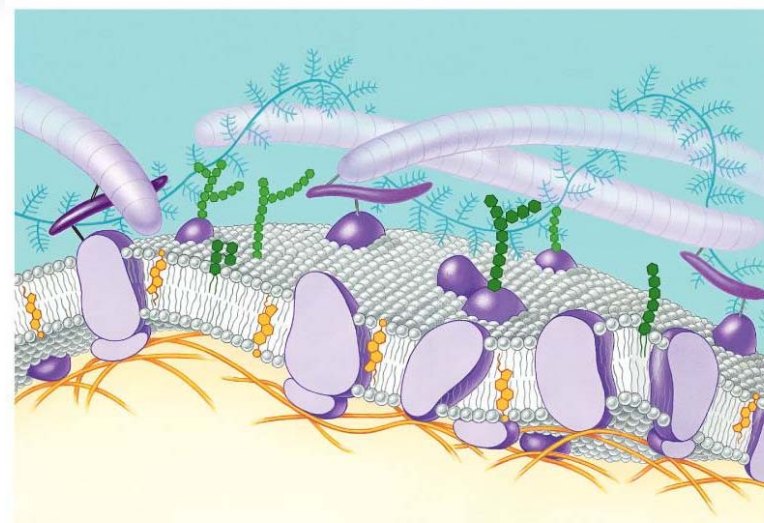
Hegedűs Tamás

tamas@hegelab.org

MTA-SE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport
SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



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.

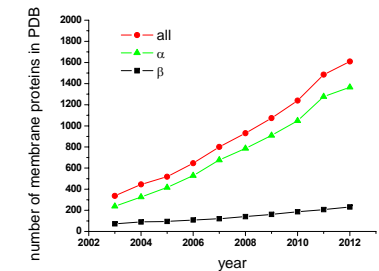
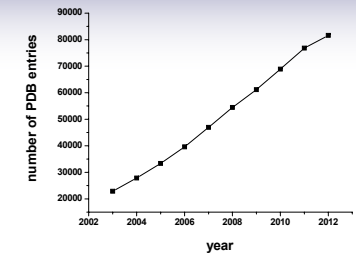
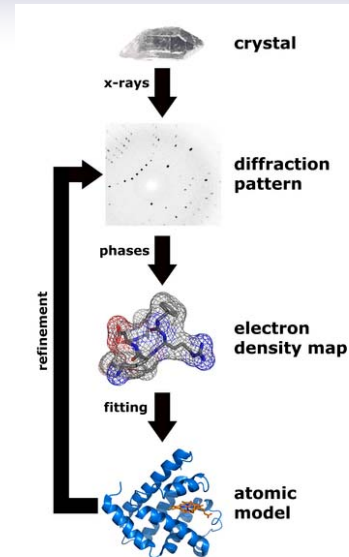
Kísérletes módszerek általában nem
szolgáltatnak közvetlen információt az
atomi szintű történésekről.

PI. NMR és MD - igen

Membránfehérjék szerkezeti modellezése

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

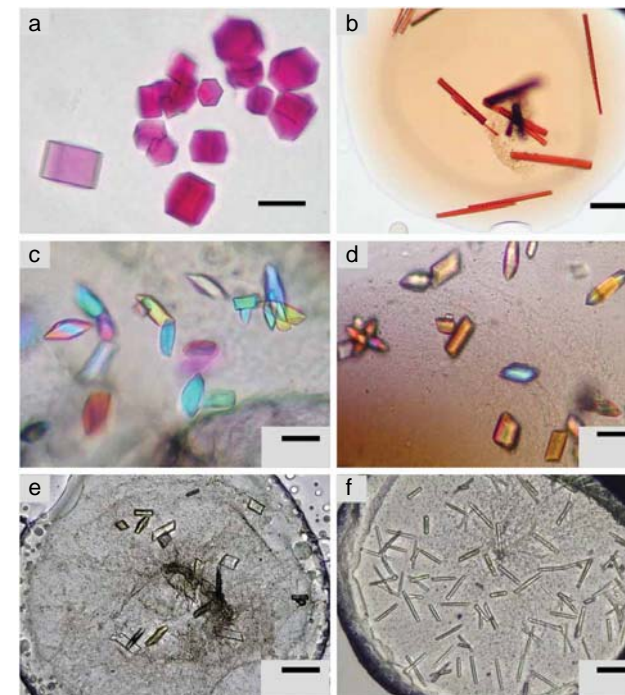
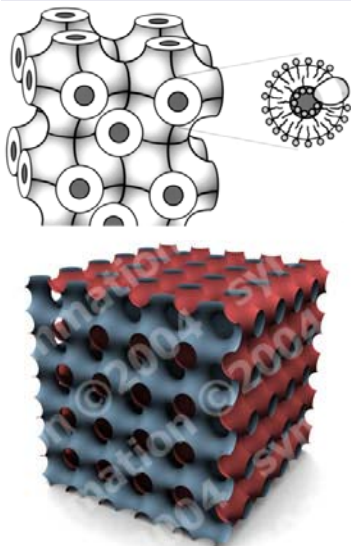
Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



pdhtm.enzim.hu, Tuds nádý Gábor

Szerkezet meghatározás – cubic phase

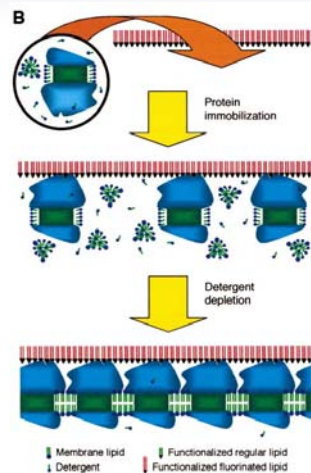
monoolein/water



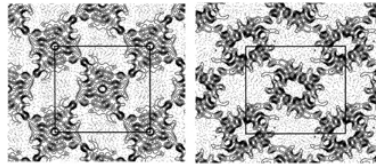
Crystals of membrane proteins growing in the lipidic mesophase.

- (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

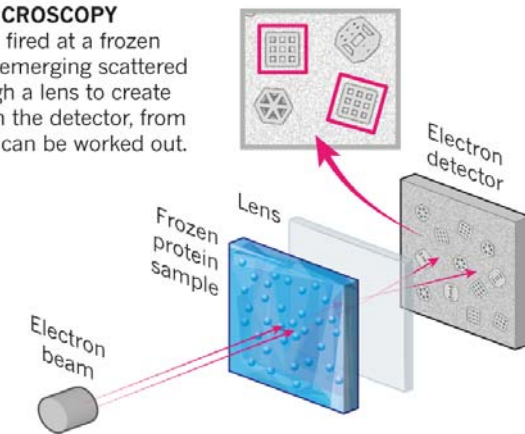


Szerkezet meghatározás – „single particle”

Cryo-electron microscopy

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.



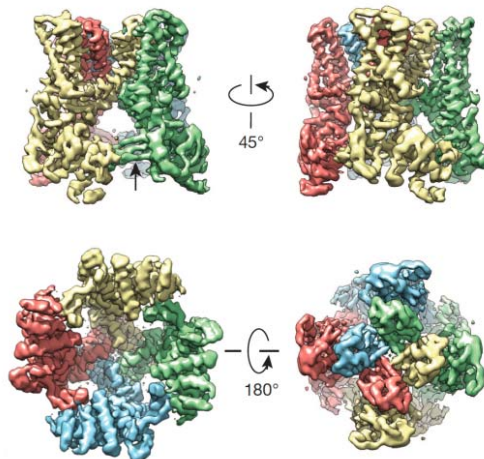
© nature

Ewen Callaway, Nature | News Feature

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

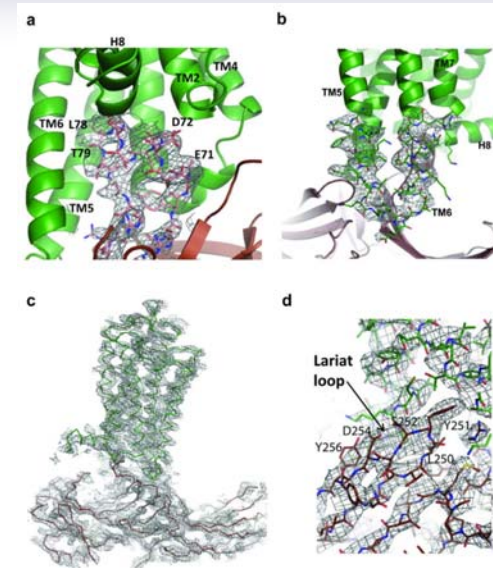
Szerkezet meghatározás – „single particle”

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



Szerkezet meghatározás – „single particle”

Free Electron Laser (FEL)



Nature. 2015 Jul 30;523(7562):561-7.

Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser.

Membránfehérjék nanodisc-ben

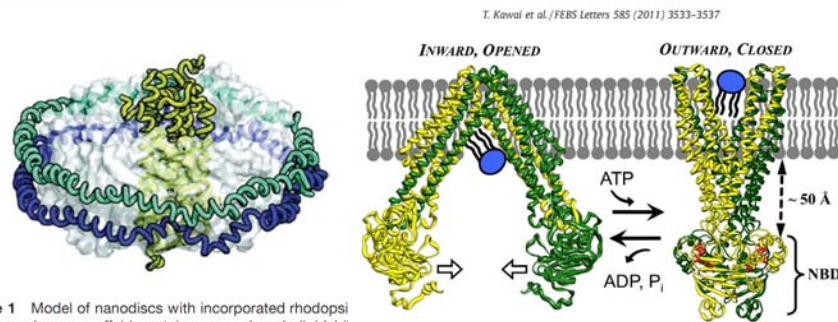


Figure 1 Model of nanodiscs with incorporated rhodopsin. Blue: membrane scaffold protein; gray: phospholipid bilayer, green: rhodopsin. The model was adapted from Nath et al. (2007a).

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) matrix
is a substitution matrix

	Ala	Arg	Asn	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																
Cys	-2	-2	1	9															
Gln	0	-3	-3	-3	9														
Glu	-1	1	0	0	-3	6													
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	-2	-1	-3	-2	6								
Met	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	1	5						
Phe	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-1	0	0	-3	0	-3	0					
Pro	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	6				
Ser	1	-1	1	-1	0	0	0	-1	-1	-2	0	-1	-2	-1	-2	1			
Thr	0	1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-2	-2	1	1	5		
Trp	-3	-4	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Tyr	-2	-2	-2	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	1	-3	-2	-2	0	3	7	
Val	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	1	-2	1	-2	0	-2	-3	1	1	4

Ala Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp Tyr Val

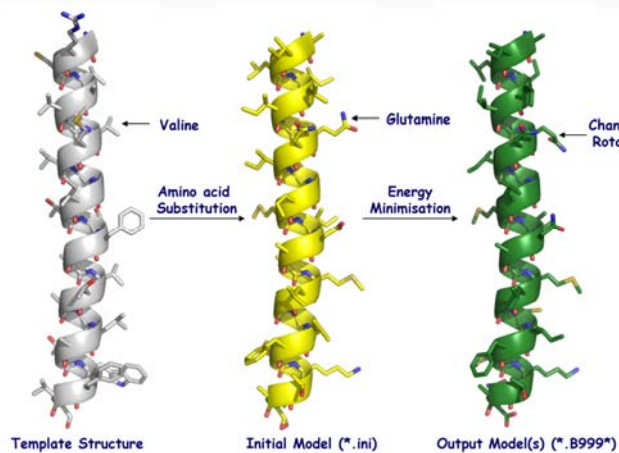
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Alignement – pl. ClustalW

2HYD -----MKLRYLQPVK-----PYKRIEPAITIVGILKGVPMPLIP
 3B5X -----WQTEKFLVYIR-----LYKGAGVSTIALVLIINAADTYMI
 CFTR_HUMAN MQRSPLEKASVSKLFSFWIRILRKGYRQLLEDSDYIQISVDSADNLN
 * * * *

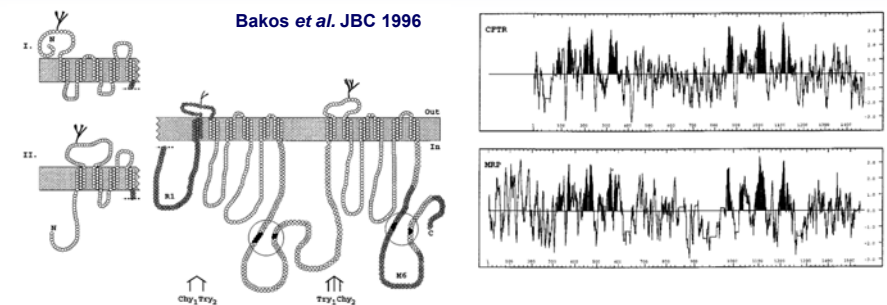
5 10 15 20 25 30 35
 M I K L Y L Q F Y K R L L W T Y I R L Y K Y K R I A I T
 M Q R S P L E K A S V S K L F S W I R I L R K G Y R Q L L E D S D Y I Q I S V D S A D N L N

Homológia modellezés II.



forrás: SBCB, Oxford, UK

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

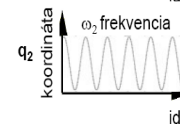
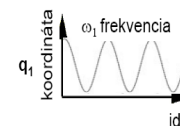
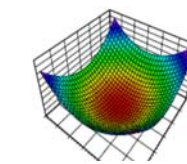
TMDDET.enzim.hu

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

Fehérjék dinamikájának vizsgálata

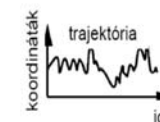
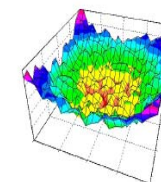
Normál-módus elemzés

- 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”

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
- Időskála

A „force field”

Baker (2007)

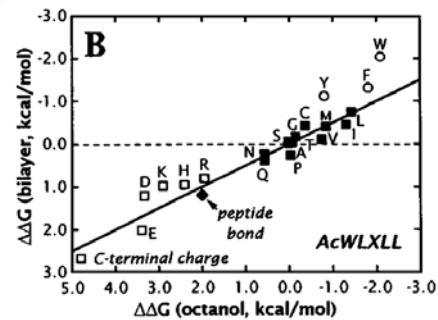
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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

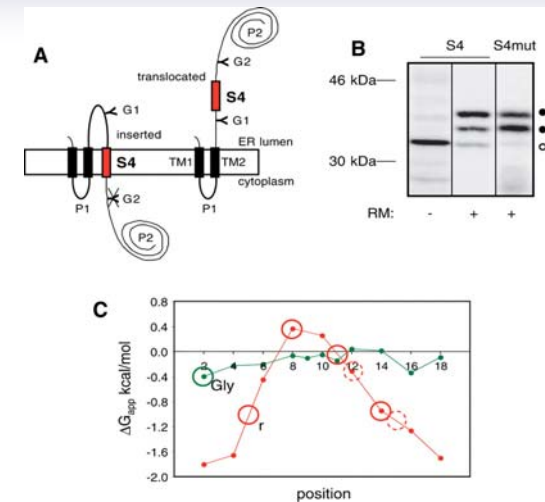
	Water	Chex		Water	Chex
CR	-0.890	-1.350	NH3	-20.000	-1.145
CH1E	-0.187	-0.645	NC2	-10.000	-0.200
CH2E	0.372	-0.720	N	-1.000	-1.145
CH3E	1.089	-0.665	OH1	-5.920	-0.960
CR1E	0.057	-0.410	O	-5.330	-1.270
NH1	-5.950	-1.145	OC	-10.000	-0.900
NR	-3.820	-1.630	S	-3.240	-1.780
NH2	-5.450	-1.145	SH1E	-2.050	-1.855

TMH beépülésének kísérletes jellemzése



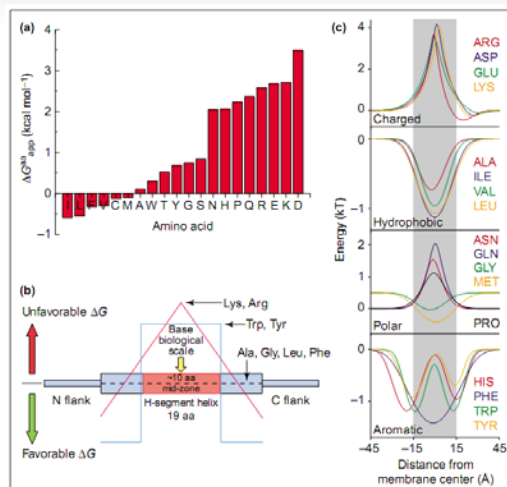
White and Wimley
Ann Rev Biophys and Biomolecular
Structure, 1999

TMH beépülésének kísérletes jellemzése



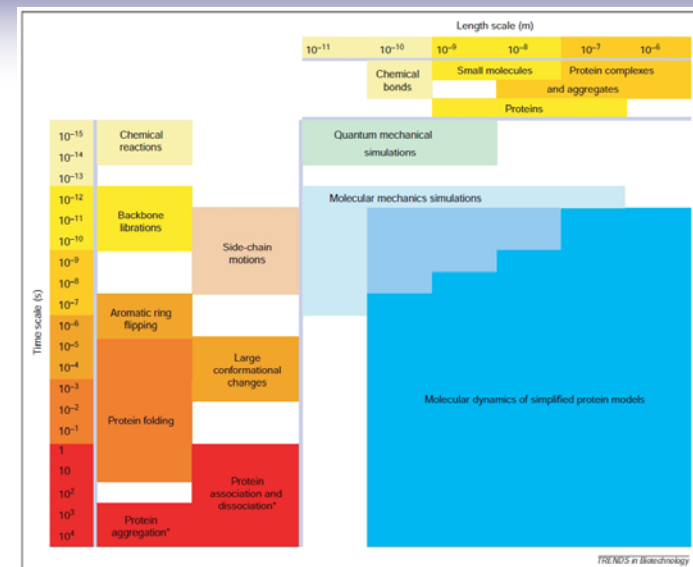
Hessa et al. Science 2005;307:1427

Aminosavak megoszlása



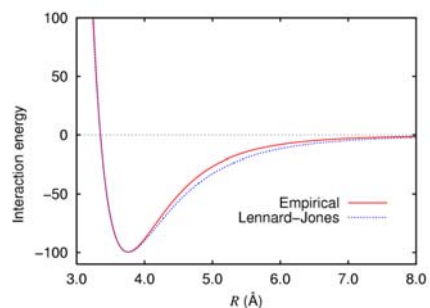
White and von Heijne, Current opinion in structural biology, 2005

„Események” időskálája

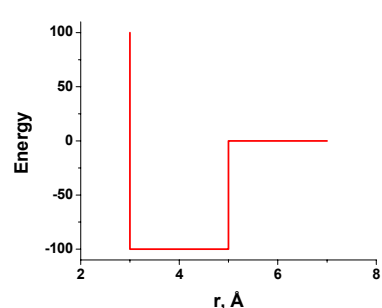


F. Ding and N.V. Dokholyan, *TRENDS in Biotechnology*, 23:450 (2005)

Diszkrét Molekuláris Dinamika (DMD)



wikipedia



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

Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

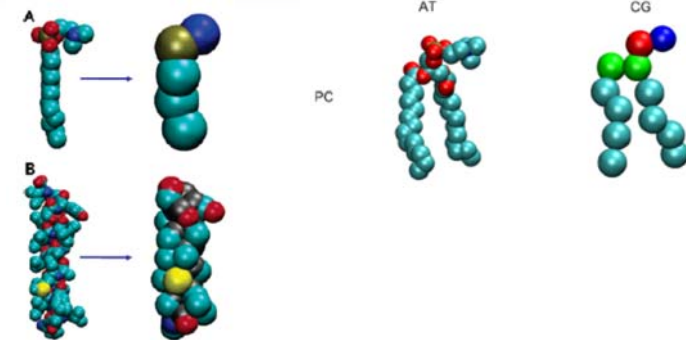


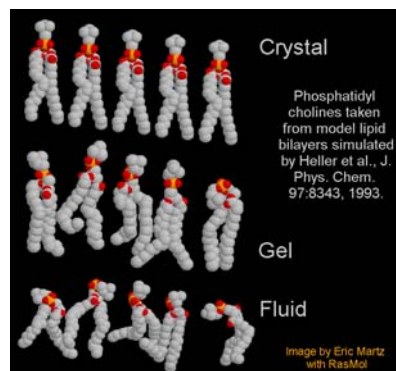
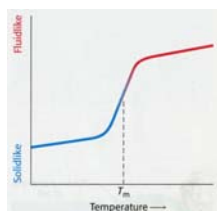
Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

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

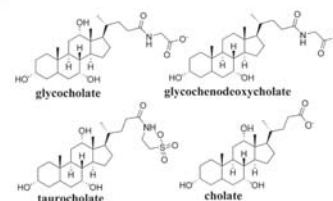
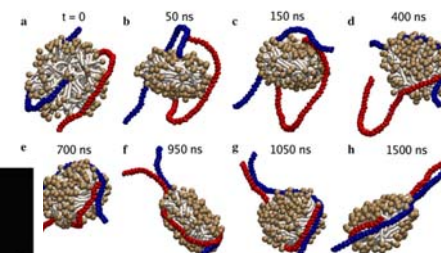
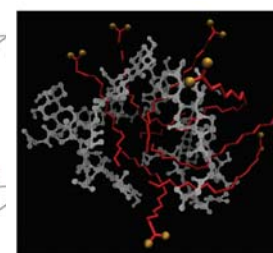
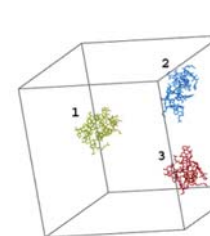


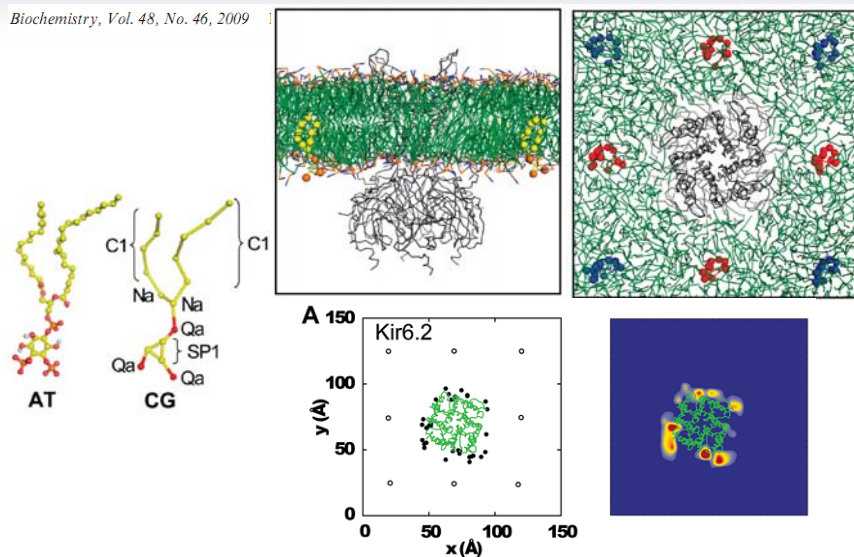
Figure 1. Chemical structures of the four common bile salts: glycocholate, glycochenodeoxycholate, taurocholate, and cholate.

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



PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

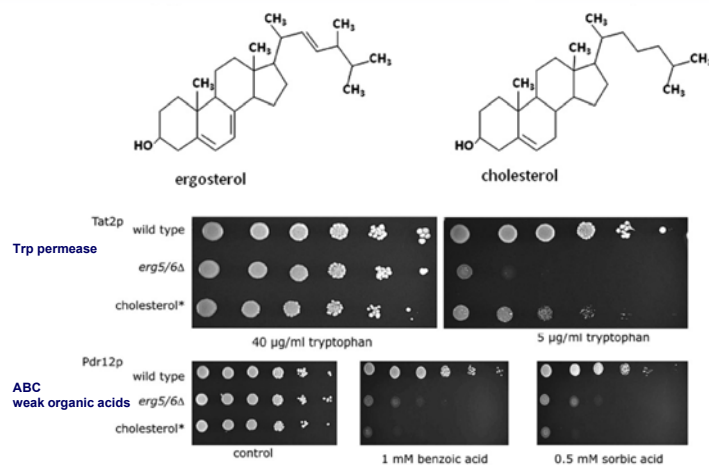
Biochemistry, Vol. 48, No. 46, 2009



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

Eltérő organizmusok – eltérő membrán – élesztő

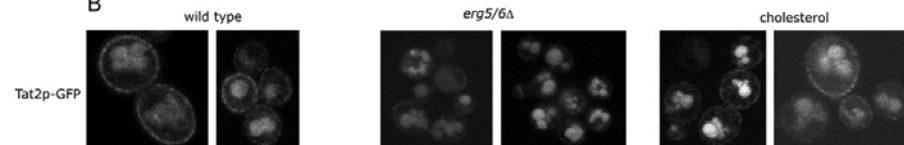


Souza, C.M., ... and H. Riezman (2011) *Metab. Eng.* 13, 555-569.

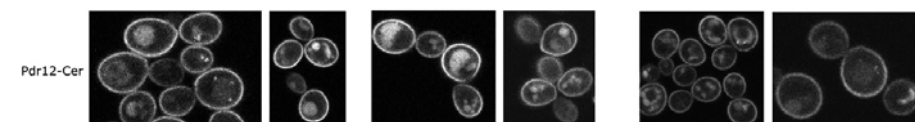
Lipidek kofaktor-szerepe fehérjék működésében

Trp permease

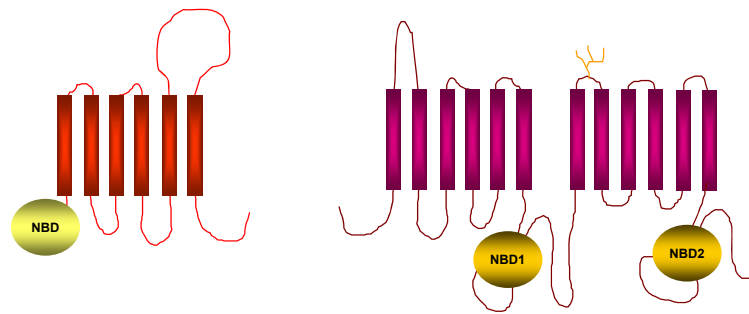
B



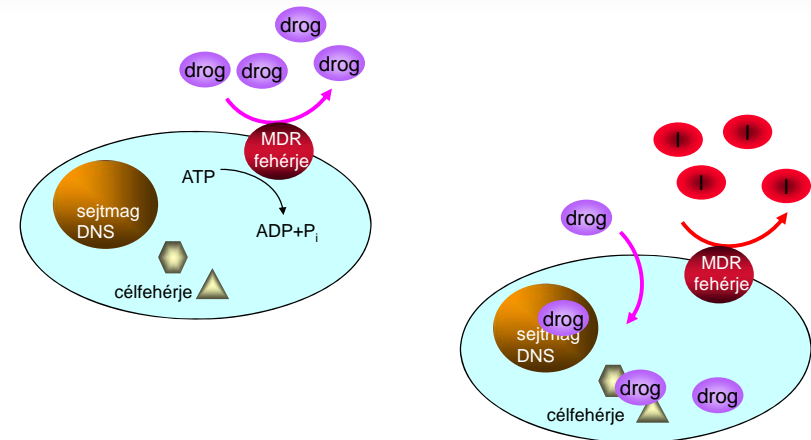
ABC
weak organic acids



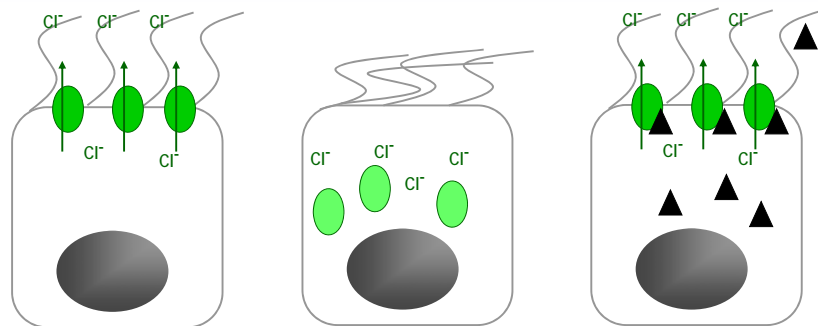
ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



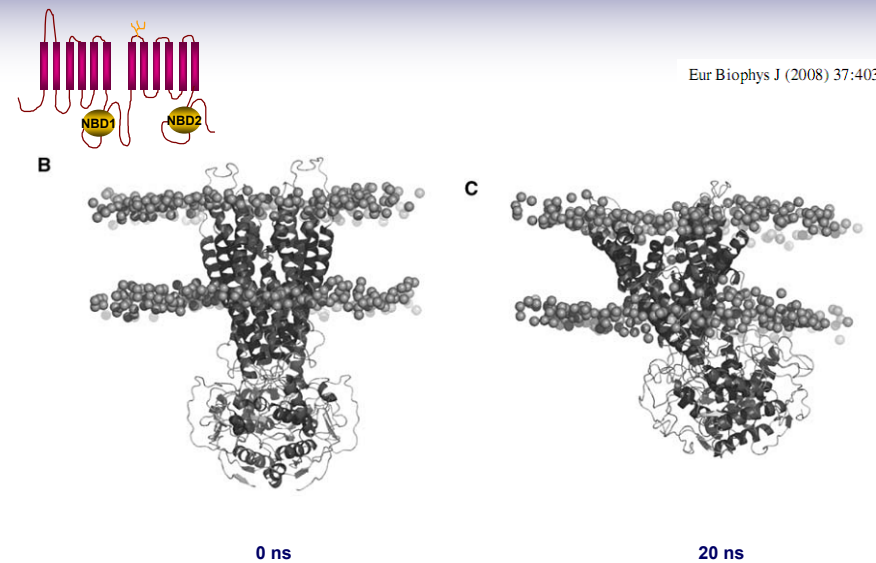
A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése



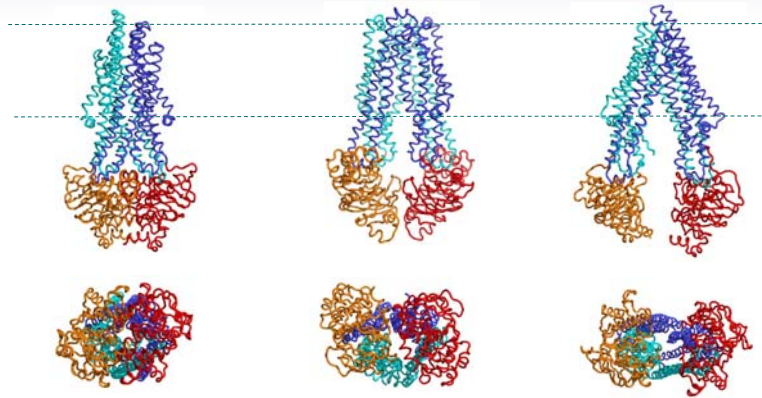
Cisztás fibrózis



Fehérjék konformációinak stabilitása



ABC fehérjék konformációi

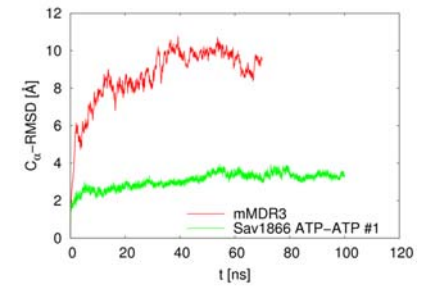
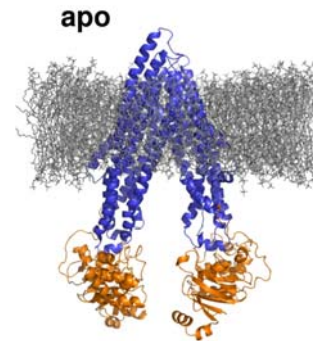


“alul-zárt” holo
(+ATP)

“alul-zárt” apo
(-ATP)

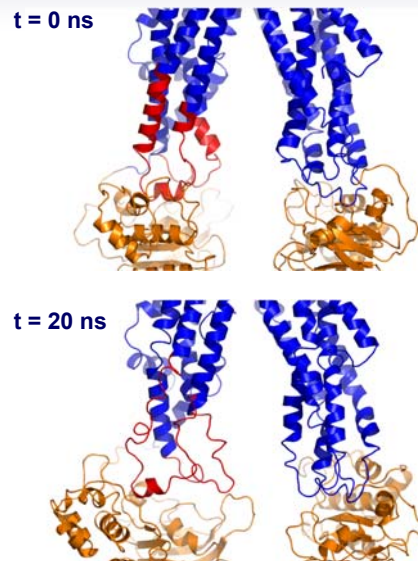
“alul-nyitott” apo
(-ATP)

Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil



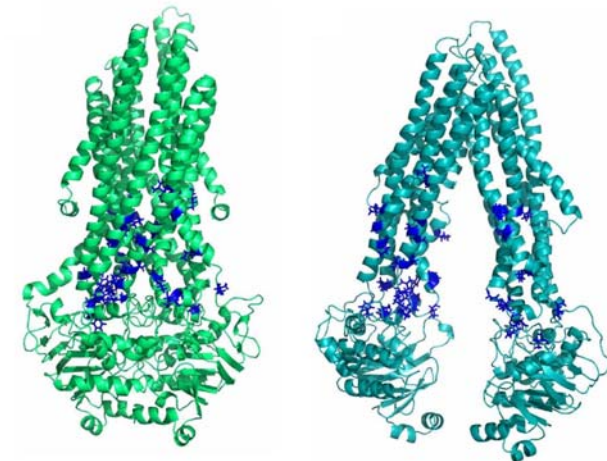
Gyimesi et al. BBA 2012

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%

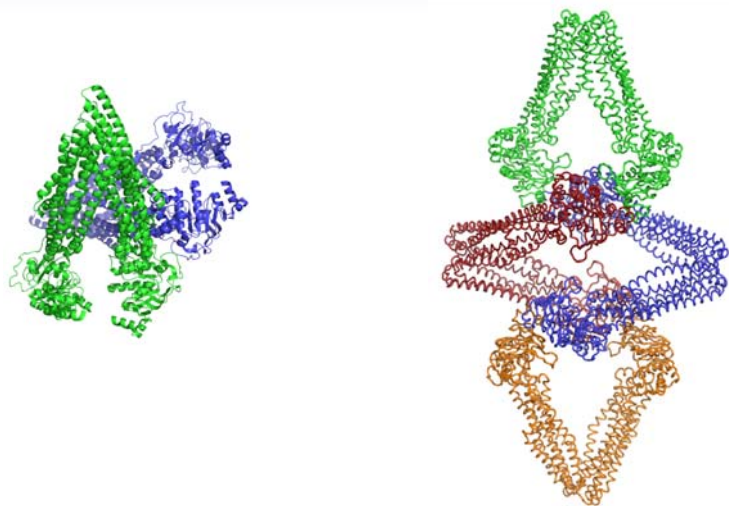
Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre



Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U

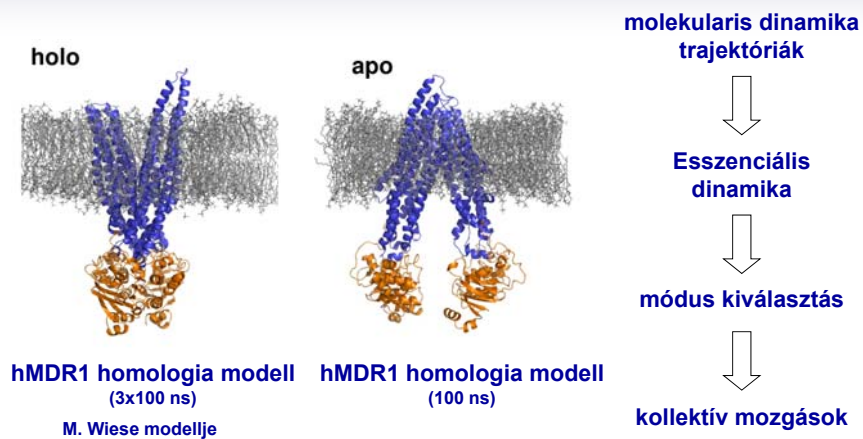
MsbA, PDBID:3B5W



Események modellezése

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

Zárt-nyitott átmenet jellemzése molekuláris dinamikával



Zárt-nyitott átmenet

