

## Elméleti módszerek lipidek és membránfehérjék tanulmányozására



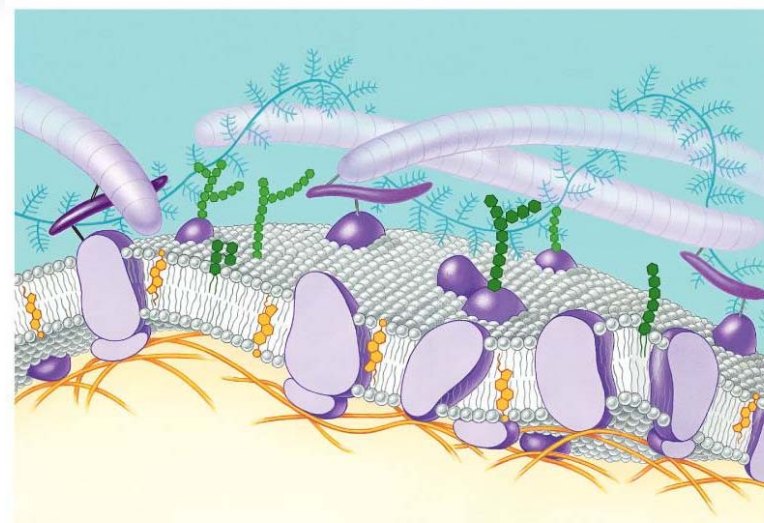
Hegedűs Tamás

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.

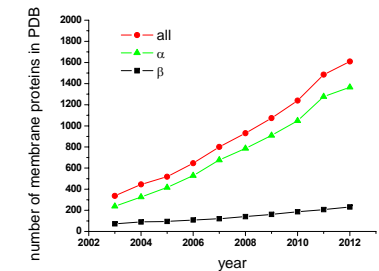
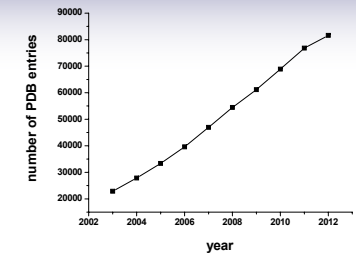
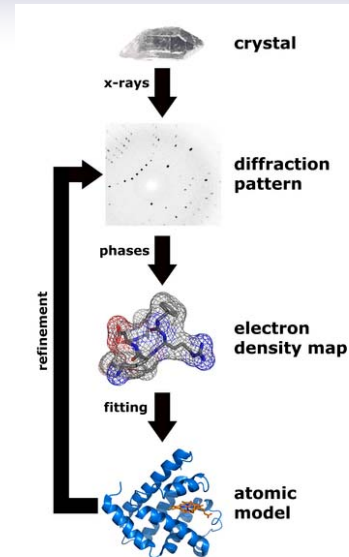
Kísérletes módszerek általában nem  
szolgáltatnak közvetlen információt az  
atomi szintű történésekről.

PI. NMR és MD - igen

## Membránfehérjék szerkezeti modellezése

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

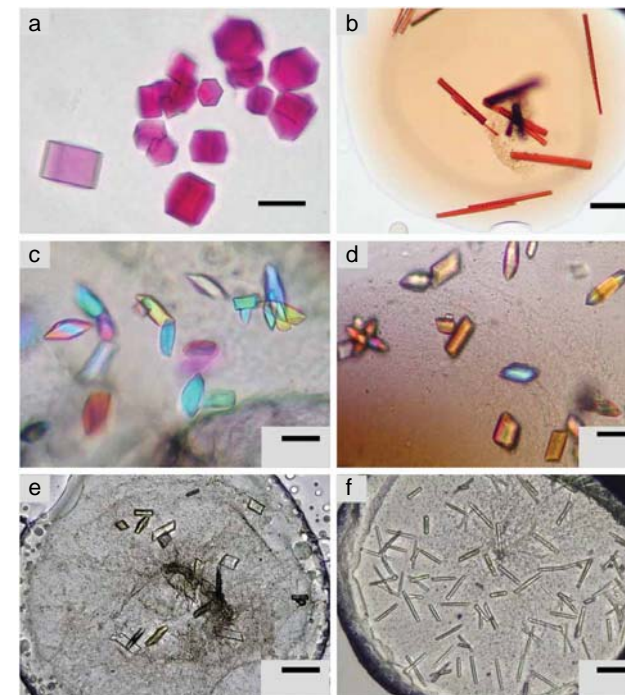
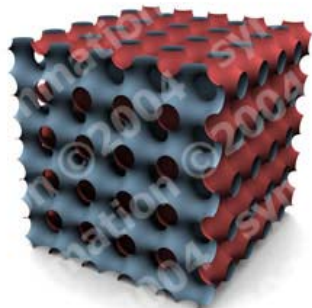
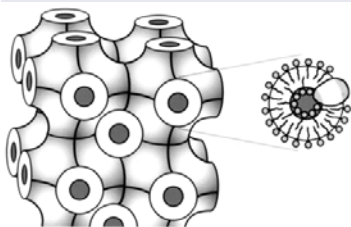
## Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



pdhtm.enzim.hu, Tuds nádý Gábor

## Szerkezet meghatározás – cubic phase

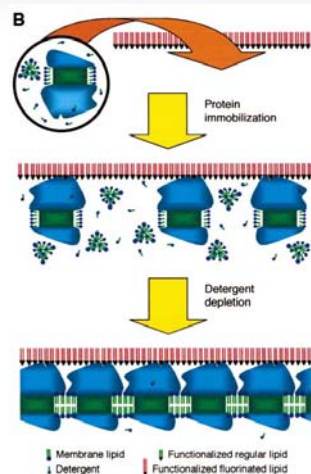
monoolein/water



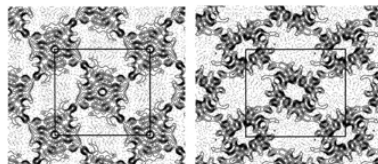
Crystals of membrane proteins growing in the lipidic mesophase.

- (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

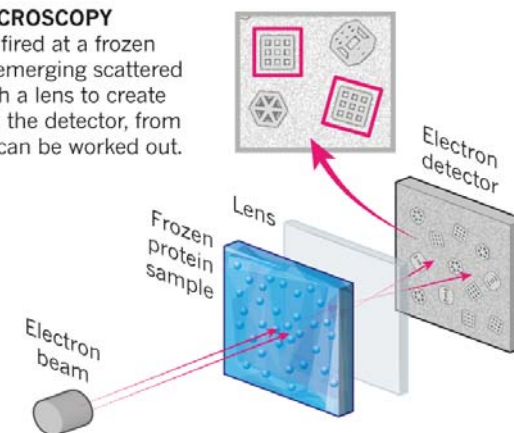


## Szerkezet meghatározás – „single particle”

### 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.



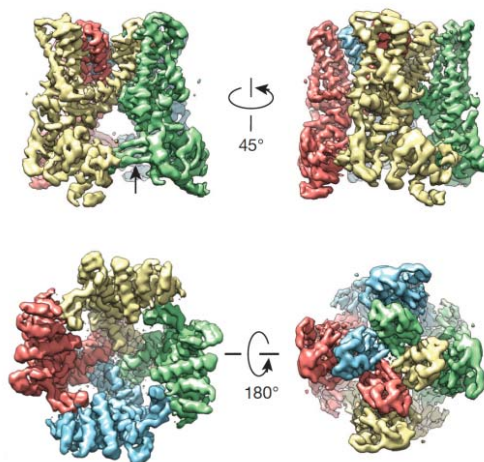
© nature

Ewen Callaway, Nature | News Feature

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

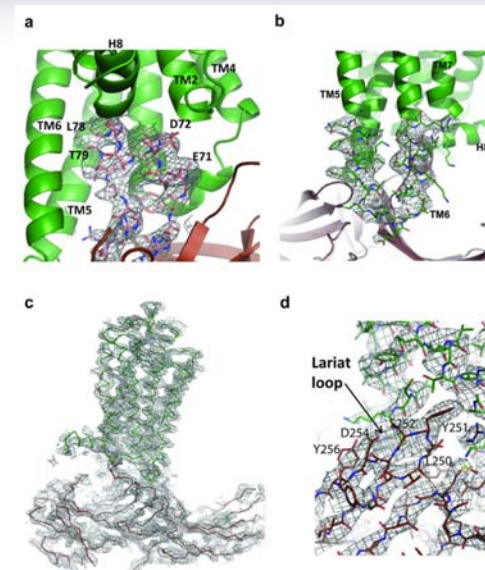
## Szerkezet meghatározás – „single particle”

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”

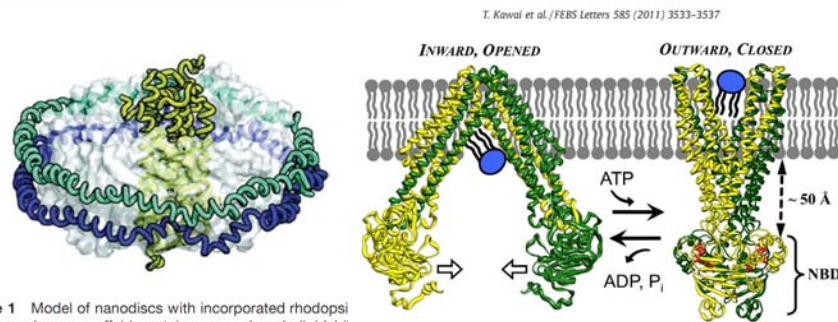
### Free Electron Laser (FEL)



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	-1	0	0	2	-4	2	5												
His	-2	0	1	-3	-2	-2	6												
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	6				
Pro	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7				
Ser	1	-1	1	-1	0	0	0	-1	-1	-2	0	-1	-2	-1	4	5			
Thr	0	0	1	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-2	-2	1	5	4		
Trp	-3	-4	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-3	-2	-3	-2	-1	-4	-3	-2	11		
Tyr	-2	-2	-2	-2	-1	-2	-3	-2	-1	-1	-2	-1	-3	-2	-2	3	7	4	
Val	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	1	2	1	-2	0	0	-1	2	3	7

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

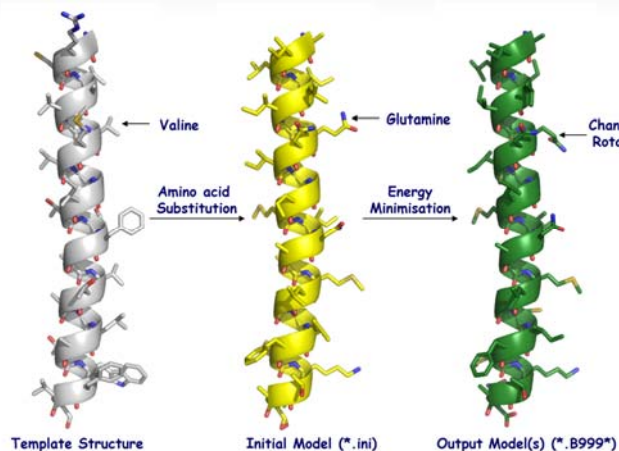
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

### Alignement – pl. ClustalW

2HYD -----MKLRYLQPVK-----PYKRIEPAITIVGILKGVPMPLIP  
 3B5X -----WQTEKFLVYIR-----LYKGAGVSTIALVLIINAADTYMI  
 CFTR\_HUMAN MQRSPLEKASVSKLFSFWIRILRKGYRQLLEDSDYIQISVDSADNLS  
                                   \*                                  \*                                  \*                                  \*

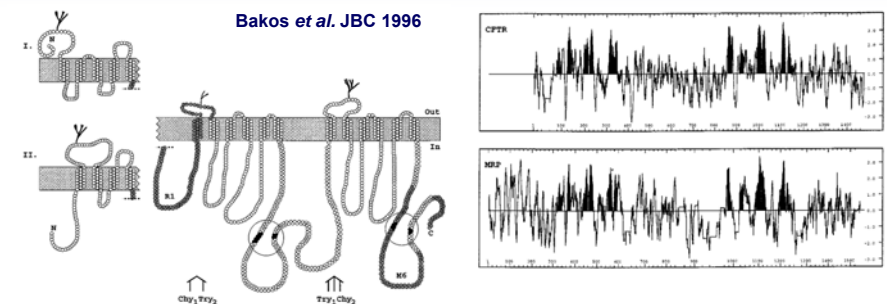
5 10 15 20 25 30 35  
 M I K R L Y L Q V K P Y K R I E P A I T V G I L K G V P M L I P  
 W Q T E K F L V Y I R L Y K G A G V S T I A L V L I I N A A D T Y M I  
 M Q R S P L E K A S V S K L F S W I R I L R K G Y R Q L E D S D Y I Q I S V D S A D N L S

## 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

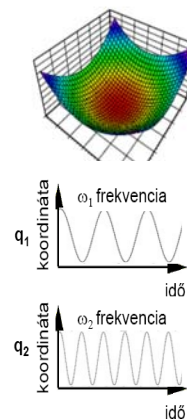
TMDet.enzim.hu

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

## Fehérjék dinamikájának vizsgálata

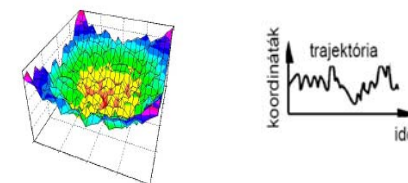
### Normál-módus elemzés

- 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)

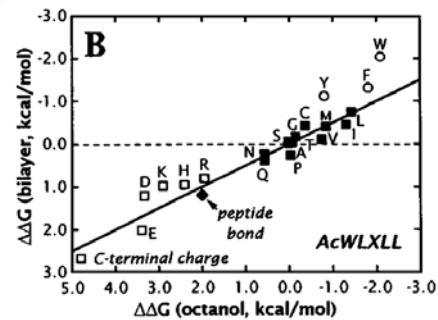
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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

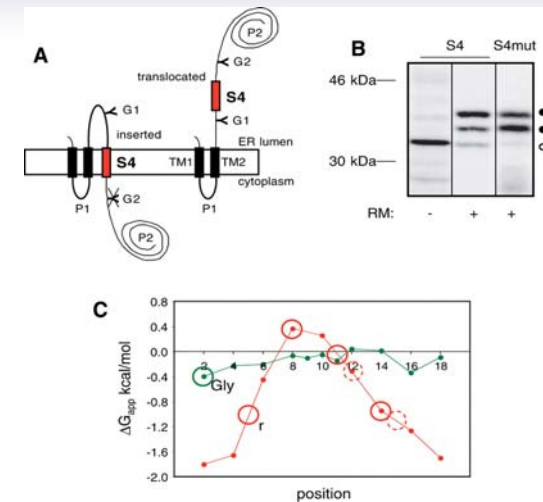
	Water	Chex		Water	Chex
CR	-0.890	-1.350	NH3	-20.000	-1.145
CH1E	-0.187	-0.645	NC2	-10.000	-0.200
CH2E	0.372	-0.720	N	-1.000	-1.145
CH3E	1.089	-0.665	OH1	-5.920	-0.960
CR1E	0.057	-0.410	O	-5.330	-1.270
NH1	-5.950	-1.145	OC	-10.000	-0.900
NR	-3.820	-1.630	S	-3.240	-1.780
NH2	-5.450	-1.145	SH1E	-2.050	-1.855

## TMH beépülésének kísérletes jellemzése



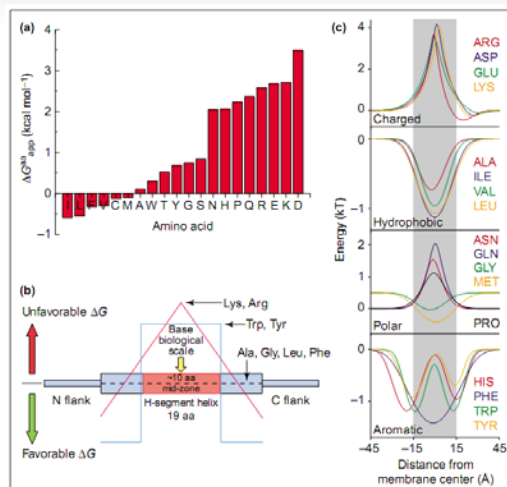
White and Wimley  
Ann Rev Biophys and Biomolecular  
Structure, 1999

## TMH beépülésének kísérletes jellemzése



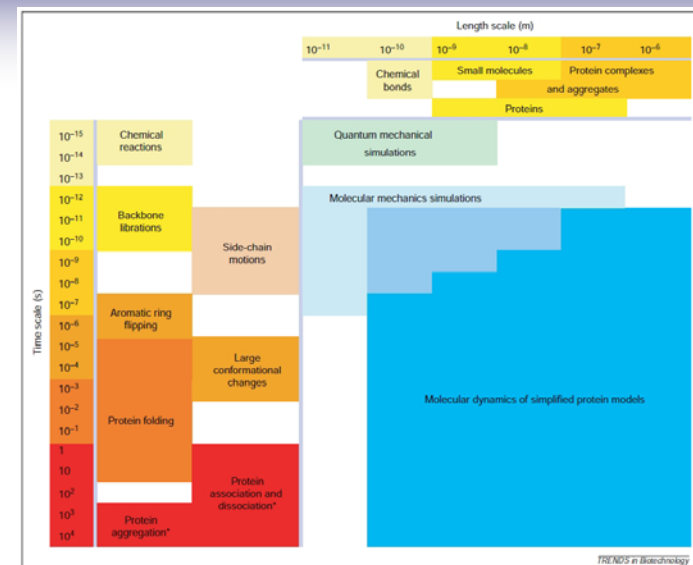
Hessa et al. Science 2005;307:1427

## Aminosavak megoszlása



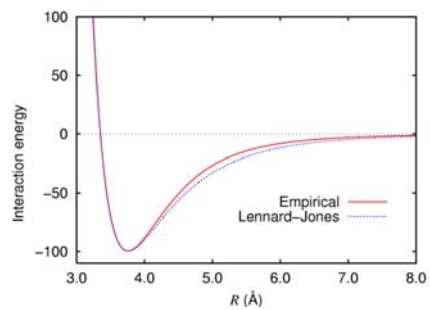
White and von Heijne, Current opinion in structural biology, 2005

## „Események” időskálája

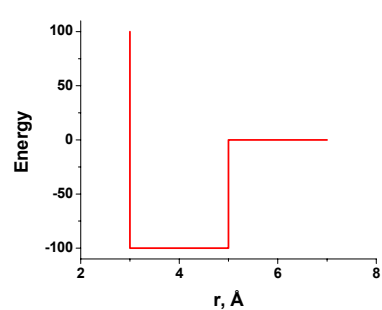


F. Ding and N.V. Dokholyan, TRENDS in Biotechnology, 23:450 (2005)

## Diszkrét Molekuláris Dinamika (DMD)



wikipedia



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

## Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

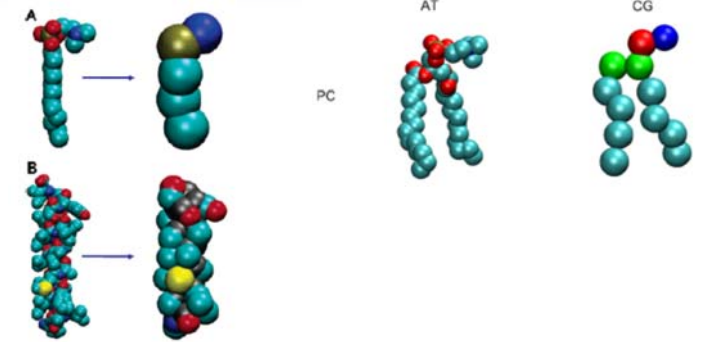
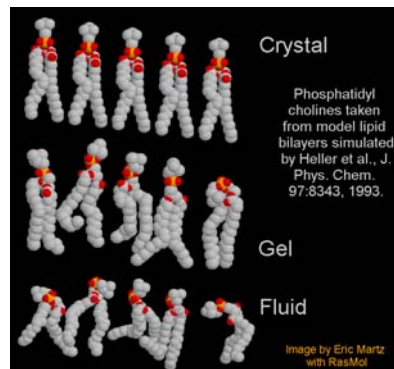
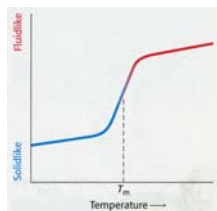


Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

Sansom, Oxford University  
Marrink, Groningen, MARTINI force field

## A membrán fluiditása, fázisátmenetei

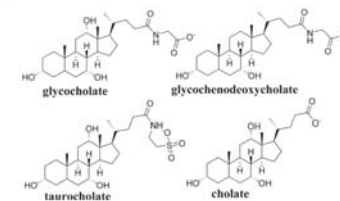
1. Hőmérséklet
  2. Összetétel
- fázisátalakulás
- láncossz
  - *cis*-kötések
  - koleszterin



## Lipid struktúrák összeszerelődése

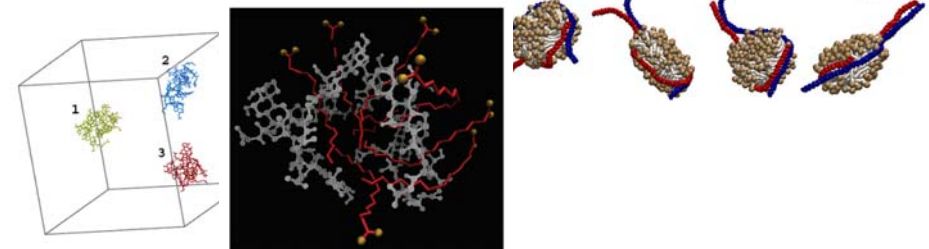
Molecular dynamics simulations of glycocholate-oleic acid mixed micelle assembly.

Langmuir 2010, 26(7), 4687–4692



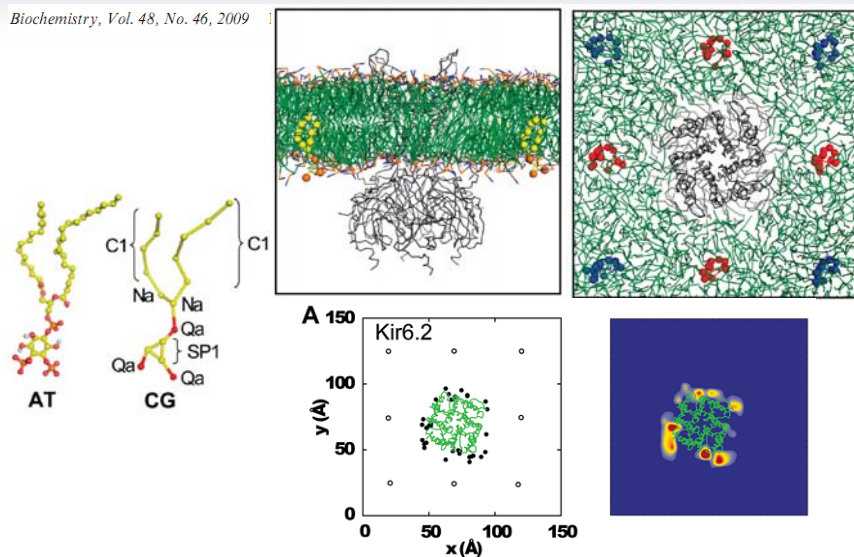
A. Y. Shih et al. / Journal of Structural Biology 157 (2007) 579–592

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



## PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

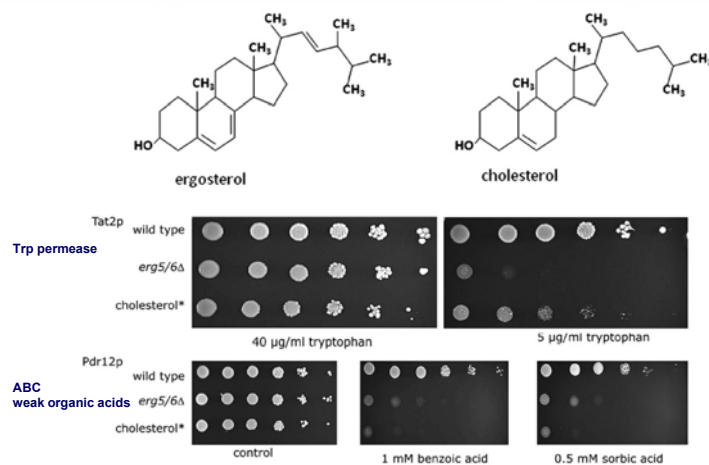
Biochemistry, Vol. 48, No. 46, 2009



## 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

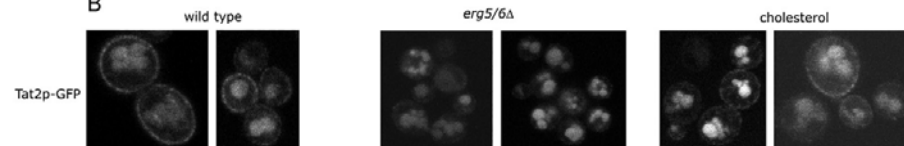


Souza, C.M., ... and H. Riezman (2011) *Metab. Eng.* 13, 555-569.

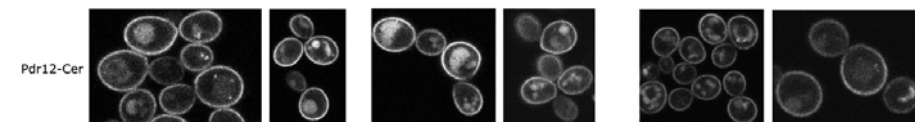
## Lipidek kofaktor-szerepe fehérjék működésében

Trp permease

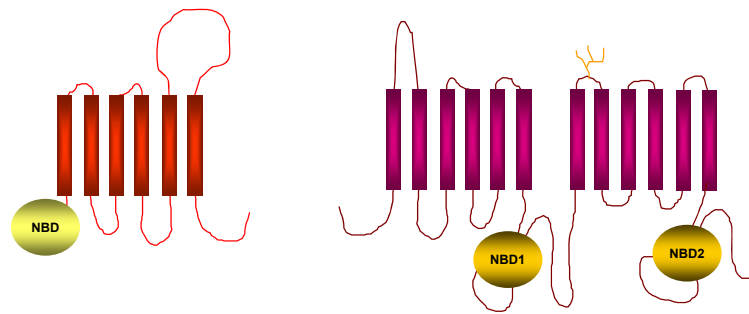
B



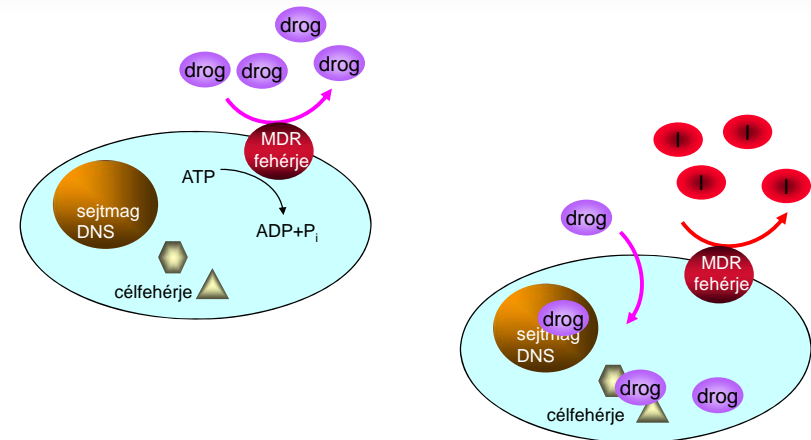
ABC  
weak organic acids



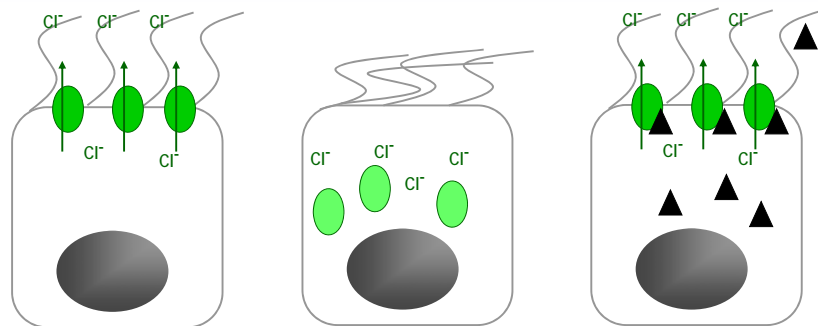
## ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



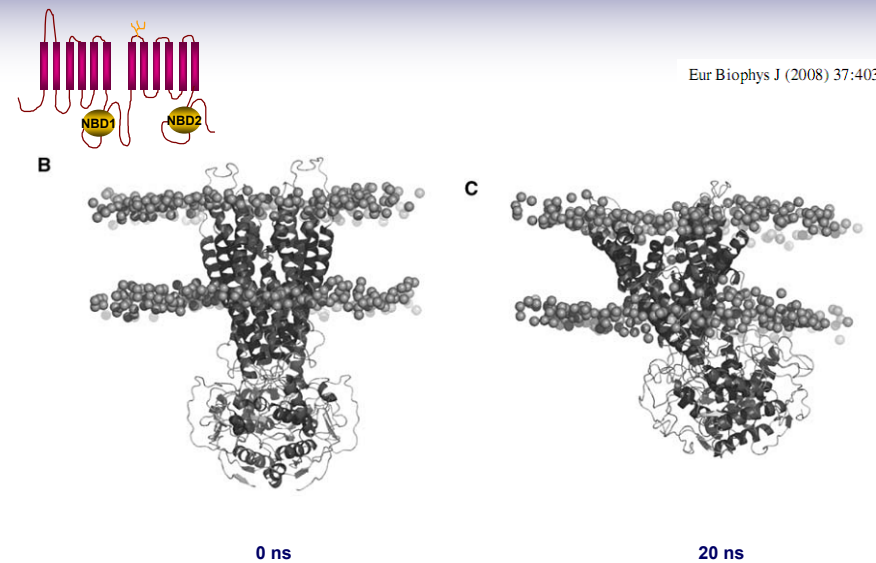
## A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése



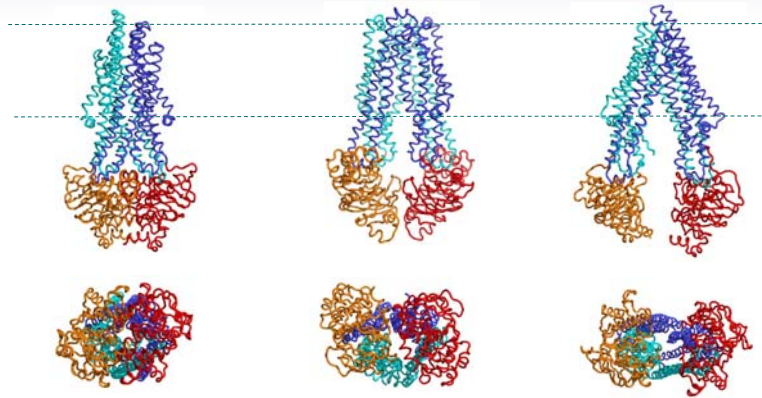
## Cisztás fibrózis



## Fehérjék konformációinak stabilitása



## ABC fehérjék konformációi

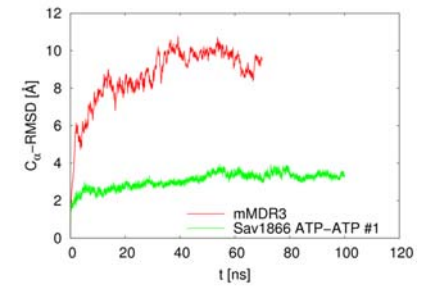
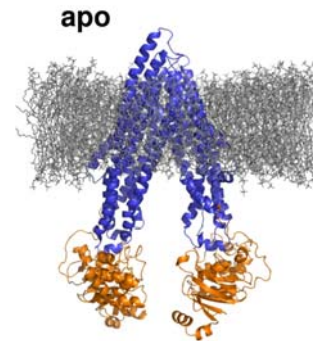


“alul-zárt” holo  
(+ATP)

“alul-zárt” apo  
(-ATP)

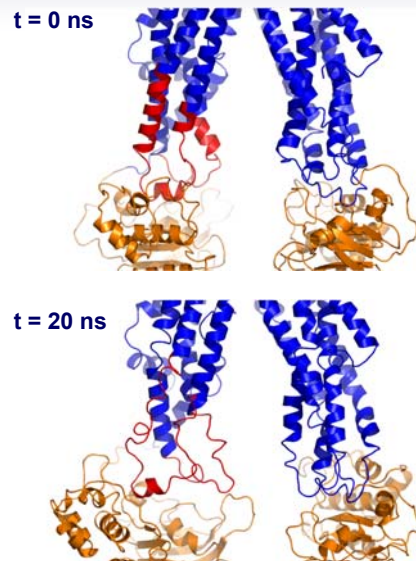
“alul-nyitott” apo  
(-ATP)

## Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil



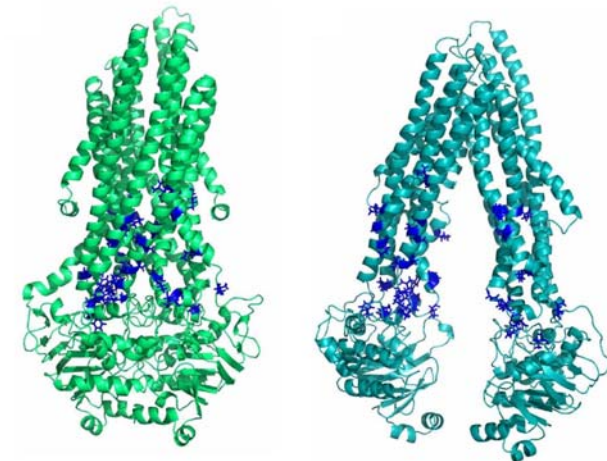
Gyimesi et al. BBA 2012

## 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%

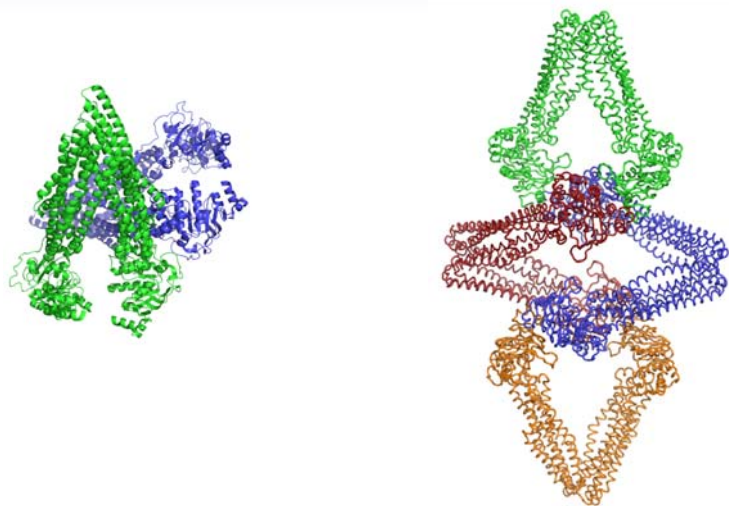
## Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre



## Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U

MsbA, PDBID:3B5W

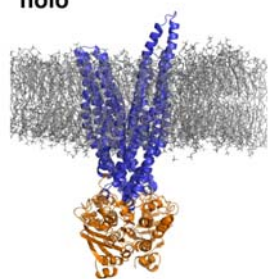


## Események modellezése

- 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

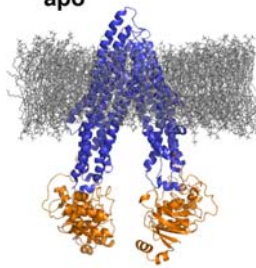
holo



hMDR1 homologia modell  
(3x100 ns)

M. Wiese modellje

apo



hMDR1 homologia modell  
(100 ns)

molekuláris dinamika  
trajektóriák

↓  
Esszenciális  
dinamika

↓  
módus kiválasztás

↓  
kollektív mozgások

## Zárt-nyitott átmenet

