

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

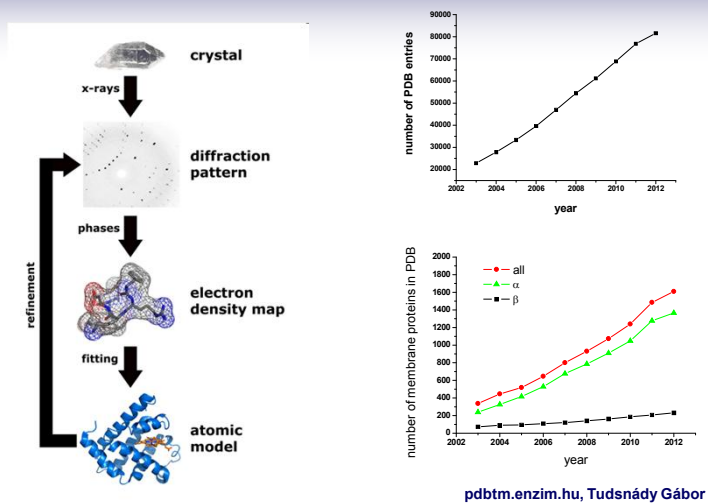
Atomi szintű információt ad mozgásokról.

Kísérletes módszerek általában nem
szolgáltatnak közvetlen információt az
atomi szintű történésekről.
(pl. EPR, Xlinks: nem, de NMR: igen)

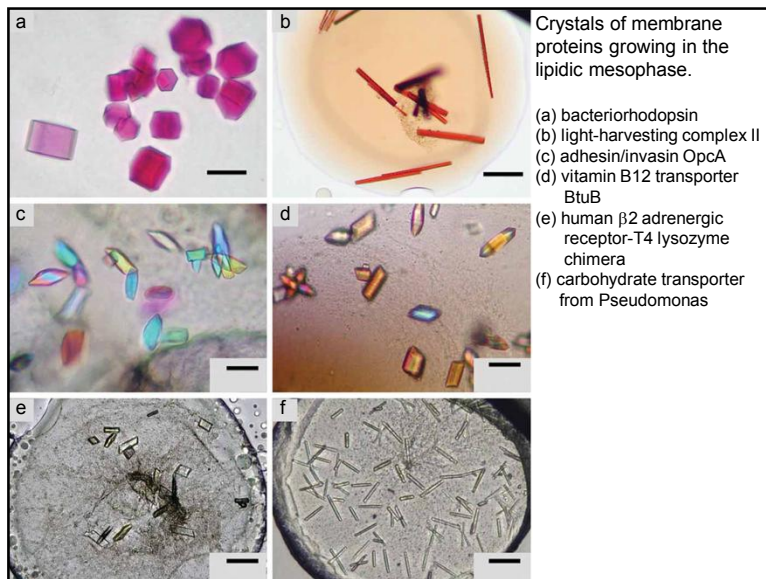
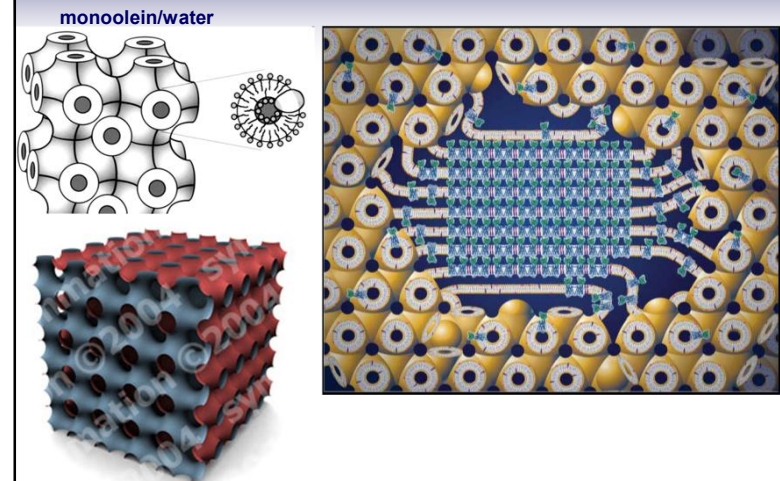
Membránfehérjék szerkezeti modellezése

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

Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



Szerkezet meghatározás – cubic phase

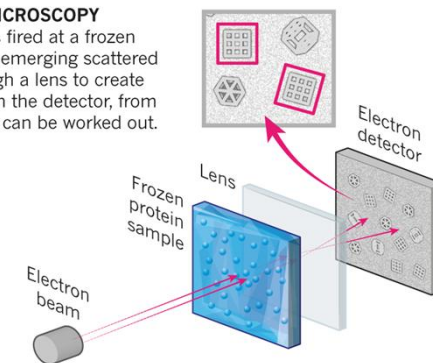


Szerkezet meghatározás – „single particle”

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.



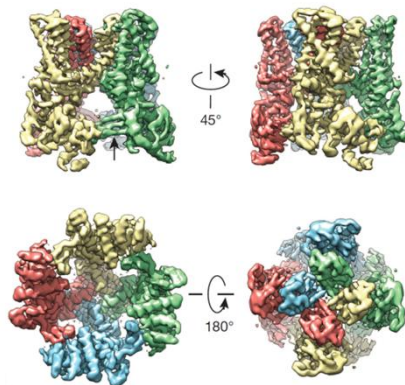
© nature

Ewen Callaway, Nature | News Feature

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

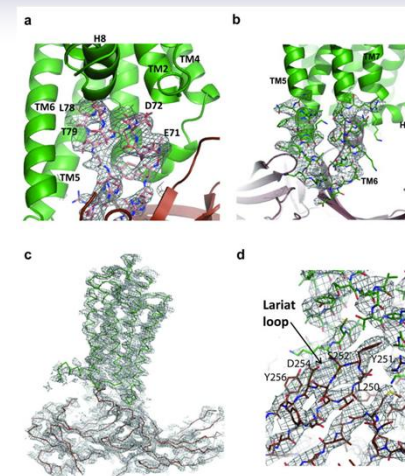
Szerkezet meghatározás – „single particle”

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

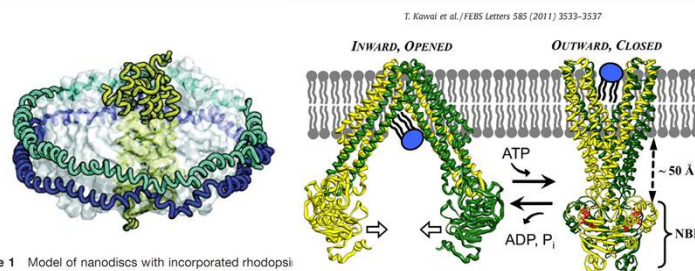


Figure 1 Model of nanodiscs with incorporated rhodopsin. Blue: membrane scaffold protein; gray: phospholipid bilayer, green: rhodopsin. The model was adapted from Nath et al. (2007a).

Homológia modellezés I.

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

Ala 4
Arg -1 5
Ile -2 0 6
Lys -2 -2 1 6

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

BLOSUM (BLOCKS of Amino Acid Substitution Matrix) matrix
is a substitution matrix

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

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

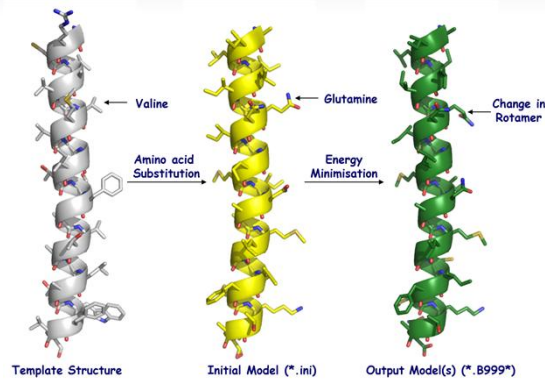
Alignement – pl. ClustalW

2HYD -----MIKRYLQFVK----PYKYRIFATIIVGIIKGFIMLIE
3B5X -----WQTFKRLWYTYR----LYKAGLVSTIALVINAADATYML
CFTR_HUMAN MQRSPLEKASVSKLFFSWTPILRKGYRQLEISDIQYPSVDSDADLS

5 10 15 20 25 30

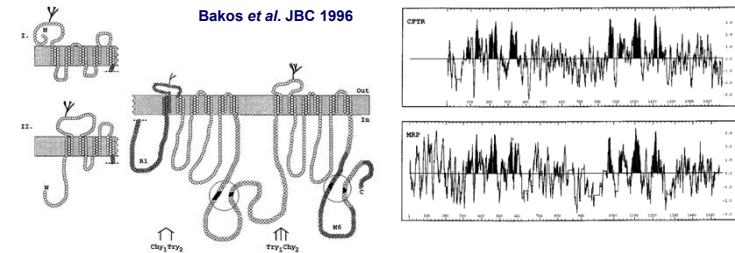
M I K R Y L Q F V K P Y K Y R I F A T I I V G I I K G F I M L I E
W Q T F K R L W Y T Y R L Y K A G L V S T I A L V I N A A D A T Y M L
M Q R S P L E K A S V S K L F F S W T P I L R K G Y R Q L E I S D I Q Y P S V D S D A D L S

Homológia modellezés II.



forrás: SBCB, Oxford, UK

Membránfehérjék topológiája



Membrántopológia és TM hélixek predikciója

CCTOP.enzim.hu

- Szekvencia alapján
- TMH és más részek között más az aminosav eloszlás
- Biológiai tudás figyelembevételének lehetősége
- Több prediktor integrálása

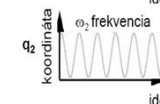
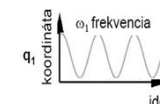
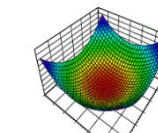
TMDet.enzim.hu

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

Fehérjék dinamikájának vizsgálata

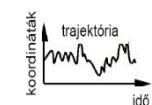
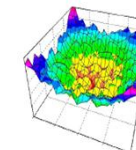
Normál-módus elemzés

- 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
- fs-os integrációs lépések
- numerikus integrálás hibája
- oldószer (explicit/implicit)
- „boundary condition”

A „force field”

Baker (2007)

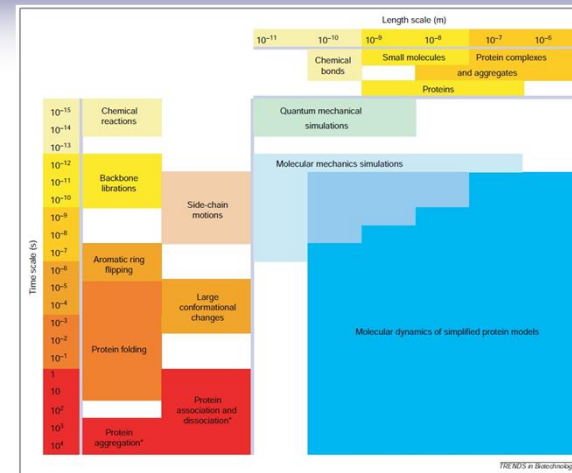
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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

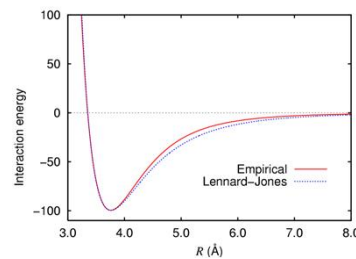
	Water	Chex		Water	Chex
CR	-0.890	-1.350	NH3	-20.000	-1.145
CH1E	-0.187	-0.645	NC2	-10.000	-0.200
CH2E	0.372	-0.720	N	-1.000	-1.145
CH3E	1.089	-0.665	OH1	-5.920	-0.960
CR1E	0.057	-0.410	O	-5.330	-1.270
NH1	-5.950	-1.145	OC	-10.000	-0.900
NR	-3.820	-1.630	S	-3.240	-1.780
NH2	-5.450	-1.145	SH1E	-2.050	-1.855

„Események” időskálája

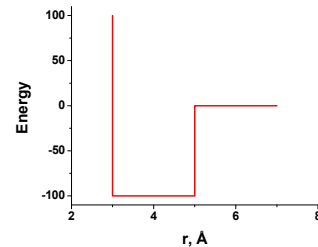


F. Ding and N.V. Dokholyan, TRENDS in Biotechnology, 23:450 (2005)

Diszkrét Molekuláris Dinamika (DMD)



wikipedia



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

Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

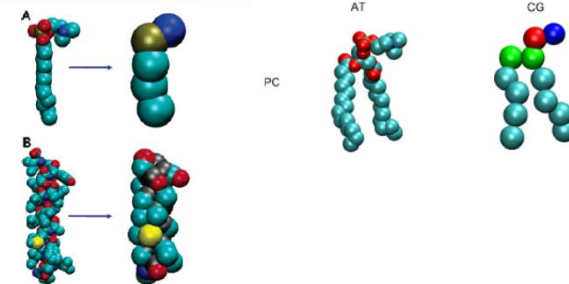


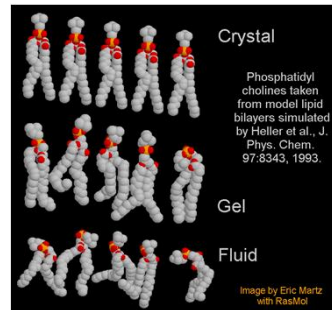
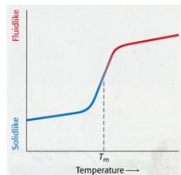
Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

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. *J. Journal of Structural Biology* 157 (2007) 579–592

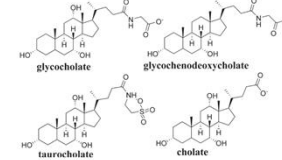
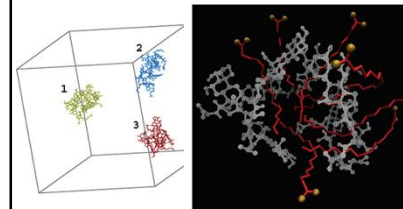
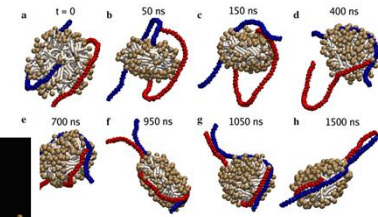
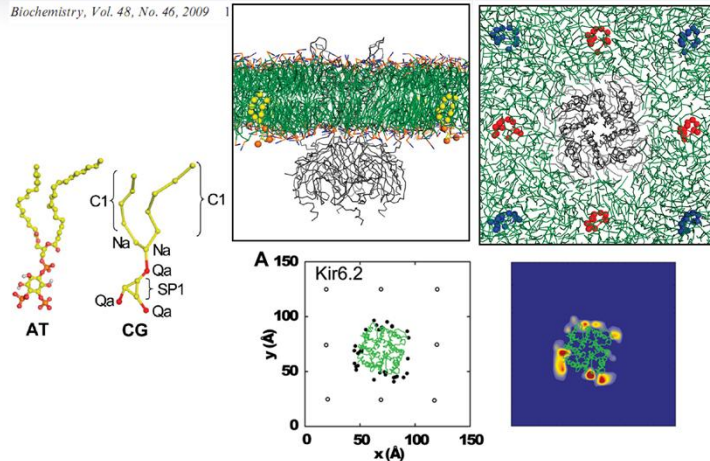


Figure 1. Chemical structures of the four common bile salts: glycocholate, glycochenodeoxycholate, taurocholate, and cholate.

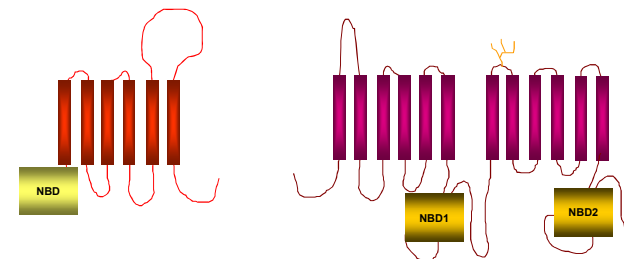


PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

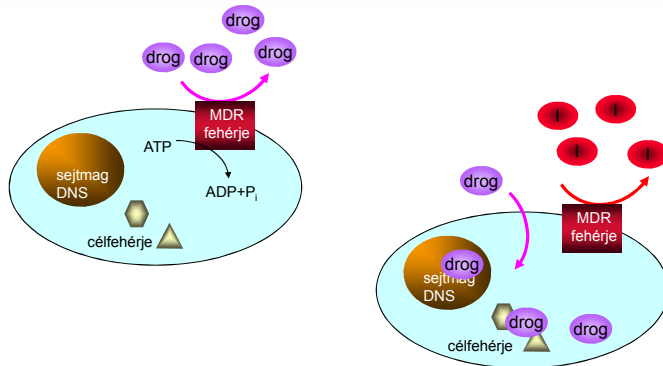
Biochemistry, Vol. 48, No. 46, 2009



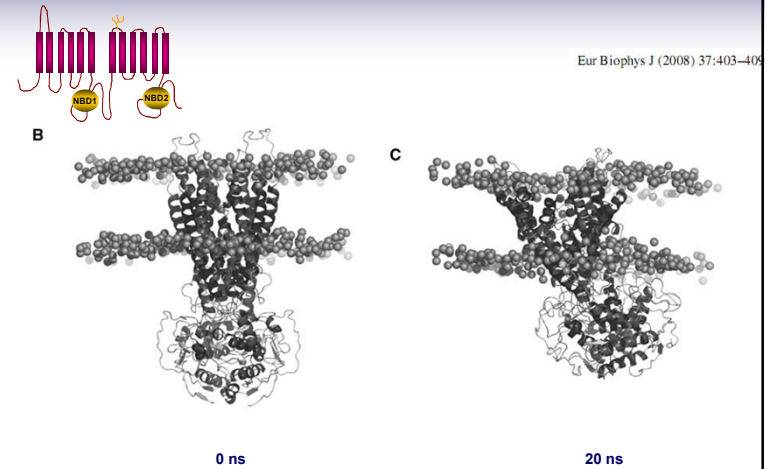
ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



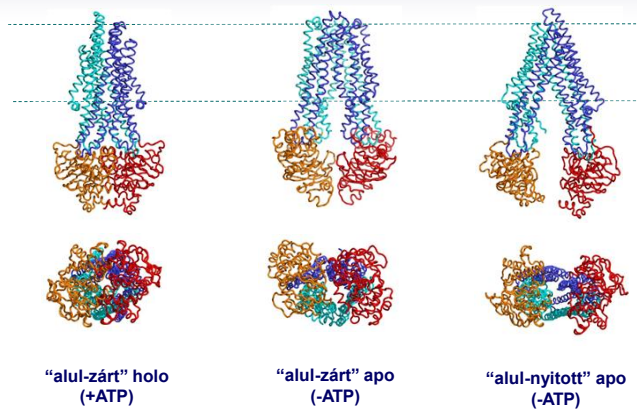
A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése



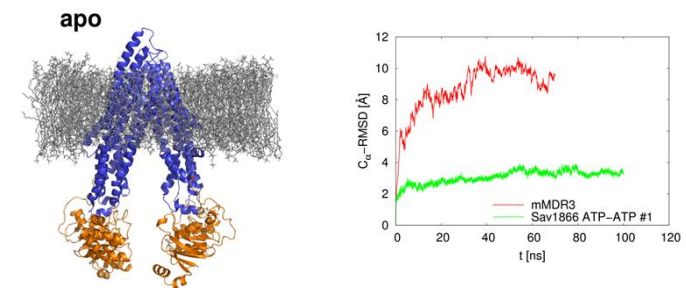
Fehérjék konformációinak stabilitása



ABC fehérjék konformációi



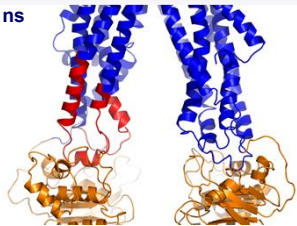
Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil



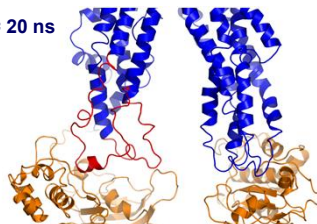
Gyimesi et al. BBA 2012

Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil

t = 0 ns

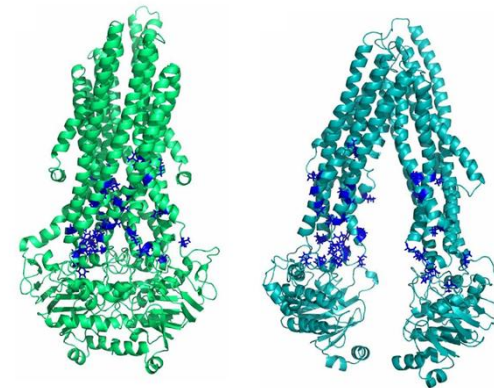


t = 20 ns



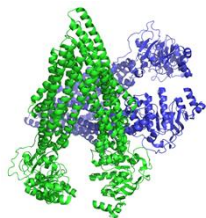
rendszer	megtartott hélixtartalom
Sav1866 ATP/ATP #1	90.04%
hMDR1 holo	91.84%
hMDR1 apo	64.30%
mMDR3	63.13%

Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre

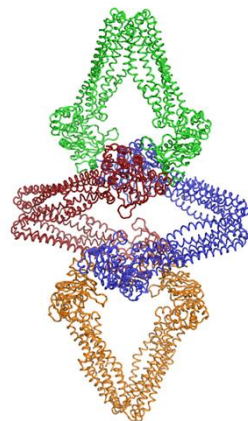


Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U



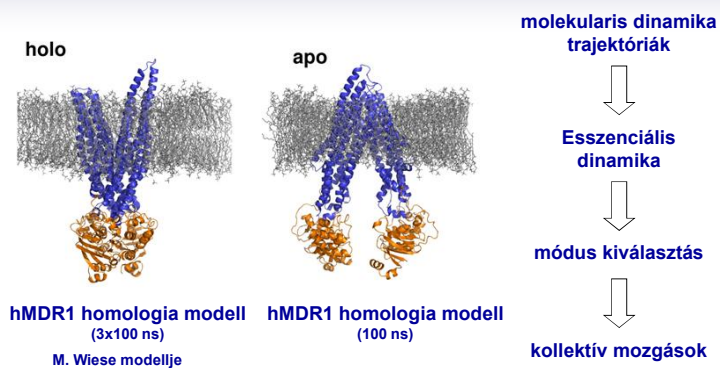
MsbA, PDBID:3B5W



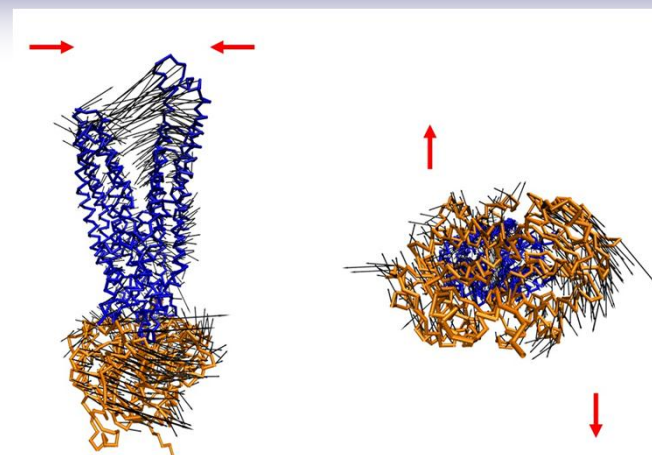
Események modellezése

- 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

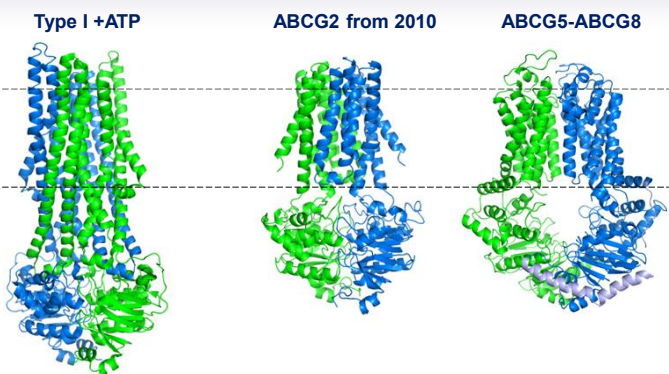
Zárt-nyitott átmenet jellemzése molekuláris dinamikával



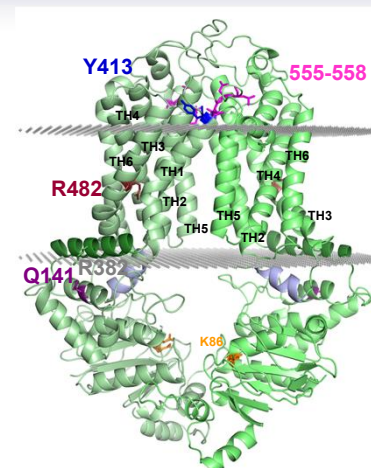
Zárt-nyitott átmenet



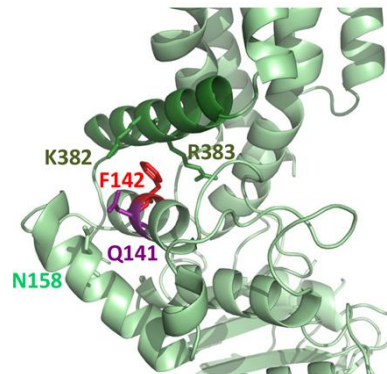
ABCG alcsalád - Type II



Az ABCG2 modell



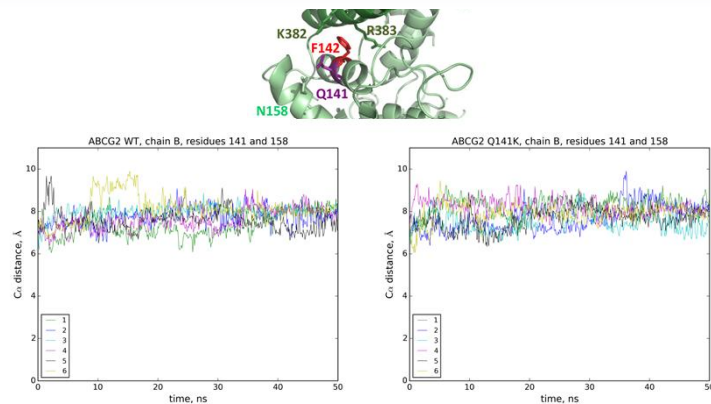
A Q141 helyzete



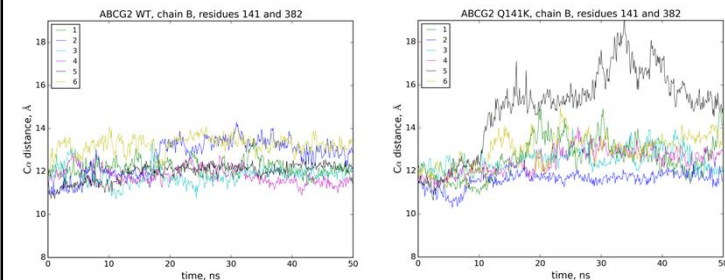
Molekuláris Dinamikai (MD) szimulációk

- 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)

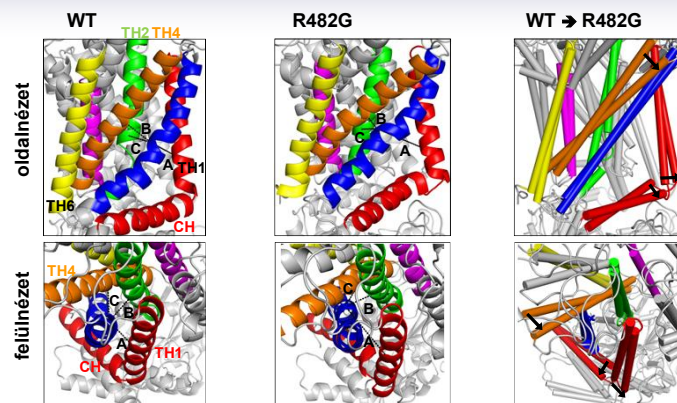
Q141K csere hatása a 141/158 kölcsönhatásra



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



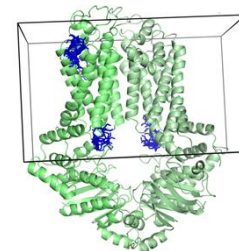
Az R482G által okozott változások



Drogekötő 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)

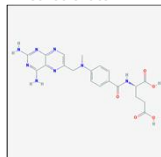


Drogekötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

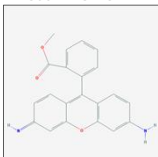
AutoDock Vina

- 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

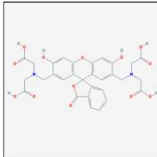
methotrexate



rhodamine123



calcein

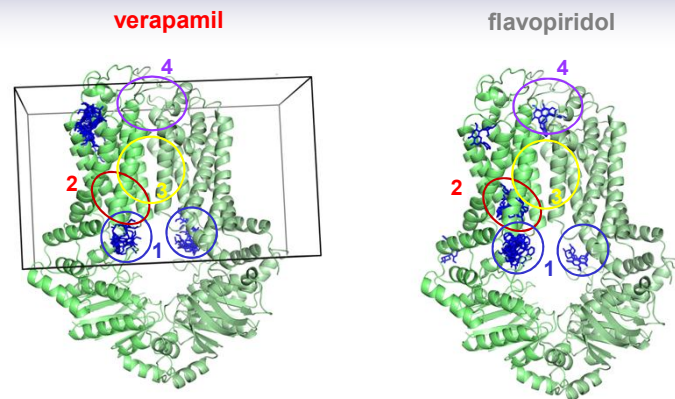


Drogekötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

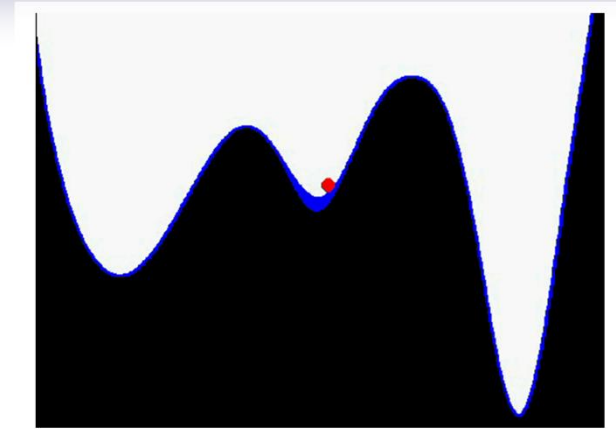
AutoDock Vina

- 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
- (6 ABCG2 konformáció) * (20 pozitúra) * (3 párhuzamos) *
(25 szubsztrát + 14 nem-szubsztrát) = 14 040 pozitúra
- Pozitúrák klaszterezése

Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással



Metadinamika I.



Metadinamika II.

