

Fehérjék szerkezete és dinamikája



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.

Témák

- Bevezetés – szimulációk és a fehérje dinamika jelentősége
- Fehérjék szerkezetének jellemzése
- Fehérjék dinamikájának modellezése
- Fehérjék felterekedésének szimulációja
- Dinamika szerepe a ligandfelismerésben
- Informatikai eszközök – biológus szempontból
- Gén és egyéb hálózatok

Számítógépes modellezés jelentősége

Atomi szintű információt ad mozgásokról.

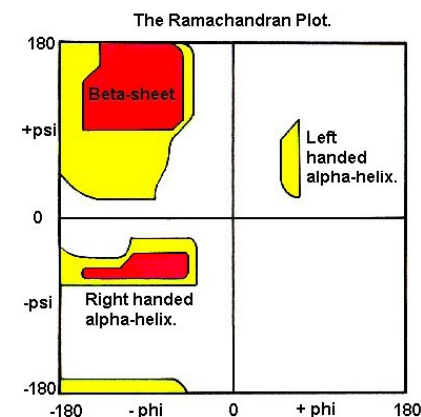
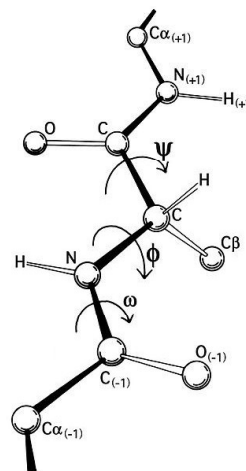
Kísérletes módszerek általában nem
szolgáltatnak közvetlen információt az
atomi szintű történésekről.

PI. NMR és MD - igen

Mai témák

- Bevezetés – szimulációk és a fehérje dinamika jelentősége
- Fehérjék szerkezetének jellemzése
 - Másodlagos szerkezeti mintázatok jóslása
 - Rendezetlen fehérjék
 - A harmadlagos és negyedleges szerkezet

Másodlagos szerkezeti elemek



wikipedia

Másodlagos szerkezeti elemek predikciója

Megoldott szerkezetekből minden aminosavra meghatározott
helix, *β-redő*, *coil* formáló hajlamból 60 %

Ezek kombinálása szekvenciák illesztésével 70-80 %

Megvalósítási lehetőségek:

- neurális hálózatok,
- support vector machines,
- rejtett Markov modellek, stb.

Megbízhatósági érték minden pozícióra

GOR4, HNN, Prof, [JPred/JNet](#)

Rendezetlen fehérjék I.

Intrinsically Disordered Proteins

Becslések alapján a fehérjéknek akár 25 %-a rendezetlen lehet.

Komplexitással nő a rendezetlen fehérjék aránya
Az emberi fehérjék felében van min. 30 a.a. hosszú rendezetlen szakasz

Nem teljesen random.

Strukturálisan igen flexibilisek.

Nincs kompakt globuláris hajtogatódás, reziduális szerkezet.

Megdőlt a paradigma,
mely szerint csak jól definiált 3D szerkezethez kapcsolható fehérje funkció.

Rendezetlen fehérjék II.

Miért jó?	Specifikus és adaptálódó Rendezetlen/redezett reverzibilis átmenete Nagy kötőfelület Gyors kötés	
Mire jó?	Entrópiikus lánc: Effektor: Scavangers: Összeszerelődés: Bemutató felület:	K ⁺ csatorna inaktiválása peptid inhibitorok kazein calmodesmon, F-aktin foszforilációs és proteolitikus helyek

Rendezetlen fehérjék III.

DisProt adatbázis: <http://www.disprot.org>

K. Dunker – Indiana University

Tompa Péter, Kalmár Lajos, Dosztányi Zsuzsa – MTA Enzimológiai Intézet

A rendezetlenség jóslása

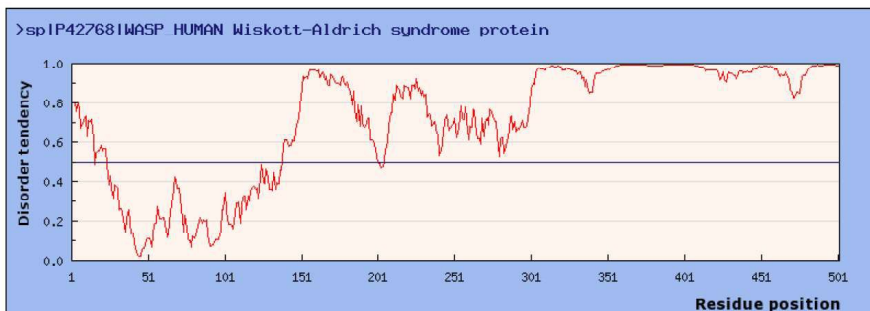
Tanuló algoritmusok
PDB-ben előforduló
rendezetlen fehérjék szekvenciája alapján
(nincs bennük sok hidrofób a.a.)

Disopred2

Kölcsönhatási energiák becslése

IUPred.enzim.hu

IUPred kimenete



Harmadlagos szerkezet jóslása

Ab initio folding

- CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction)
- kényszerfeltételek kísérletekből

Homológia modellezés

- feltételezi: konzervált szekvencia == konzervált struktúra
- > 30% hasonlóság
- a szekvencia-illesztés jósága a legmeghatározóbb

Homológia modellezés I.

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

[illegible]

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

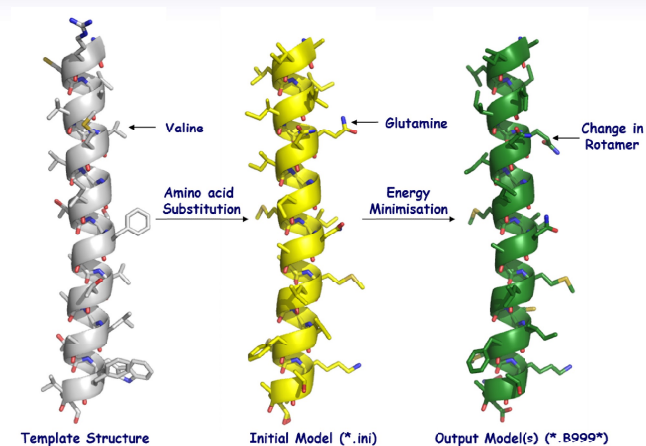
Alignement – pl. ClustalW

2HTD -----MIKRIIQVKK-----PYKTRIFATIIIVGIKKGIPMLIP
3B5X -----WQTKRLMTYIR-----LTKAGLVSTIALVINAADTYIM
CFTR_HUMAN MQRSPLEKASVSKLFFSWTPILRKRGTRQLRLESDIQIPVSDANLIS

5 10 15 20 25 30 35

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

Homológia modellezés II.



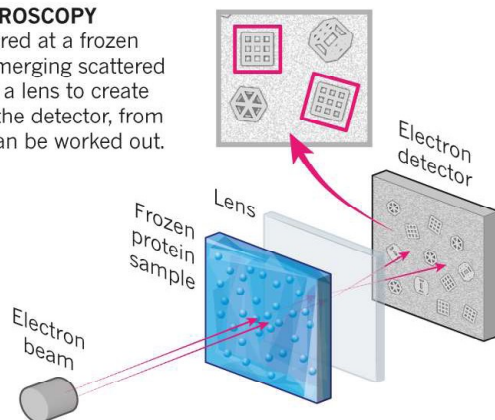
forrás: SBCB, Oxford, UK

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.

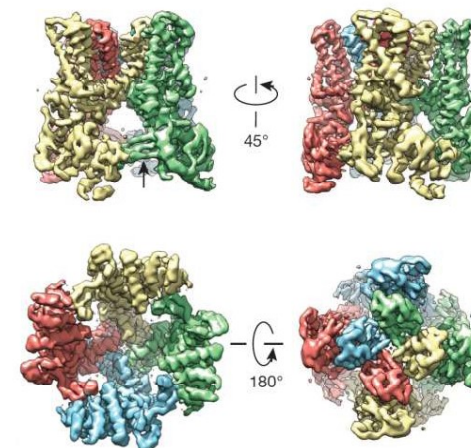


© nature

Ewen Callaway, Nature | News Feature
The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology, 09 September 2015

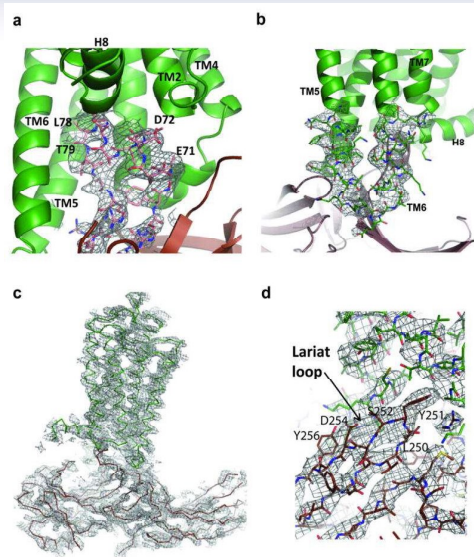
Szerkezet meghatározás – „single particle”

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.

Negyedleges szerkezet

Fehérje-fehérje dokkolás – rendkívül nehéz feladat
(felületek leírása, dinamika)

PISA - Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies
Molecular Dynamics

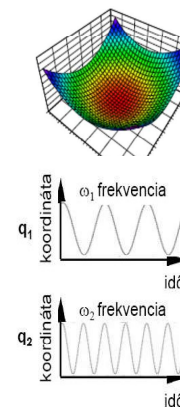
Mai témák

- Bevezetés – a fehérje dinamika és a szimulációk jelentősége
- Fehérjék szerkezetének jellemzése
 - Másodlagos szerkezeti mintázatok jöslása
 - Rendezetlen fehérjék
 - A harmadlagos és negyedleges szerkezet
- Fehérjék dinamikájának modellezése
- Fehérjék feltekeredésének szimulációja

Fehérje dinamika vizsgálata

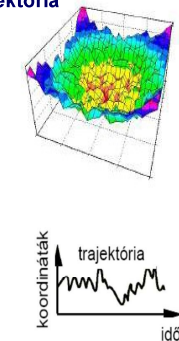
Normál-módus elemzés

- harmonikus potenciál
- analitikus mozgásegyenletek
- normál módusok



Molekuláris dinamika (MD)

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



A „force field” - I.

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

$$E_{\text{solv}} = - \sum_i^{\text{atom}} \sum_{j>i}^{\text{atom}} \left\{ \frac{2\Delta G_i^{\text{free}}}{4\pi\sqrt{\pi}\lambda_{ij}r_{ij}^2} \exp(-d_{ij}^2) V_j + \frac{2\Delta G_j^{\text{free}}}{4\pi\sqrt{\pi}\lambda_{ji}r_{ji}^2} \exp(-d_{ji}^2) V_i \right\} \quad \text{Lazaridis (2003)}$$

TABLE I. Solvation Parameters[†]

Atom types ^a	Volume	$\Delta G_i^{\text{ref},b}$	$\Delta G_j^{\text{free},c}$	$\Delta H_i^{\text{ref},b}$	$\Delta C_{\text{PI}}^{\text{ref},d}$
C	14.7	0.000	0.00	0.000	0.00
CR	8.3	-0.890	-1.40	2.220	6.90
CH1E	23.7	-0.187	-0.25	0.876	0.00
CH2E	22.4	0.372	0.52	-0.610	18.60
CH3E	30.0	1.089	1.50	-1.779	35.60
CR1E	18.4	0.057	0.08	-0.973	6.90
NH1	4.4	-5.950	-8.90	-9.059	-8.80
NR	4.4	-3.820	-4.00	-4.654	-8.80
NH2	11.2	-5.450	-7.80	-9.028	-7.00
NH3	11.2	-20.000	-20.00	-25.000	-18.00
NC2	11.2	-10.000	-10.00	-12.000	-7.00
N	0.0	-1.000	-1.55	-1.250	8.80
OH1	10.8	-5.920	-6.70	-9.264	-11.20
O	10.8	-5.330	-5.85	-5.787	-8.80
OC	10.8	-10.000	-10.00	-12.000	-9.40
S	14.7	-3.240	-4.10	-4.475	-39.90
SH1E	21.4	-2.050	-2.70	-4.475	-39.90

Lazaridis (1999)

A „force field” - II.

Baker (2007)

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

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

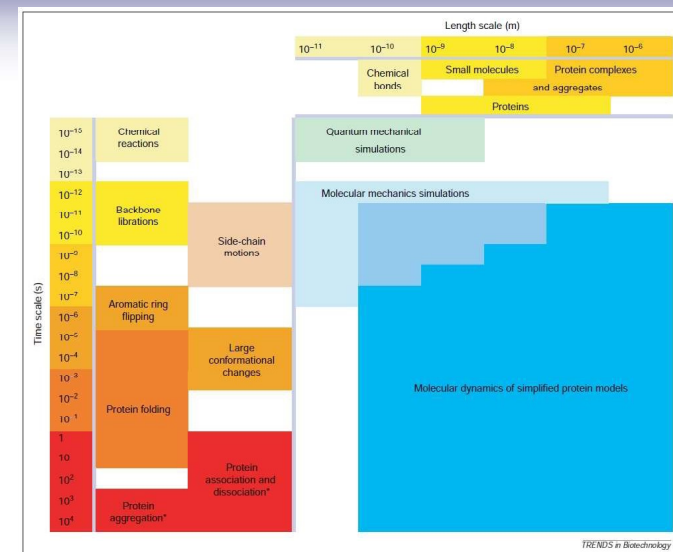
TABLE II. Atomic Contribution to the Solvation Free Energy in Water and Cyclohexane

	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

Az MD korlátjai

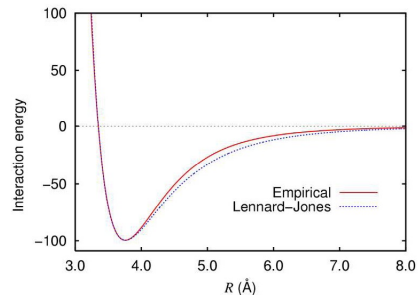
- idő (CPU, valós)
- potenciál kiszámolása a szűk keresztmetszet
- numerikus integrálás hibája
- fs-os integrációs lépések
- oldószer (explicit/implicit)
- „boundary condition”

„Események” időskálája

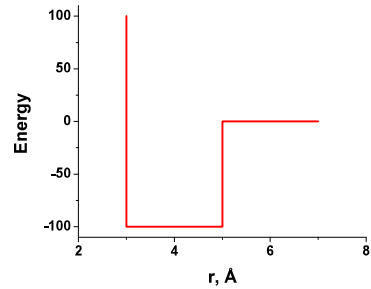


F. Ding and N.V. Dokholyan, TRENDS in Biotechnology, 23:450 (2005)

Diszkrét Molekuláris Dinamika (DMD)



wikipedia



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

Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

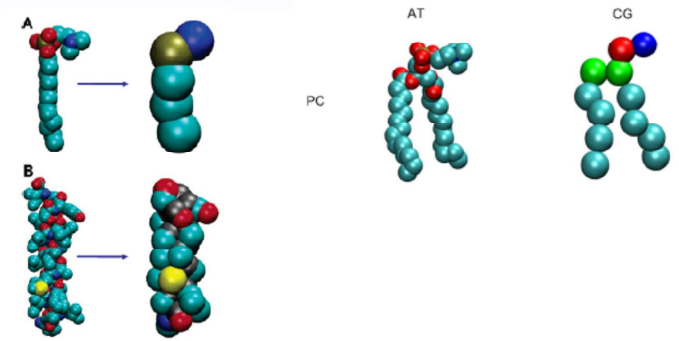


Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

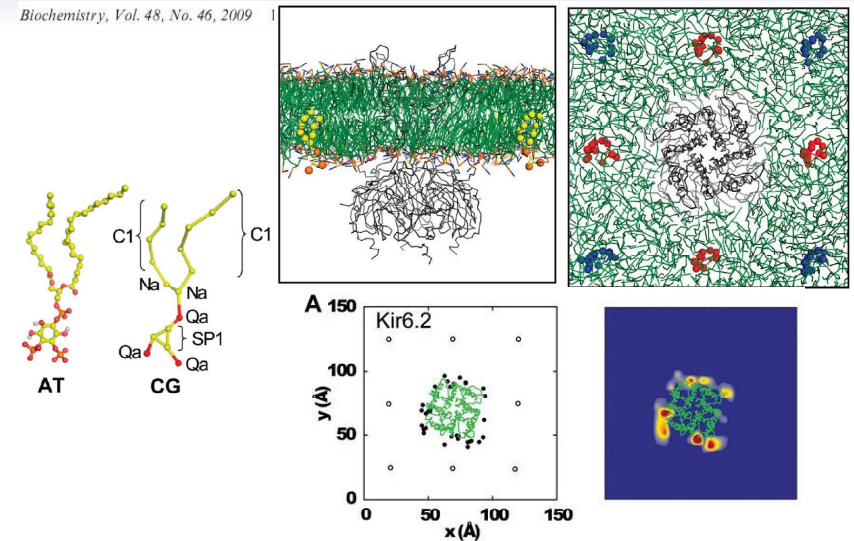
Fehérjére pl. 2 bead vagy 4+ bead modellek
MARTINI CG force field

Kettősréteg felépülése a fehérje köré

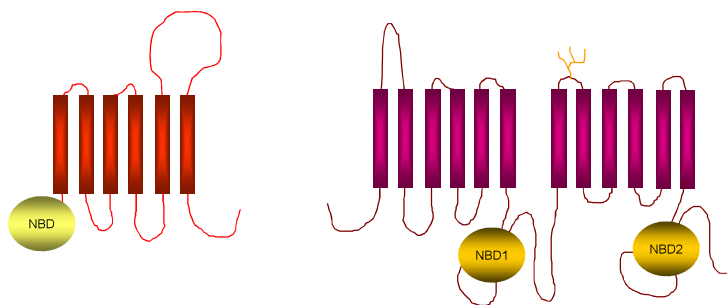
mozi

PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

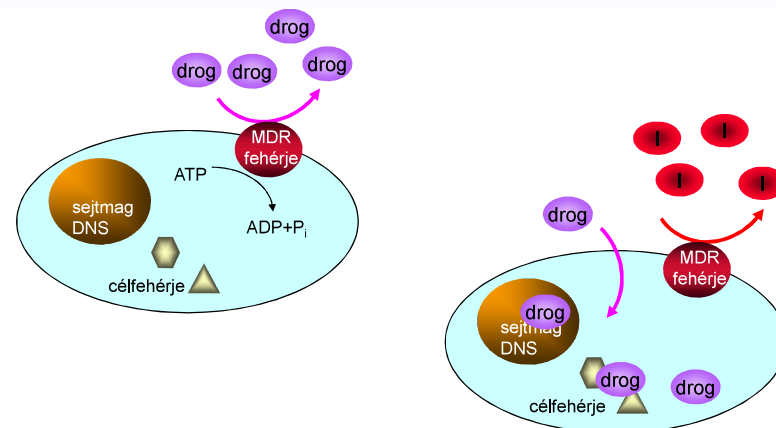
Biochemistry, Vol. 48, No. 46, 2009



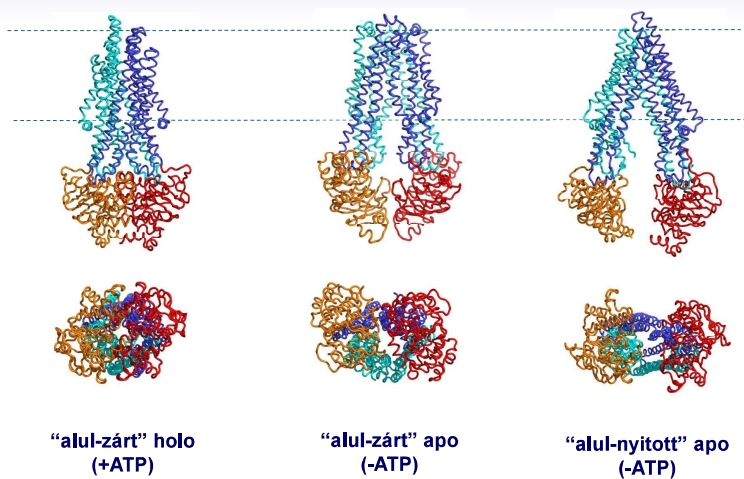
ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése

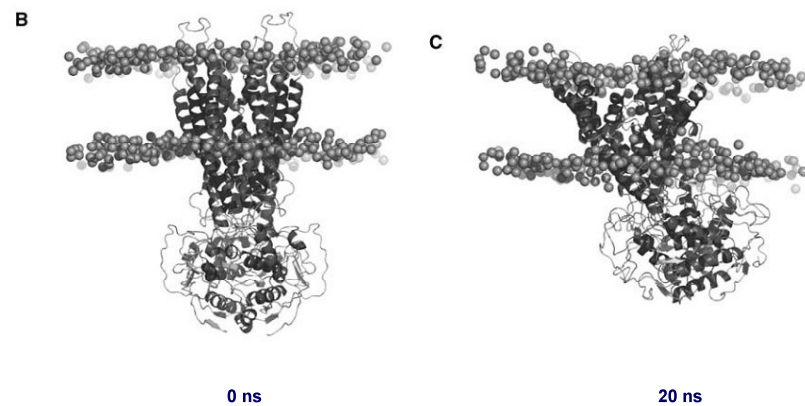


ABC fehérjék konformációi

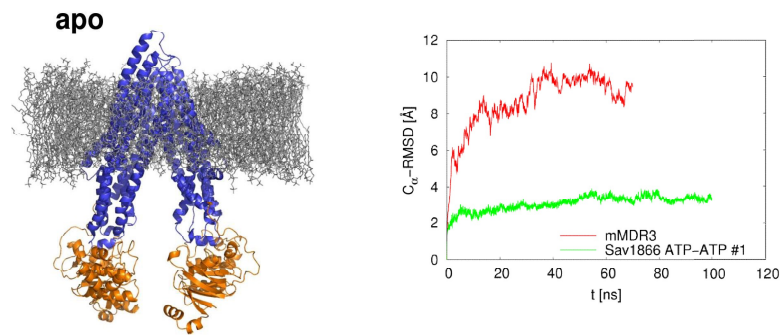


Fehérjék konformációinak stabilitása

Eur Biophys J (2008) 37:403–409

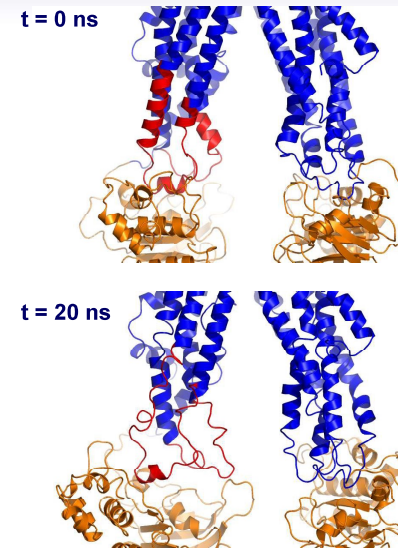


Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil



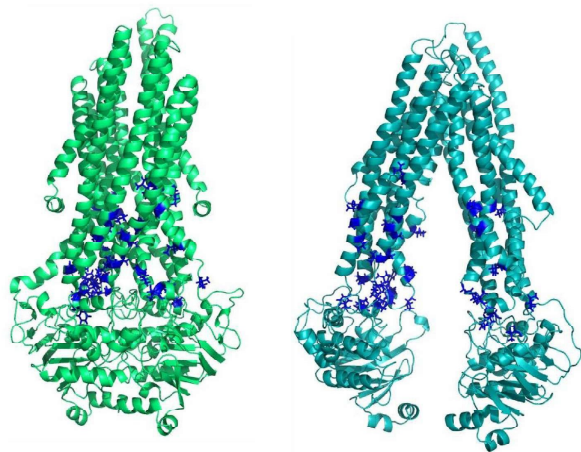
Gyimesi *et al.* BBA 2012

Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil



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

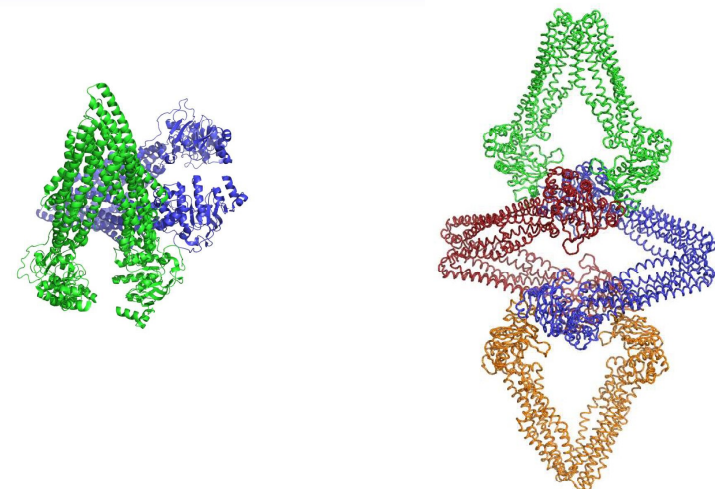
Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre



Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U

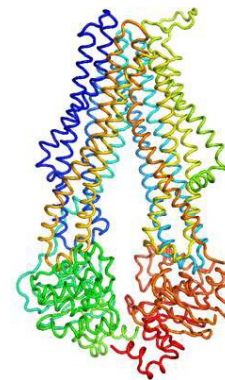
MsbA, PDBID:3B5W



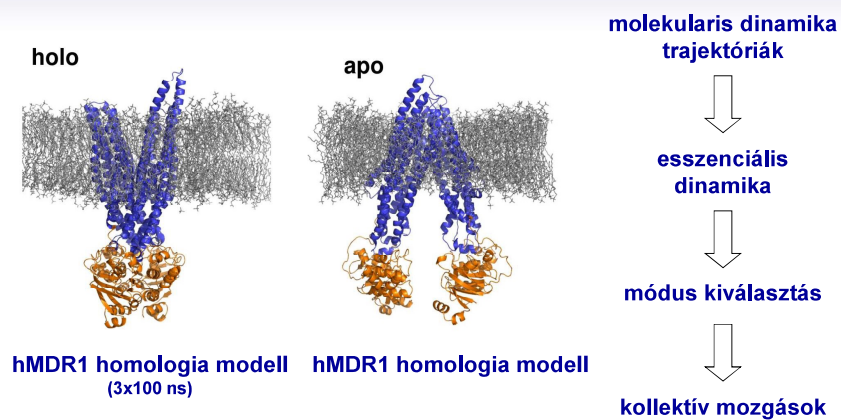
Események modellezése

- 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

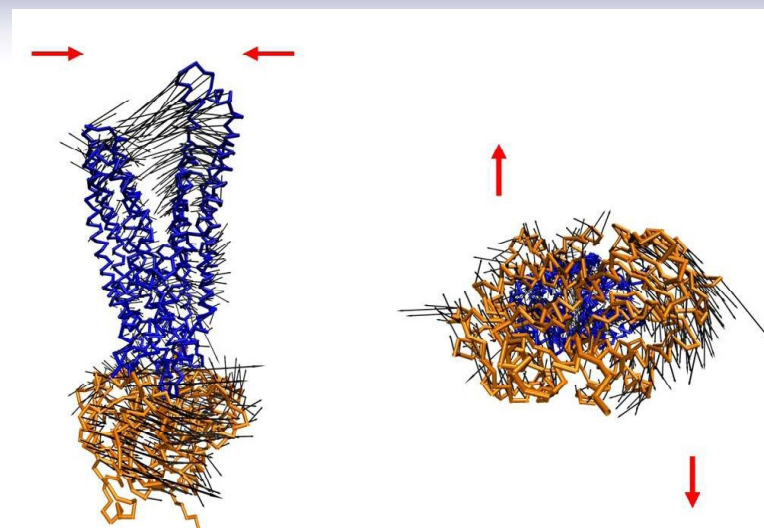
Targeted MD



Zárt-nyitott átmenet jellemzése molekuláris dinamikával

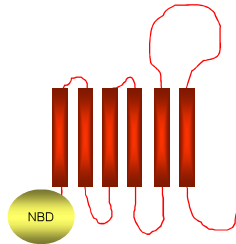


Zárt-nyitott átmenet

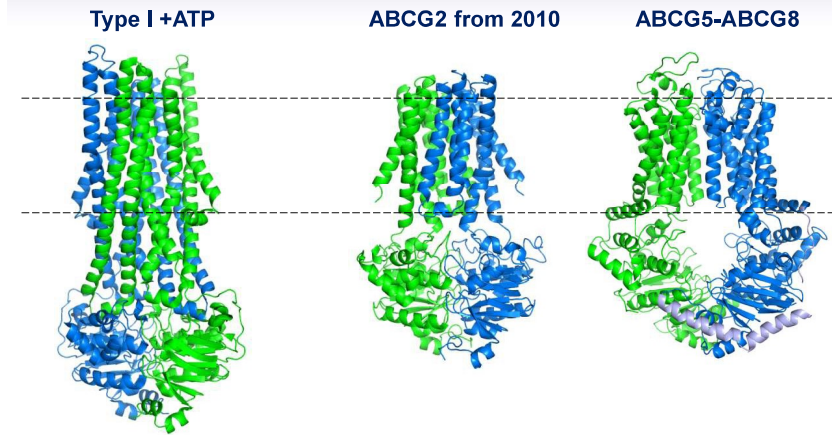


Egy komplex példa – ABCG2

- Szerkezet modellezése
- Mutációk hatásának elemzése molekuláris dinamikával
- Kis molekulák dokkolása a fehérjéhez
- Össejtekben, szöveti barrierekb, rákos sejtekben fejeződik ki
- Multidrog transzporter (xenobiotikumok és endobiotikumok):
 - rákellenes gyógyszerek
 - húgysav
- Leggyakoribb variáns (Q141K) csökkent expresszió és funkció



ABCG alcsalád - Type II



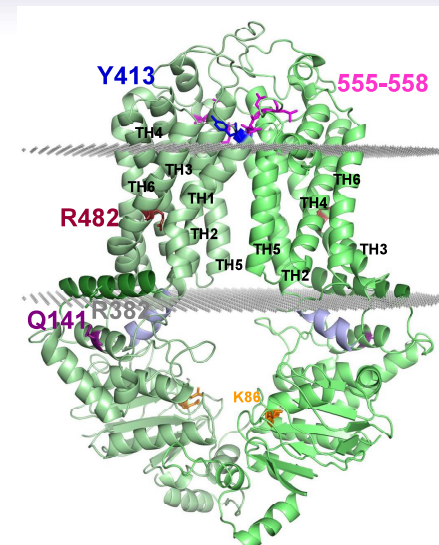
Az ABCG2 homodimer homológia modellezése

- Kb. 25% megegyező és 45% hasonló a.a.
- A szekvenciaillesztés nagy része triviális volt
- 100 modellt építettünk Modeller-vel
- A legjobb modellt (DOPE score) kiválasztottuk és használjuk

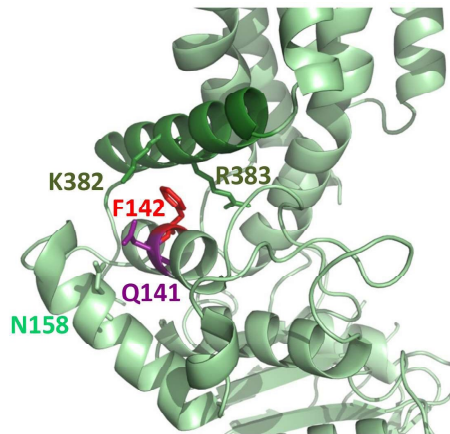


ABCG5-ABCG8
PDBID:5D07

Az ABCG2 modell



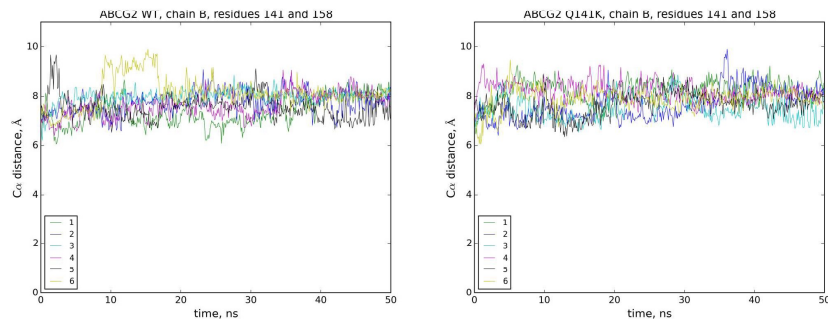
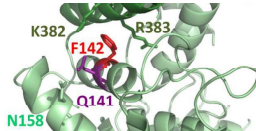
A Q141 helyzete



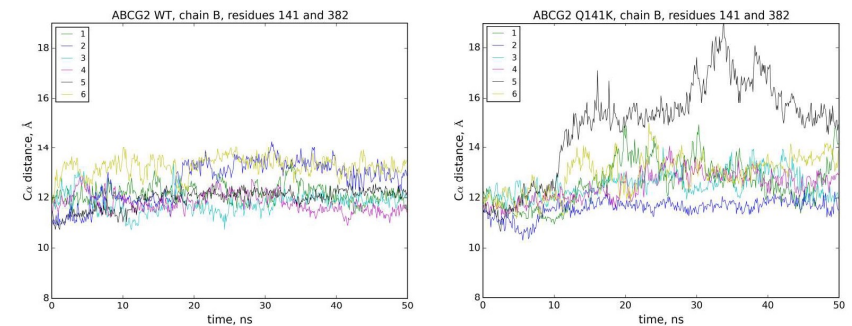
Molekuláris Dinamikai (MD) szimulációk

- 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



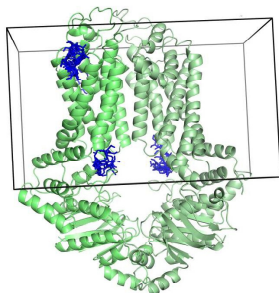
A Q141K hatása a 141/382 (NBD/TMD) kapcsolatra



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)

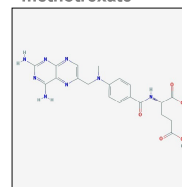


Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

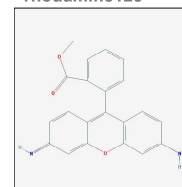
AutoDock Vina

- 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

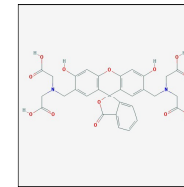
methotrexate



rhodamine123



calcein



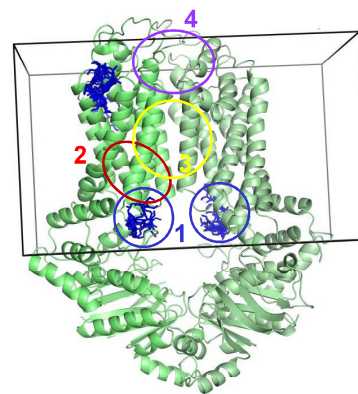
Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

AutoDock Vina

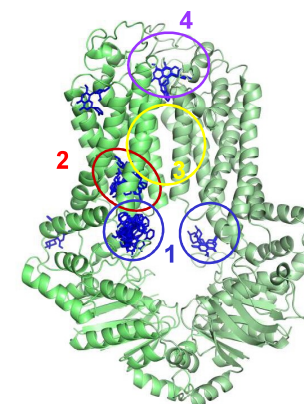
- Fix fehérje, flexibilis ligand
- Több konformáció (6 db, egyensúlyba hozott)
- Doboz; ligand odapróbálása nagyon sokszor (ebből 20/futás)
- Mindent oda lehet dokkolni... ezért szubsztrát + nemszubsztrát
- (6 ABCG2 konformáció) * (20 pozitúra) * (3 párhuzamos) *
- (25 szubsztrát + 14 nem-szubsztrát) = 14 040 pozitúra
- Pozitúrák klaszterezése

Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

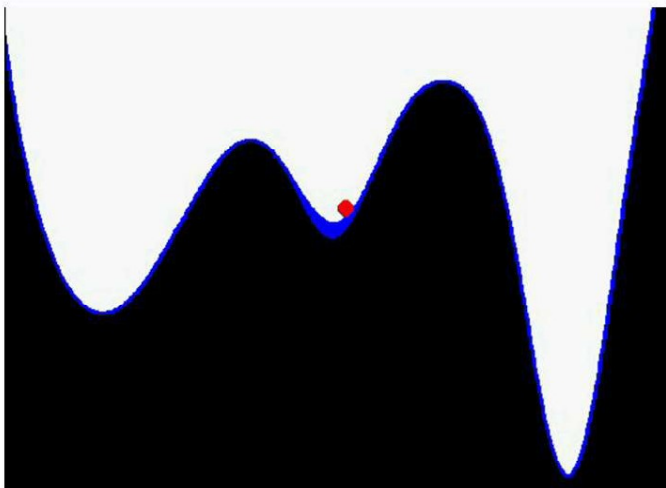
verapamil



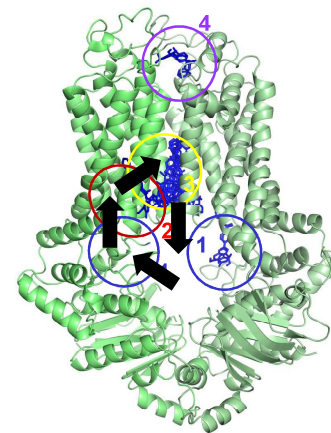
flavopiridol



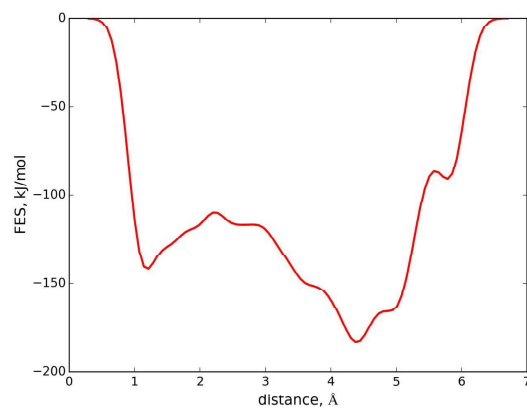
Exploring drug binding sites by biased MD simulations



Exploring drug binding sites by biased MD simulations



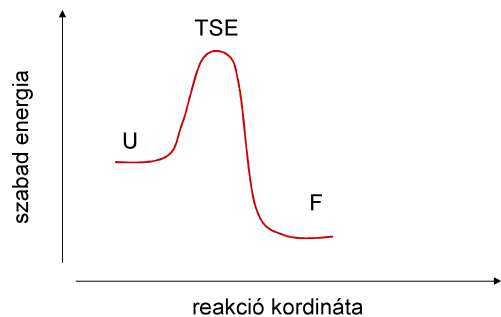
Szabadenergia felület - FES (Free Energy Surface)



Mai témák

- Bevezetés – a fehérje dinamika és a szimulációk jelentősége
- Fehérjék jellemzése bioinformatikai eszközökkel
- Fehérjék dinamikájának modellezése
- Fehérjék feltekeredésének szimulációja

Kétállapotú fehérje feltekeredés Two-state model of protein folding



nukleáció

Levinthal paradoxon

Fehérje stabilitás I.

Konformációs stabilitást elősegítik:

- Hidrofób kölcsönhatások
- Intramolekuláris H-híd kötések
- Intramolekuláris ionos kölcsönhatások
- Intramolekuláris van der Waals kölcsönhatások
- Intramolekuláris diszulfid hidak

Destabilizáló tényezők:

- H-híd az oldószerrel
- Van der Waals kölcsönhatás az oldószerrel
- Az ionos csoportok solvataciója
- entrópia

Fehérje stabilitás II.

A fehérje stabilitás nem ér el maximális értéket.

Erre utalnak:

termofil baktériumok fehérjéi;
igen stabil, tervezett fehérjék.

Ennek okai lehetnek:

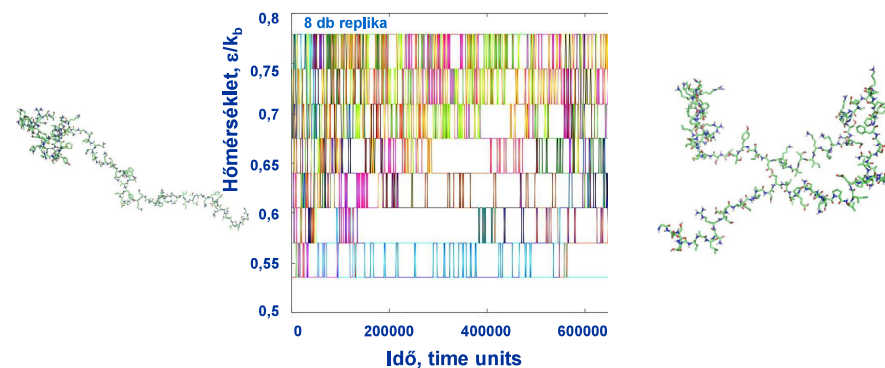
az evolúció nem igényel stabilabb fehérjét mint a funkció önmaga;
a fehérjéknek le is kell bomlaniuk;
a funkcióhoz flexibilitás szükséges.

Folding szimulációk során mi az abszolút energiaminimumot
(maximum stabilitást) keressük.

Fehérje feltekeredés szimulációja

All atom force-field:

Potenciál függvény számolása erőforrásigényes
Reprezentatív konformációs mintavételezés problémás
Umbrella sampling, [replica exchange](#).



Összefoglalás

- Bevezetés – a fehérje dinamika és a szimulációk jelentősége
- Fehérjék jellemzése bioinformatikai eszközökkel
- Fehérjék dinamikájának modellezése
- Fehérjék feltekeredésének szimulációja

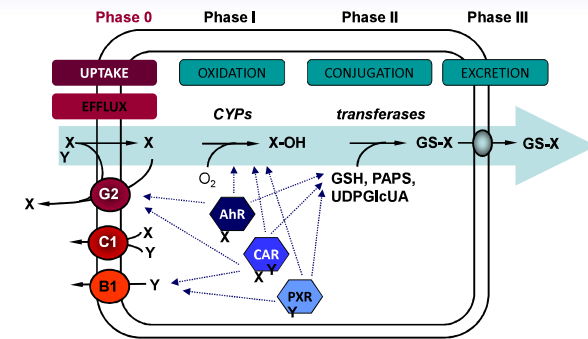
PPKE - bionika kurzus, 2015, november - www.hegelab.org

Hálózatok – fehérje hálózatok

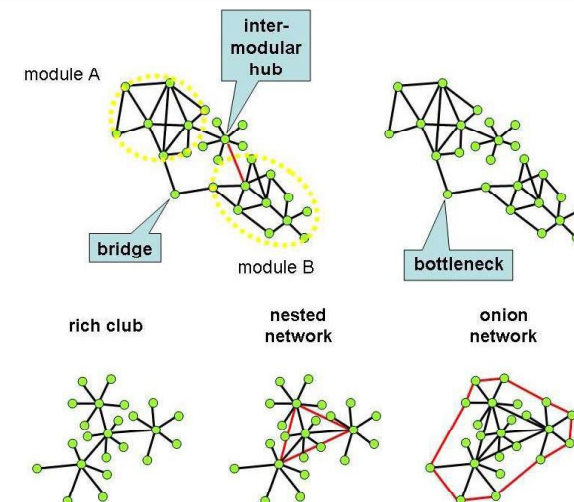
- Rendszerbiológia
- Fehérjék-fehérjék kölcsönhatási hálózata
- Gének-fehérjék-drogok kölcsönhatása
- Kapcsolatok aminosavak mozgásaiban

Csermely P. et al. 2012, <http://arxiv.org/abs/1210.0330>

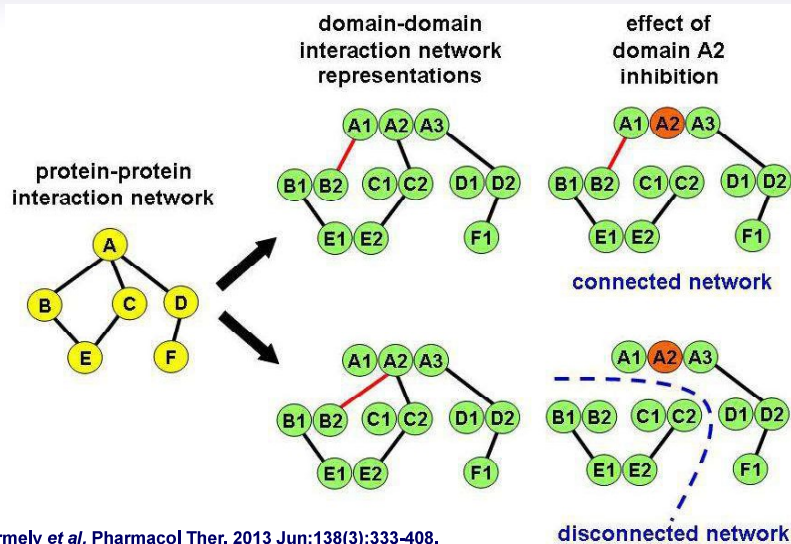
The chemoimmune (ChI) system



Hálózatok szerkezete

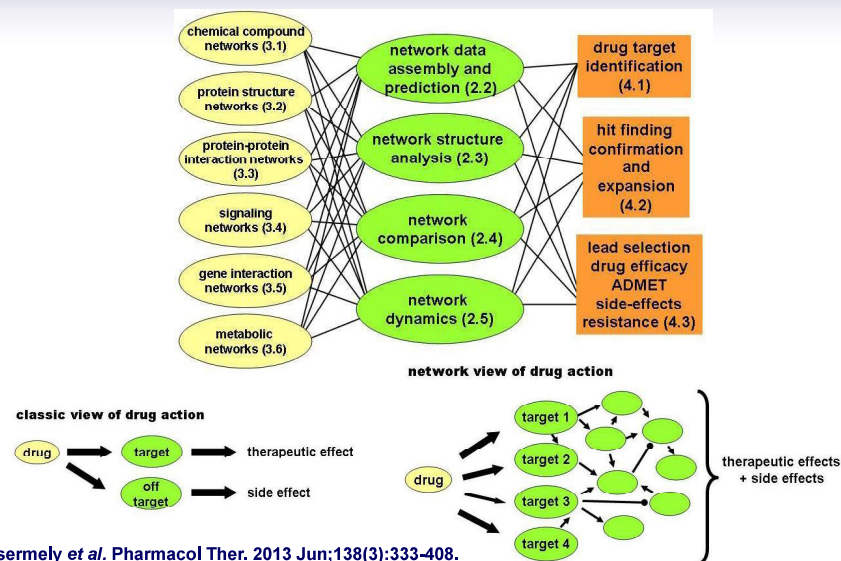


Fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatok



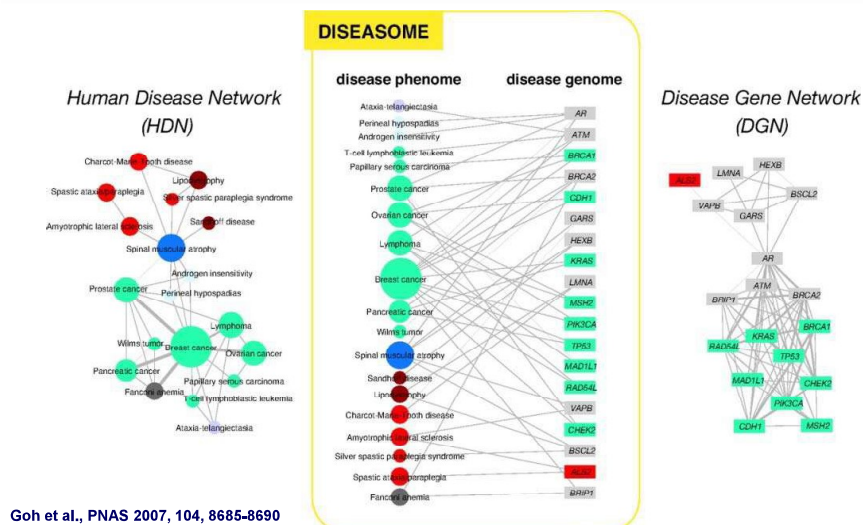
Csermely *et al.* Pharmacol Ther. 2013 Jun;138(3):333-408.

Hálózatok és gyógyszertervezés



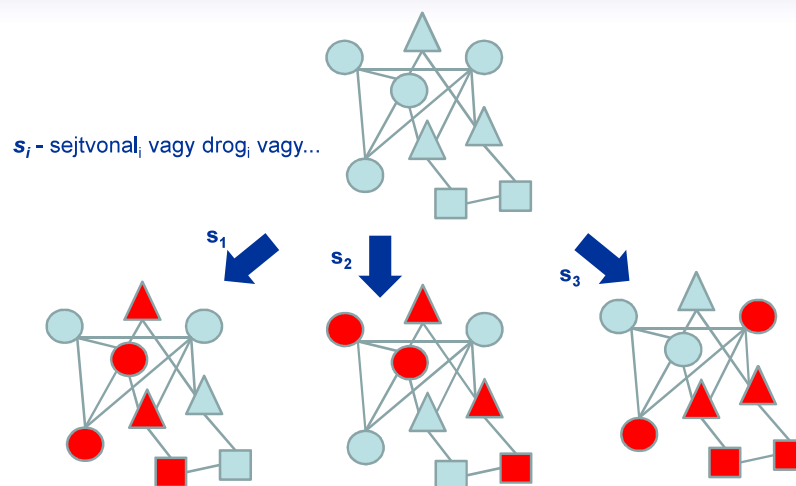
Csermely *et al.* Pharmacol Ther. 2013 Jun;138(3):333-408.

Network assembly

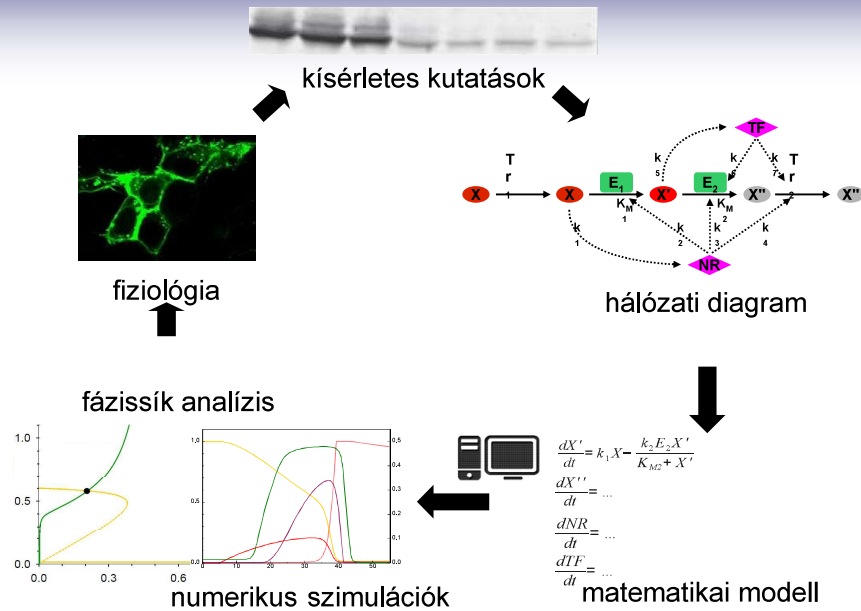


Goh *et al.*, PNAS 2007, 104, 8685-8690

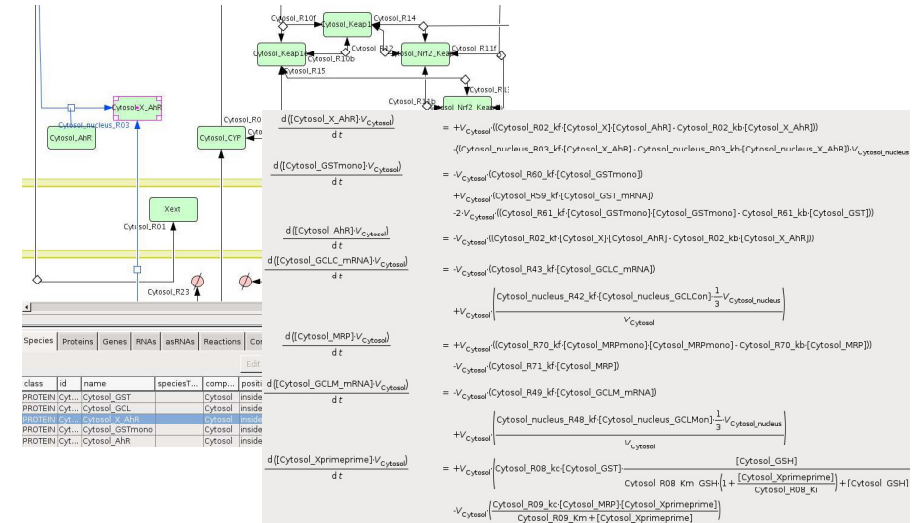
A kemoimmunitási (ChI) hálózat működésének feltérképezése



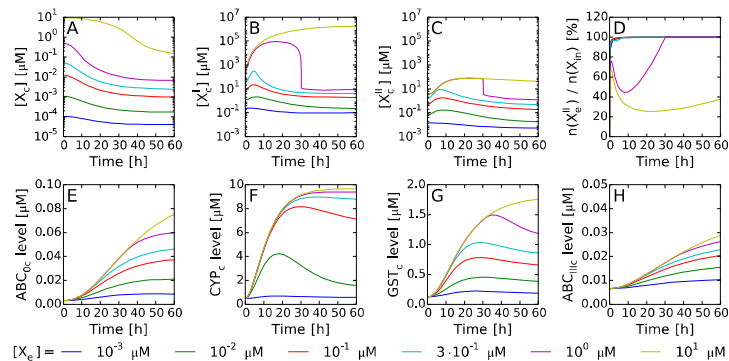
A ChI rendszer kinetikai modellezése



Mathematical modeling to understand relationships in the chemodefense network



A rendszer kinetikai modellezése



KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!

- tamas@hegelab.org
- Álláslehetőség: www.hegelab.org