

# 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

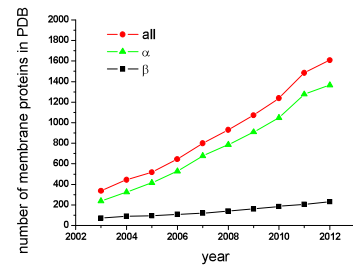
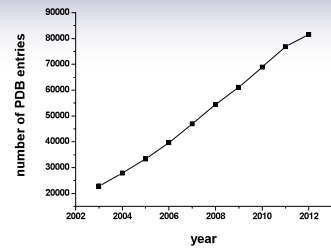
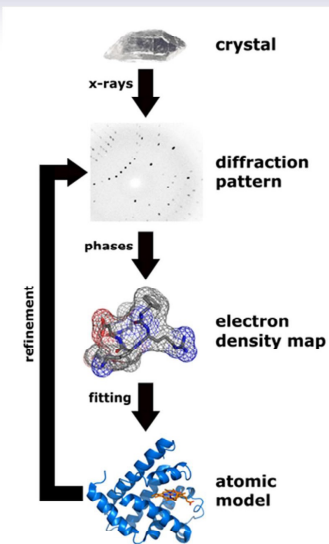
Atomi szintű információt ad mozgásokról.

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” vagy ”fold recognition”

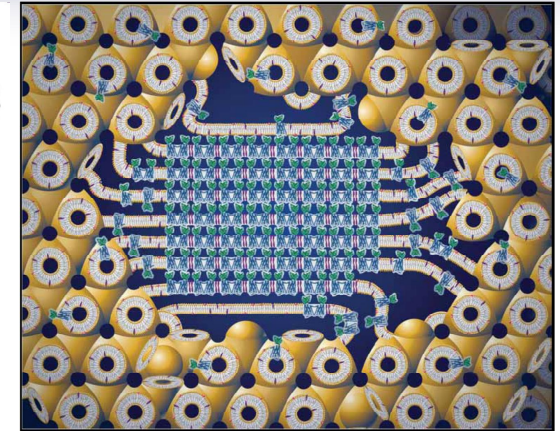
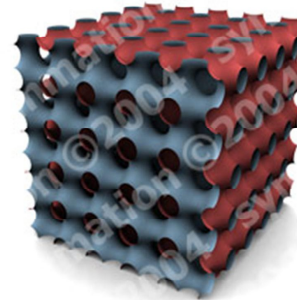
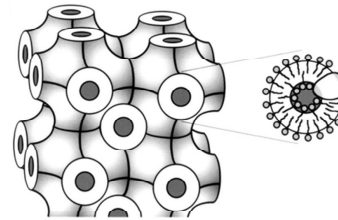
## Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



pdbtm.enzim.hu, Tudsány Gábor

## Szerkezet meghatározás – cubic phase

monoolein/water

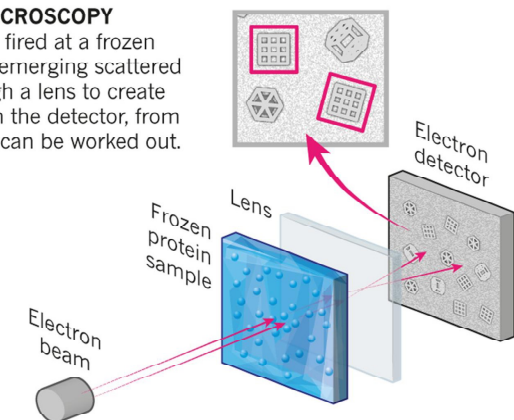


## Szerkezet meghatározás – „single particle”

Cryo-electron microscopy

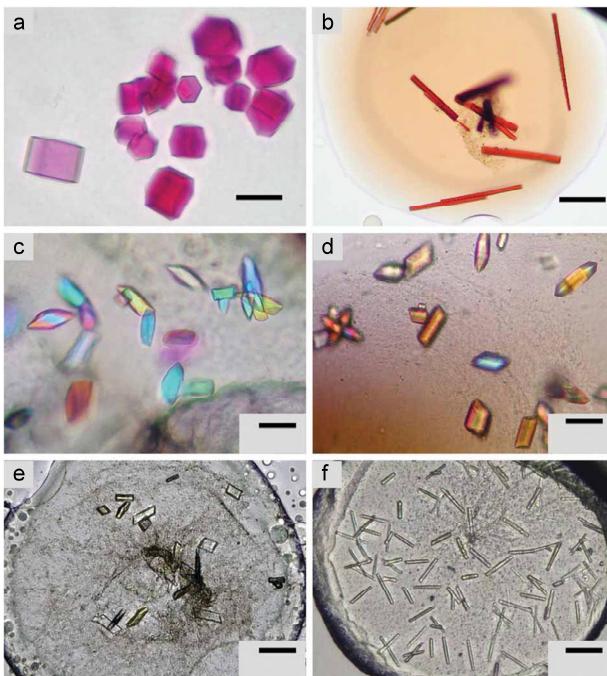
### CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

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

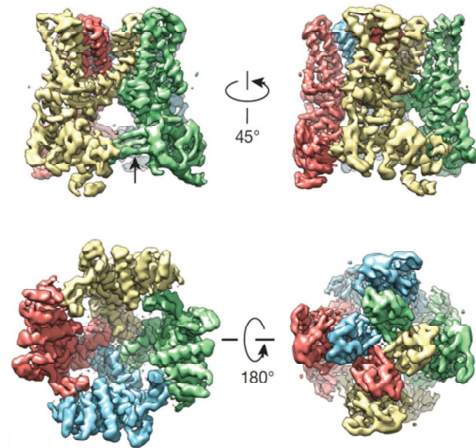


Crystals of membrane proteins growing in the lipidic mesophase.

- (a) bacteriorhodopsin
- (b) light-harvesting complex II
- (c) adhesin/invasin OpcA
- (d) vitamin B12 transporter BtuB
- (e) human  $\beta 2$  adrenergic receptor-T4 lysozyme chimera
- (f) carbohydrate transporter from *Pseudomonas*

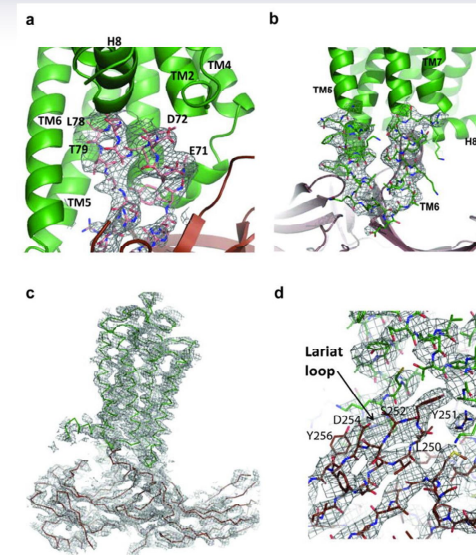
## Szerkezet meghatározás – „single particle”

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)

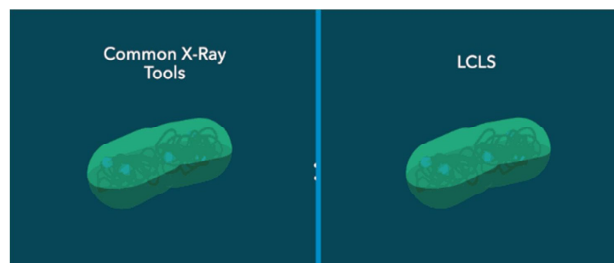


Nature. 2015 Jul 30;523(7562):561-7.

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

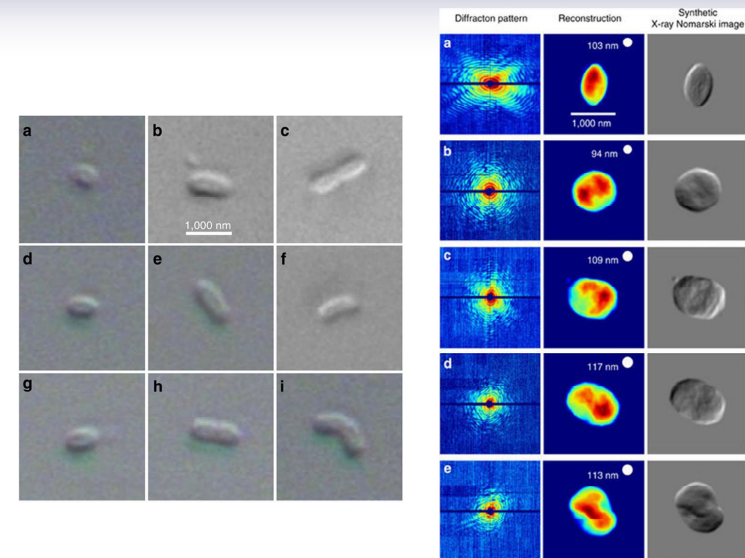
## Szerkezet meghatározás – „teljes sejt”

Free Electron Laser (FEL)



## Szerkezet meghatározás – „teljes sejt”

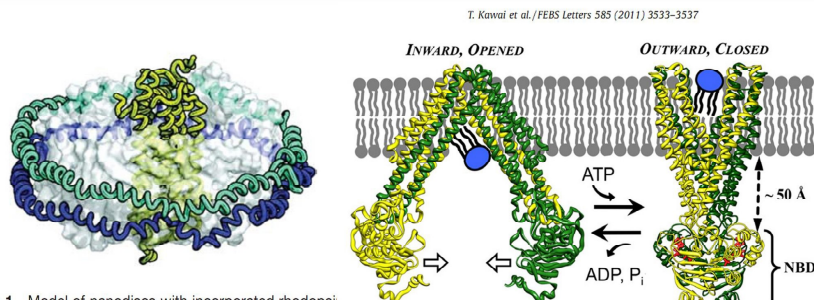
Free Electron Laser (FEL)



Nat Commun. 2015 Feb 11;6:5704. doi: 10.1038/ncomms6704.



## 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

[illegible]

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

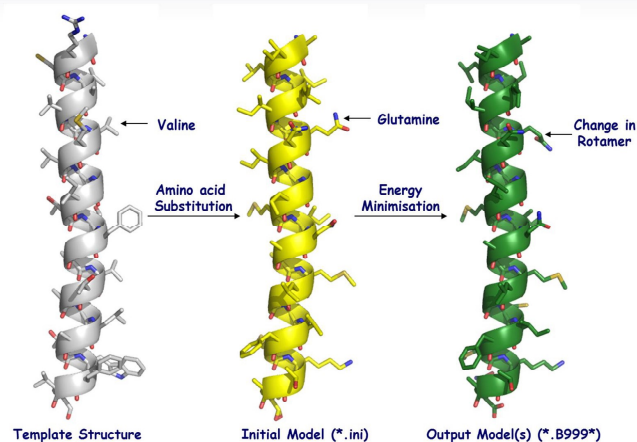
### Alignement – pl. ClustalW

2HYD -----MKRRLLQFVK-----PYKGLFASITVGVGKKRPMFLP  
35BX -----WQFIRFLWITVIR-----LYRGLGVVSTIALVINAADMTPI  
CFTR\_HUMAN MQRSPLEKASVSKLFFSWTRPILRKGYRQLLESDIYIPFSDNSADNLS

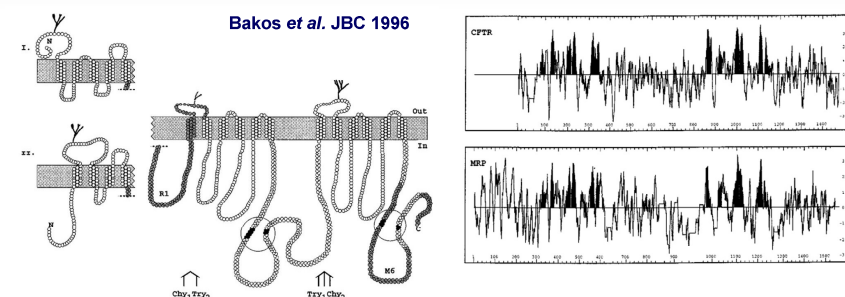
5 10 15 20 25 30 35

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

## Homológia modellezés II.



## Membránfehérjék topológiája





## Membrántopológia és TM hélixek predikciója

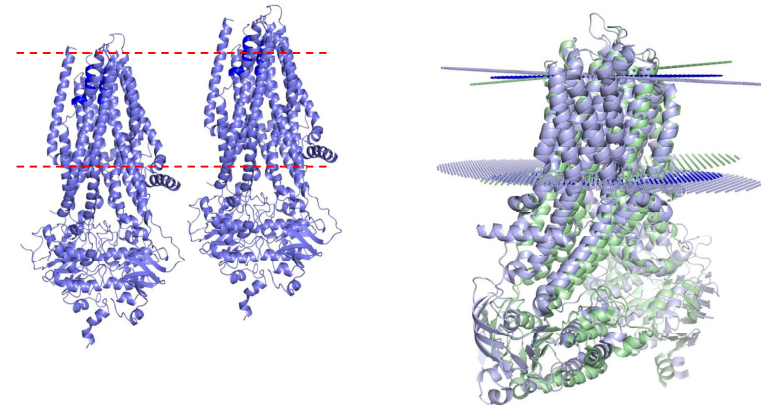
CCTOP.enzim.hu

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

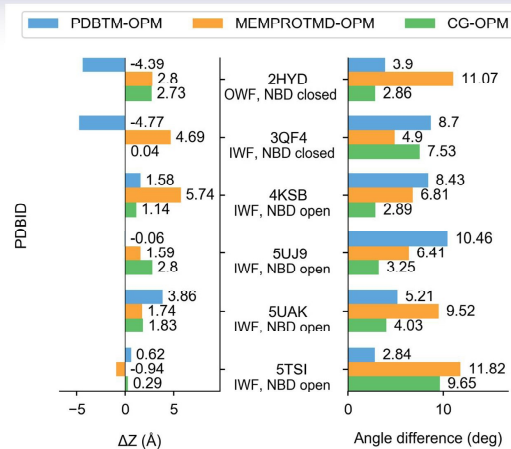
TMDet.enzim.hu

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

## Localization and tilting in a bilayer



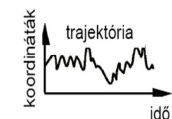
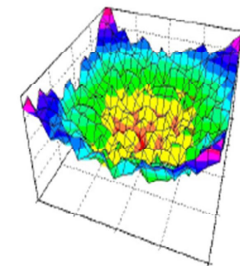
## Tilting and localization in a bilayer



## Molecular dynamics

### Molekuláris dinamika (MD)

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



## A „force field”

Baker (2007)

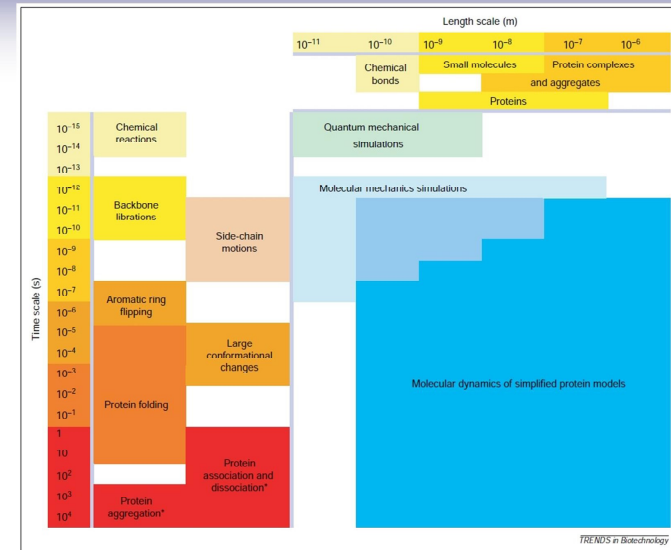
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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)

## Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

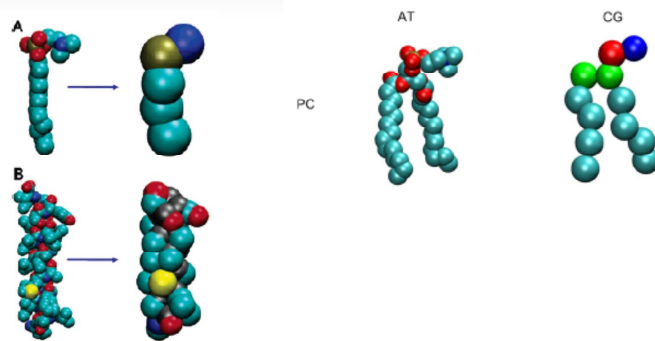
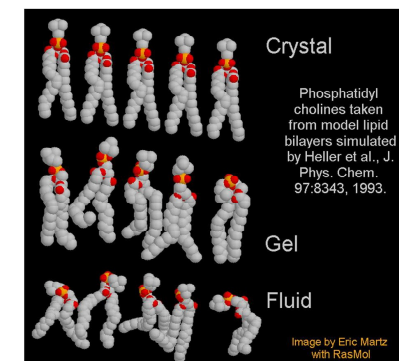
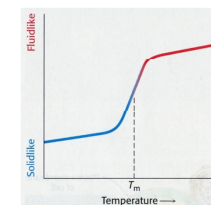


Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

Sansom, Oxford University  
Marrink, Groningen, MARTINI force field

## A membrán fluiditása, fázisátmenetei

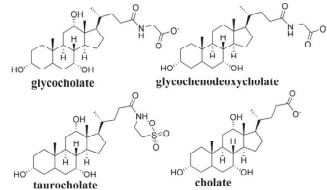
1. Hőmérséklet
  2. Összetétel
- fázisátalakulás
- > láncossz
  - > *cis*-kötések
  - > koleszterin



## 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) 570–592

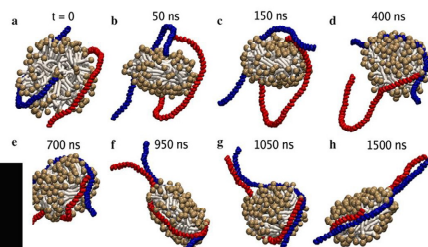
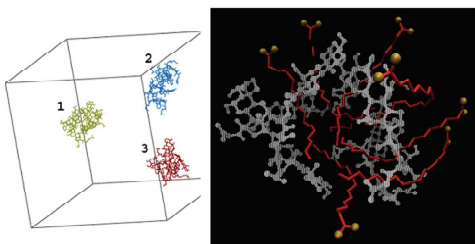
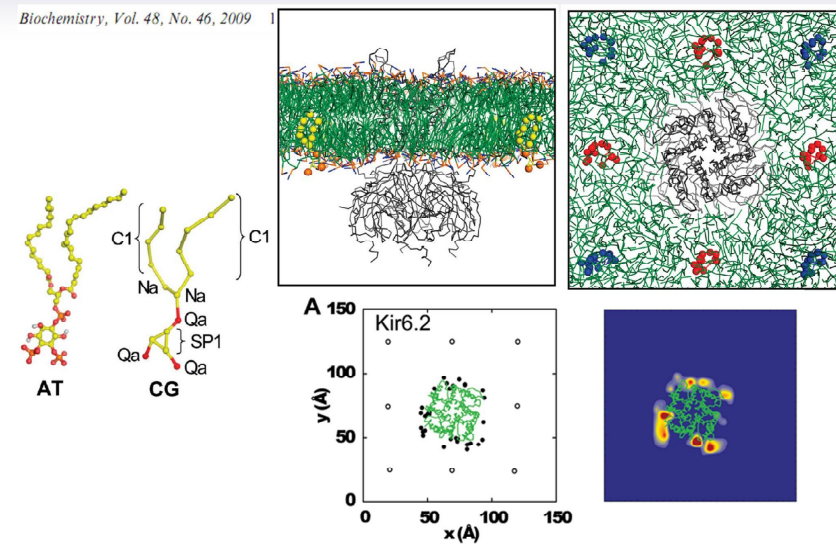


Figure 1. Chemical structures of the four common bile salts: glycocholate, glychenodeoxycholate, taurocholate, and cholate.

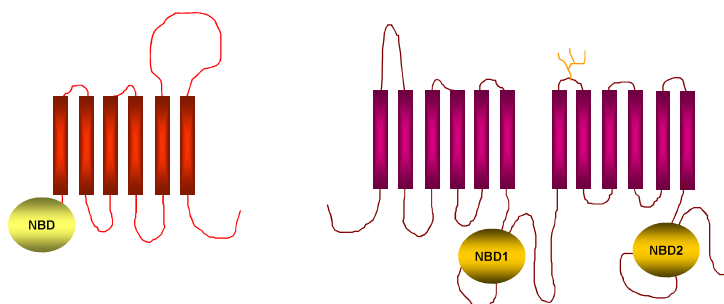


## PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

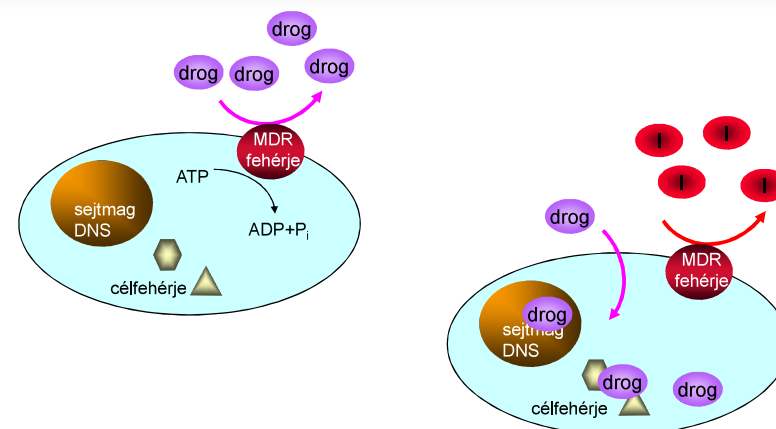
*Biochemistry*, Vol. 48, No. 46, 2009



## ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék

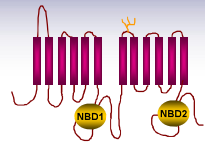


## A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése

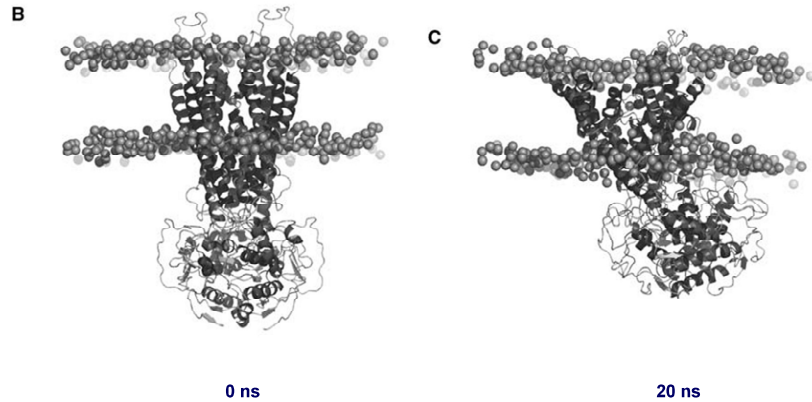




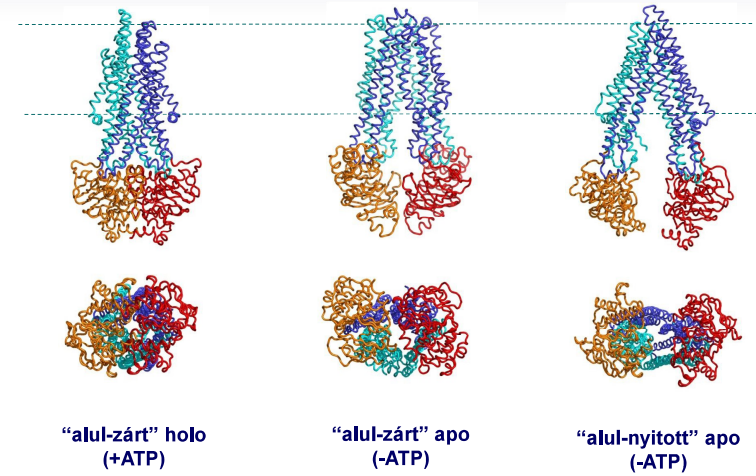
## Fehérjék konformációinak stabilitása



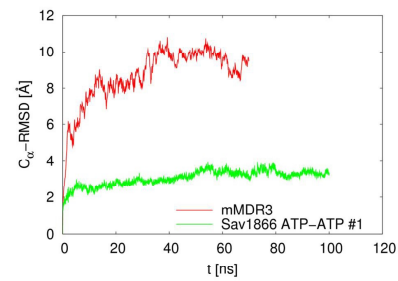
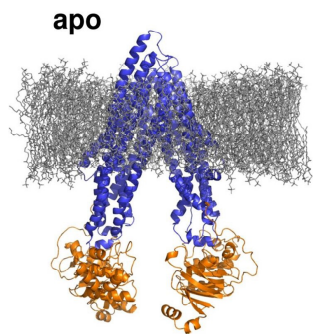
Eur Biophys J (2008) 37:403–409



## ABC fehérjék konformációi

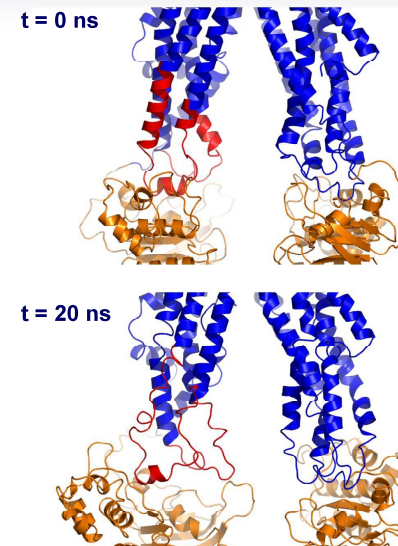


## Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil



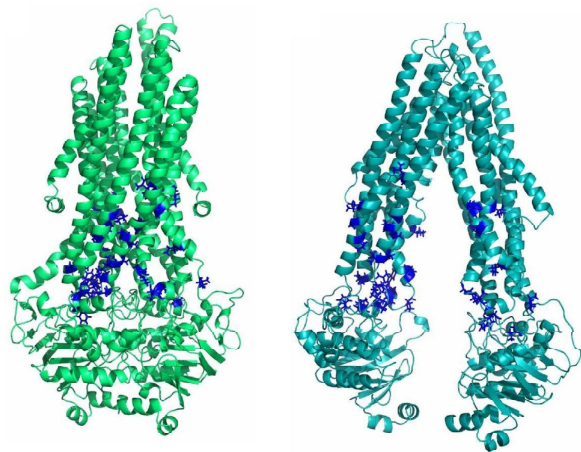
Gyimesi *et al.* BBA 2012

## 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%

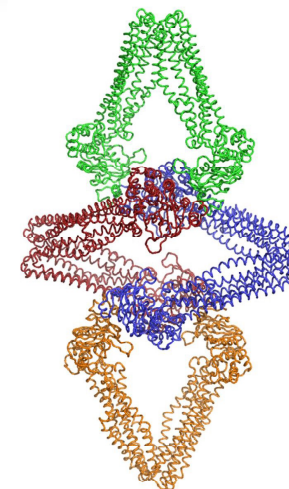
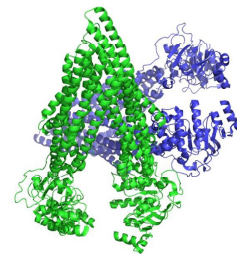
## Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre



## Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U

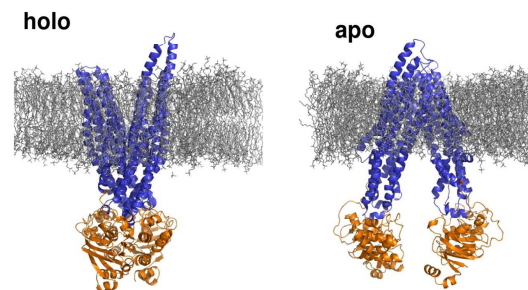
MsbA, PDBID:3B5W



## 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



hMDR1 homologia modell

molekuláris dinamika  
trajektóriák



Esszenciális  
dinamika

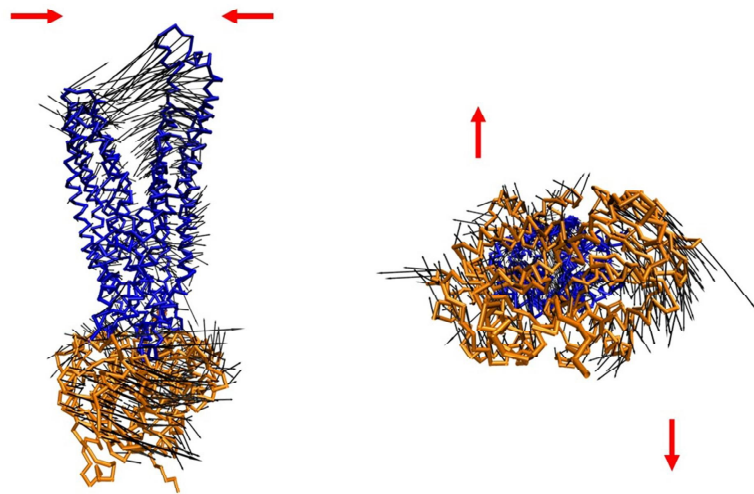


módus kiválasztás



kollektív mozgások

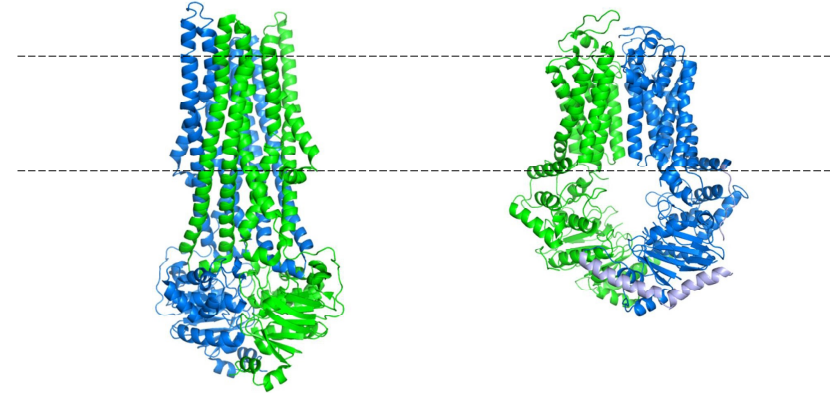
## Zárt-nyitott átmenet



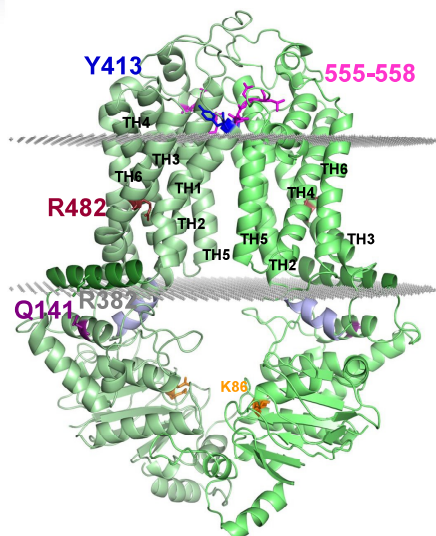
## ABCG alcsalád - Type II

Type I +ATP

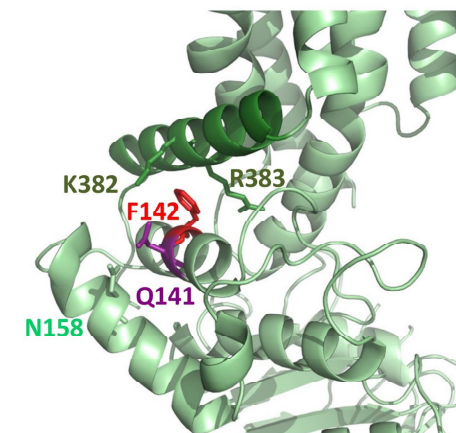
ABCG5-ABCG8



## Az ABCG2 modell



## A Q141 helyzete

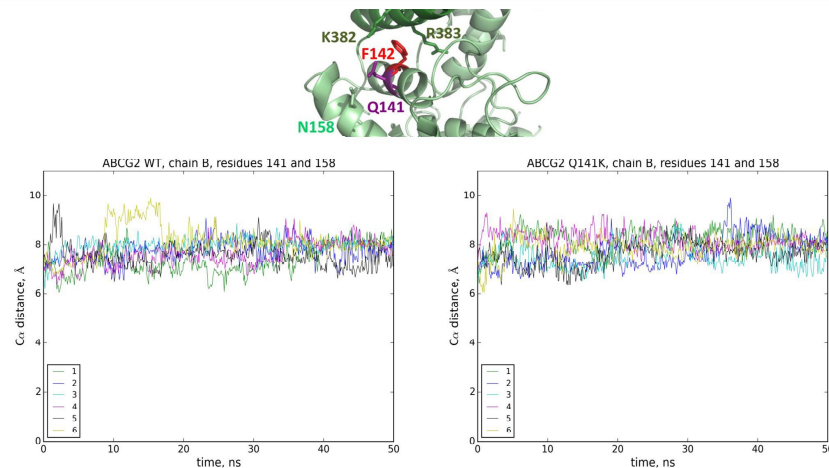




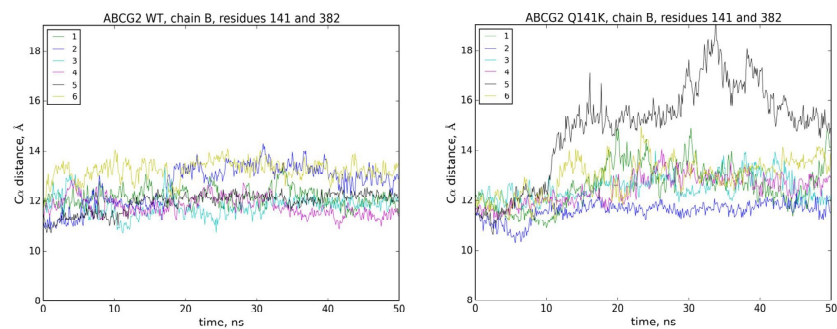
## Molekuláris Dinamikai (MD) szimulációk

- 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)

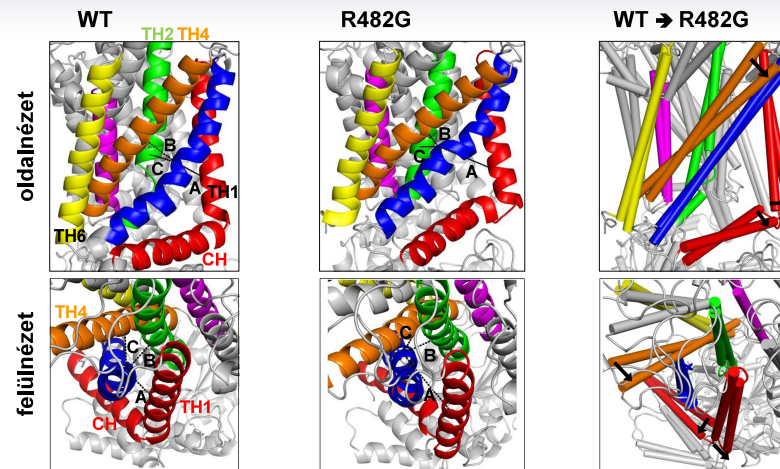
## Q141K csere hatása a 141/158 kölcsönhatásra



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



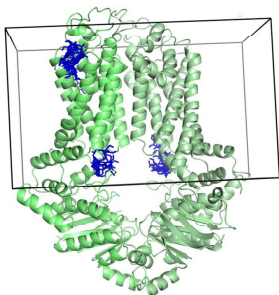
## Az R482G által okozott változások



## 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)

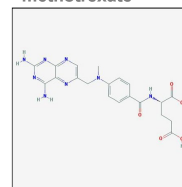


## Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

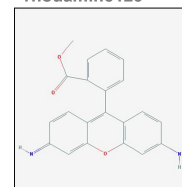
AutoDock Vina

- 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

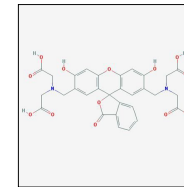
methotrexate



rhodamine123



calcein



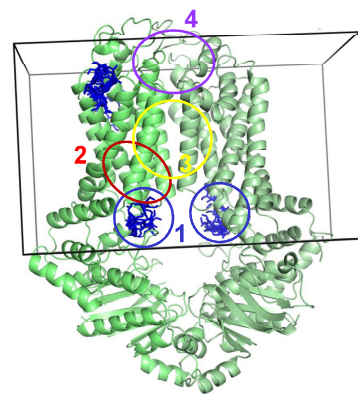
## Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

AutoDock Vina

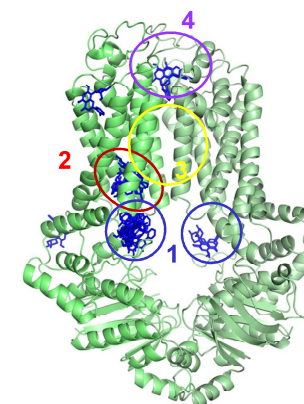
- Fix fehérje, flexibilis ligand
- Több konformáció (6 db, egyensúlyba hozott)
- Doboz; ligand odapróbálása nagyon sokszor (ebből 20/futás)
- Mindent oda lehet dokkolni... ezért szubsztrát + nemszubsztrát
- (6 ABCG2 konformáció) \* (20 pozitúra) \* (3 párhuzamos) \*  
(25 szubsztrát + 14 nem-szubsztrát)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

## Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

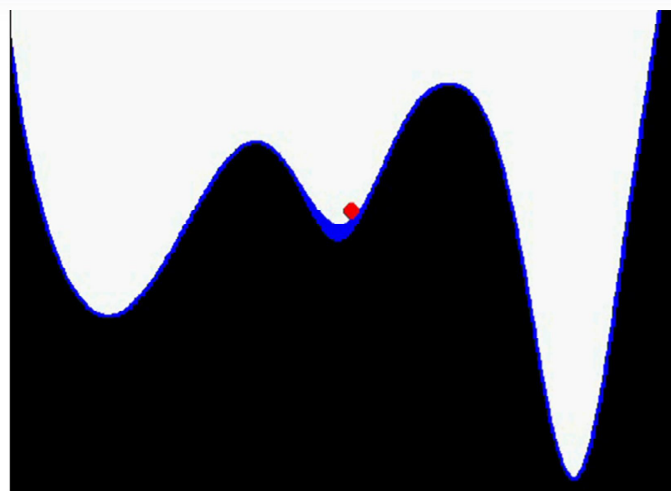
verapamil



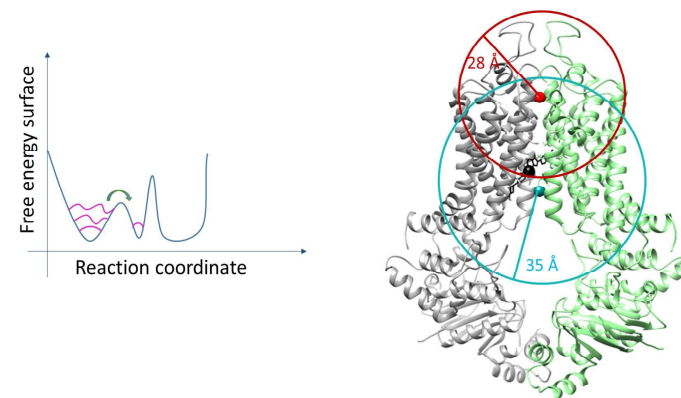
flavopiridol



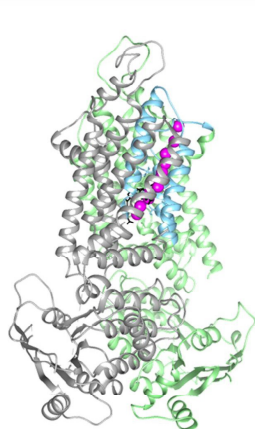
## Metadinamika



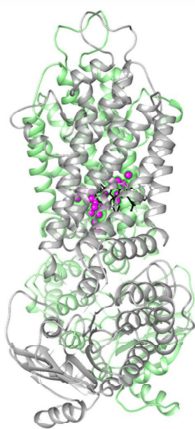
## Transzport útvonalak feltérképezése metadinamikával



## Transzport útvonalak feltérképezése metadinamikával

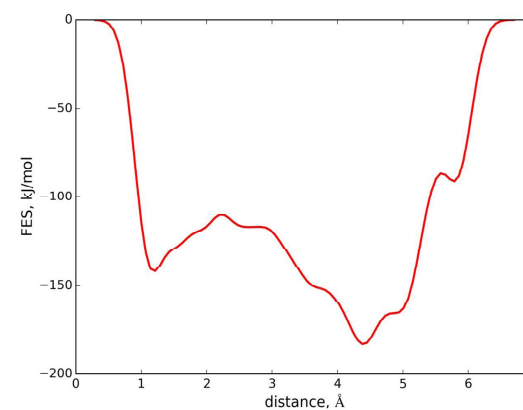


methotrexate



calcein

## FES - Free Energy Surface





## Cisztás fibrózis, CFTR fehérje

