

# Fehérjék szerkezete és dinamikája

Hegedűs Tamás

tamas@hegelab.org

MTA-SE Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport  
SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



Jellemezze a biopolimereket a perzisztenciahossz és kontúrhossz arányaik alapján!

5 perc

## Köszönetnyilvánítás

Tordai Hedvig  
Csizmadia Georgina  
Farkas Bianka

PPKE, ITK  
Tóth Ágota

Kellermayer Miklós  
Sarkadi Balázs

NKFIH K 111678



## 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)

## Mai témák

- Fehérjék szerkezetek jóslása és meghatározása
- Fehérjék dinamikájának modellezése
- Összetett modellezés az ABC fehérjéken bemutatva
  - ABCG2 multi-drog transzporter
  - CFTR klorid csatorna

## Másodlagos szerkezeti elemek predikciója

Megoldott szerkezetekből minden aminosavra meghatározott  
*helix,  $\beta$ -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](#)

## Harmadlagos szerkezet jóslása

*Ab initio* folding

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

„Threading”, fold recognition

Homológia modellezés

- feltételezi: konzervált szekvencia == konzervált struktúra
- > 30% hasonlóság
- összeillesztés jósága a meghatározó

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

[illegible]

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

### Alignement – pl. ClustalW

```

2HYD      -----MIKRYLQVVK-----PYKYRIFATIIVGIIKFGIPMLIP
3B5X      -----WQTFKRLWTYIR-----LYKAGLVVSTIALVINAADTYMI
CFTR_HUMAN MQRSPLEKASVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDSADNLS
           *               *               *               *

```

Figure 1 illustrates the workflow of the template-based protein structure prediction pipeline. The process begins with a **Template Structure** (grey ribbon), which undergoes **Amino acid Substitution** to generate an **Initial Model (\*.ini)** (yellow ribbon). This initial model then undergoes **Energy Minimisation** to produce the final **Output Model(s) (\*.B999\*)** (green ribbon). The workflow is shown for a protein structure, with specific residues labeled: Valine, Glutamine, and a Change in Rotamer.

forrás: SBCB, Oxford, UK

crystal

x-rays

diffraction pattern

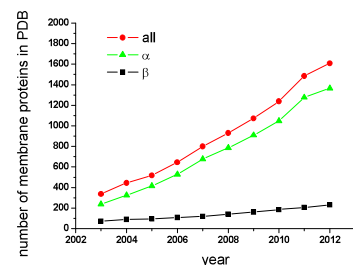
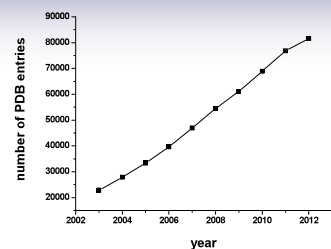
phases

electron density map

fitting

atomic model

refinement

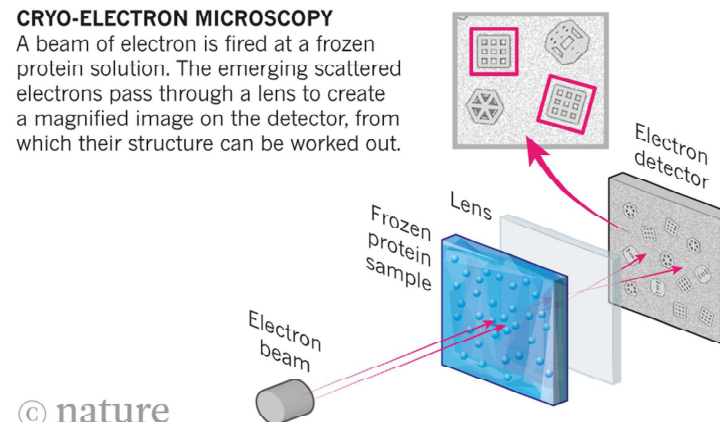


pdbtm.enzim.hu, Tuds nád y Gábor

## 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.

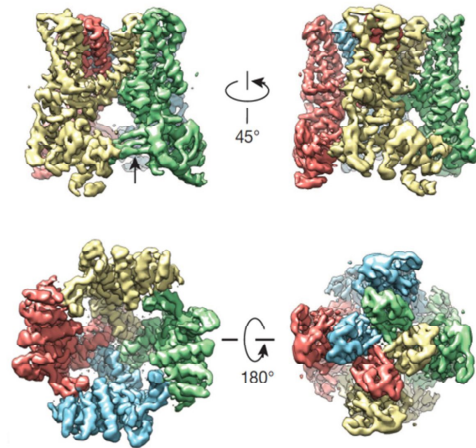


© nature

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

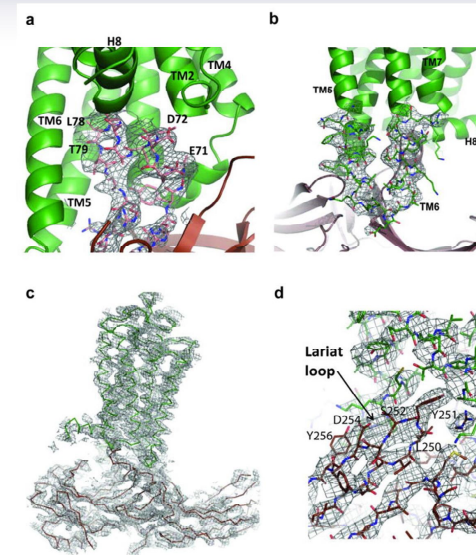
## Szerkezet meghatározás – „single particle”

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)

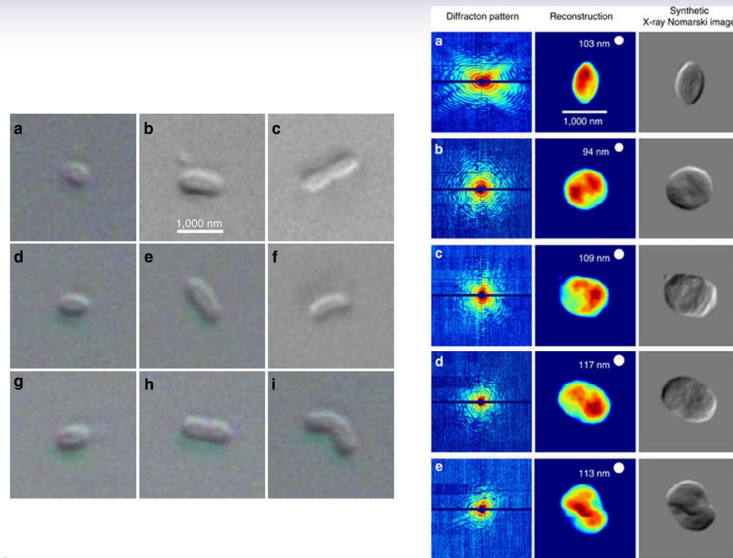


Nature. 2015 Jul 30;523(7562):561-7.

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

## Szerkezet meghatározás – „teljes sejt”

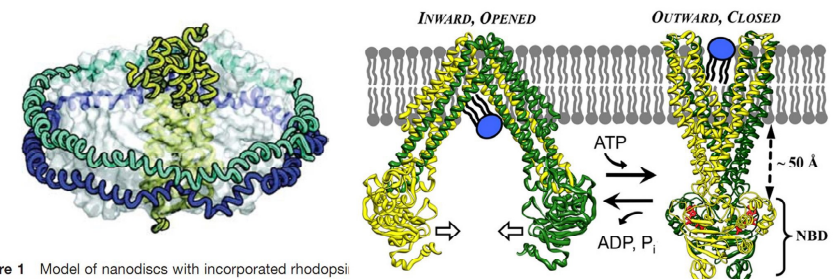
Free Electron Laser (FEL)



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

## Membránfehérjék nanodisc-ben

T. Kawai et al./FEBS Letters 585 (2011) 3533–3537



**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).



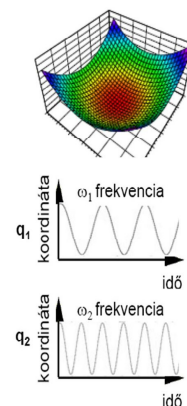
## Mai témák

- Fehérjék szerkezetek jóslása és meghatározása
- Fehérjék dinamikájának modellezése
- Összetett modellezés az ABC fehérjéken bemutatva
  - ABCG2 multi-drug transzporter
  - CFTR klorid csatorna

## Fehérjék dinamikájának vizsgálata

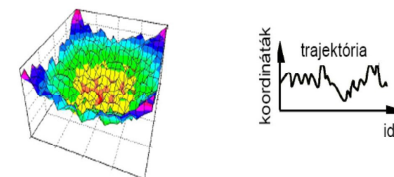
### Normál-módus elemzés

- 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)

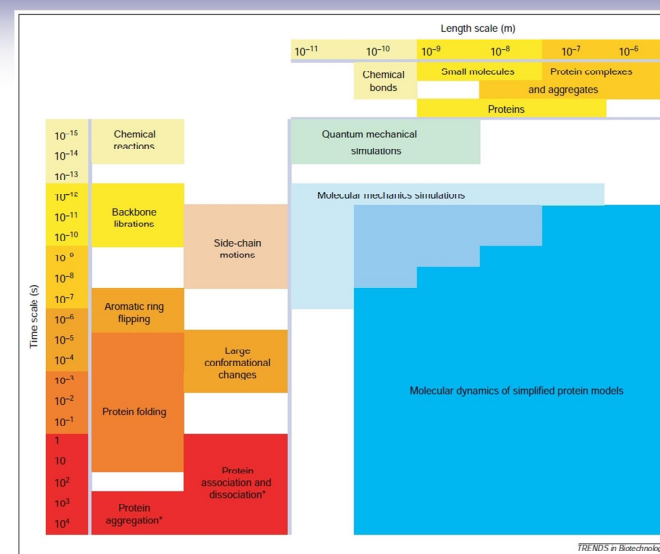
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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

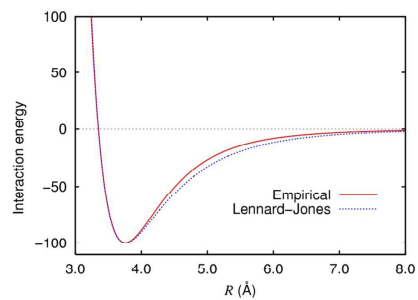
	Water	Chex		Water	Chex
CR	-0.890	-1.350	NH3	-20.000	-1.145
CH1E	-0.187	-0.645	NC2	-10.000	-0.200
CH2E	0.372	-0.720	N	-1.000	-1.145
CH3E	1.089	-0.665	OH1	-5.920	-0.960
CR1E	0.057	-0.410	O	-5.330	-1.270
NH1	-5.950	-1.145	OC	-10.000	-0.900
NR	-3.820	-1.630	S	-3.240	-1.780
NH2	-5.450	-1.145	SH1E	-2.050	-1.855

## „Események” időskálája

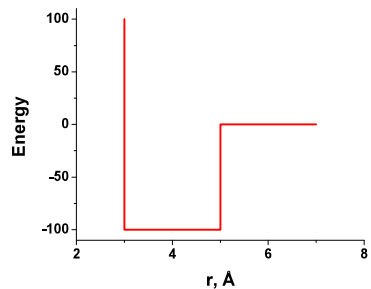


F. Ding and N.V. Dokholyan, TRENDS in Biotechnology, 23:450 (2005)

## Diszkrét Molekuláris Dinamika (DMD)



wikipedia



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

## Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

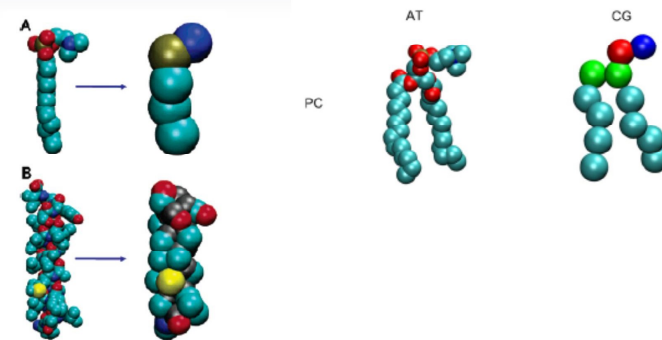
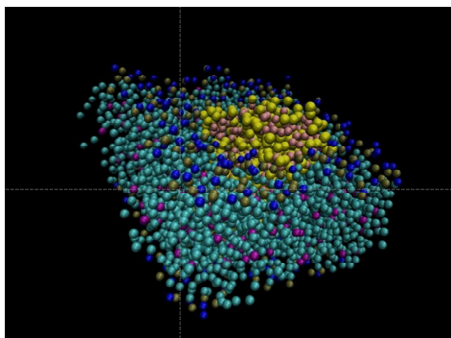


Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

Sansom, Oxford University  
Marrink, Groningen, MARTINI force field

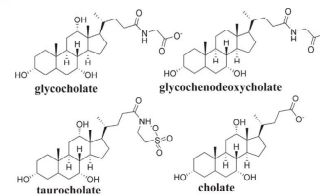
## Kettősréteg felépülése a fehérje köré



## Lipid struktúrák összeszerelődése

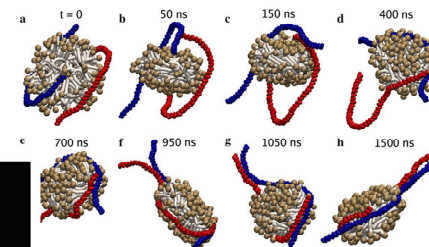
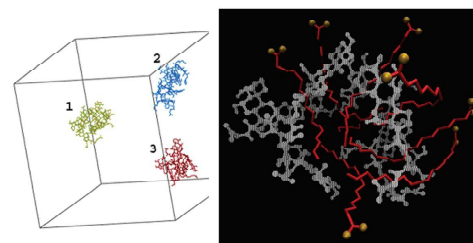
Molecular dynamics simulations of  
glycocholate-oleic acid mixed micelle assembly.

Langmuir 2010, 26(7), 4687–4692



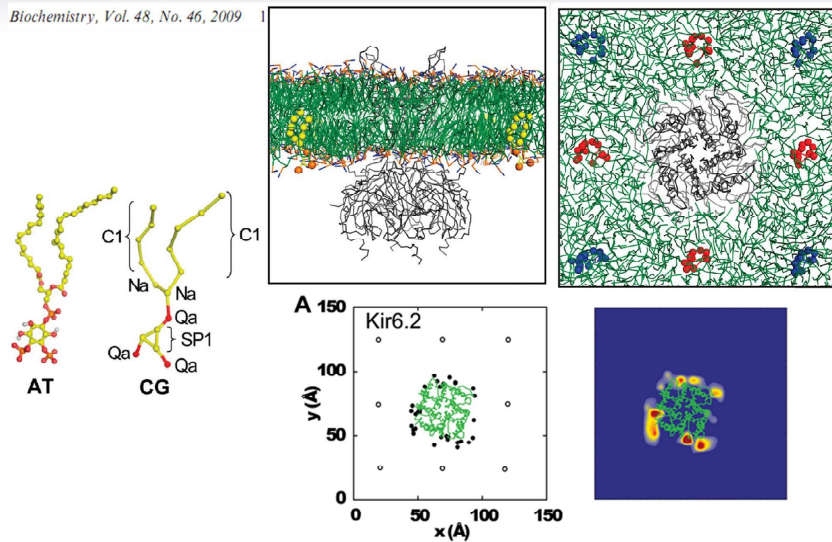
A.Y. Shih et al. / Journal of Structural Biology 157 (2007) 579–592

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



## PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

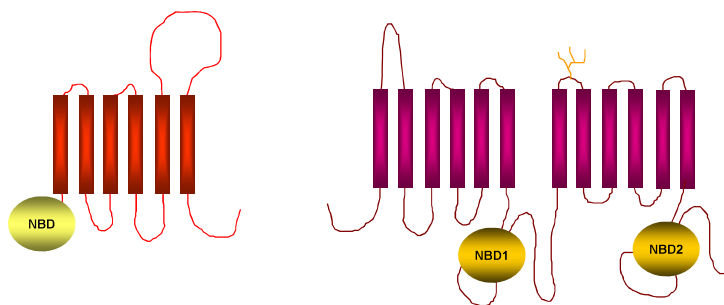
Biochemistry, Vol. 48, No. 46, 2009 1



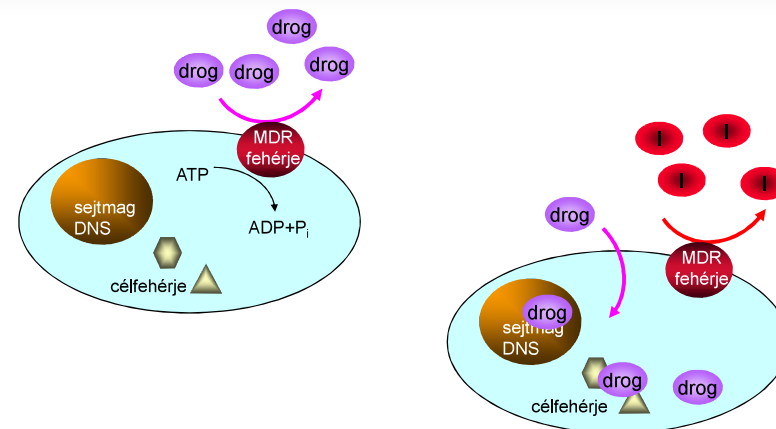
## Mai témák

- Fehérjék szerkezetek jóslása és meghatározása
- Fehérjék dinamikájának modellezése
- Összetett modellezés az ABC fehérjéken bemutatva
  - ABCG2 multi-drog transzporter
  - CFTR klorid csatorna

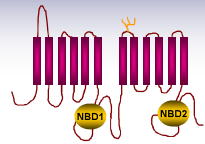
## ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



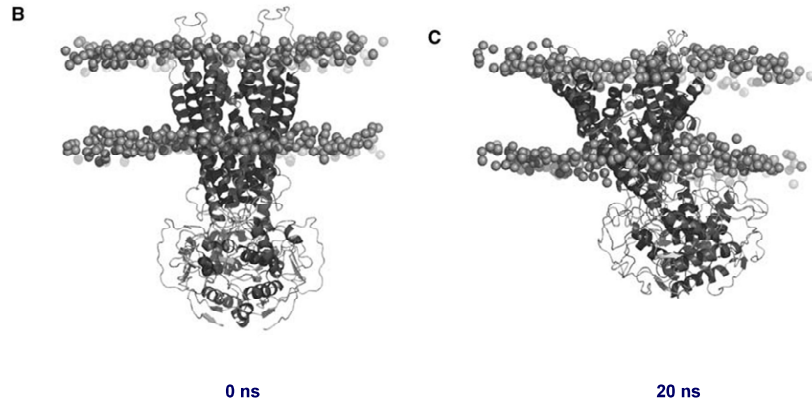
## A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése



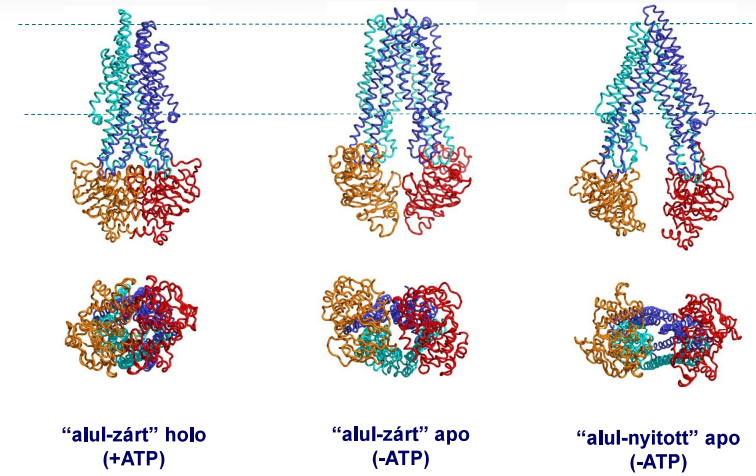
## Fehérjék konformációinak stabilitása



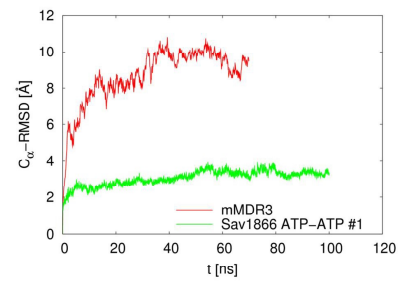
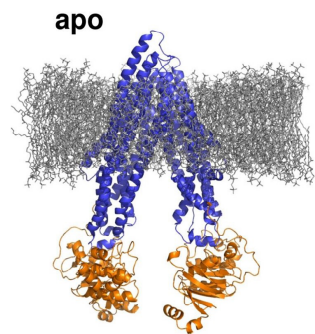
Eur Biophys J (2008) 37:403–409



## ABC fehérjék konformációi

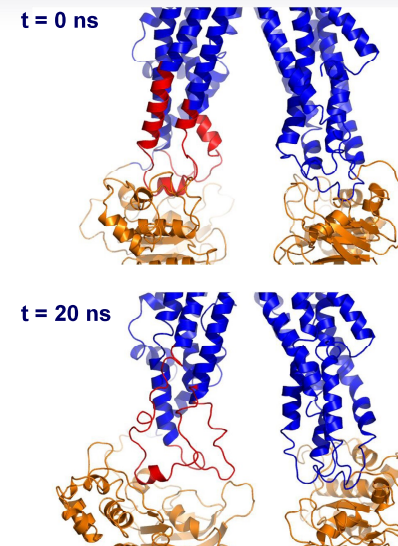


## Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil



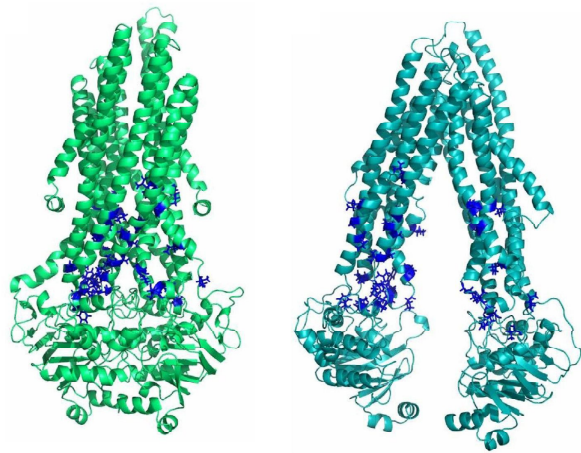
Gyimesi *et al.* BBA 2012

## 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%

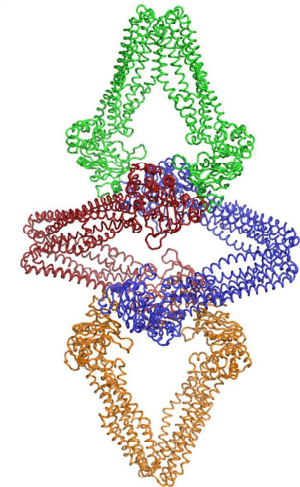
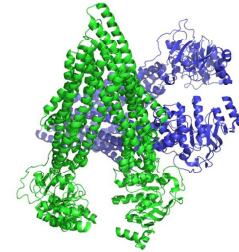
## Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre



## Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U

MsbA, PDBID:3B5W



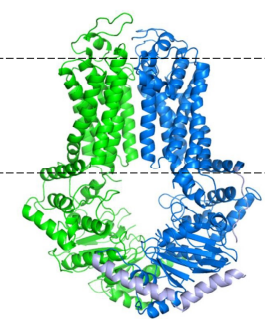
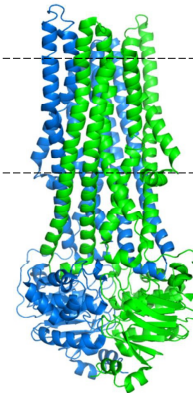
## Mai témák

- Fehérjék szerkezetek jóslása és meghatározása
- Fehérjék dinamikájának modellezése
- Összetett modellezés az ABC fehérjéken bemutatva
  - ABCG2 multi-drog transzporter
  - CFTR klorid csatorna

## ABCG alcsalád - Type II

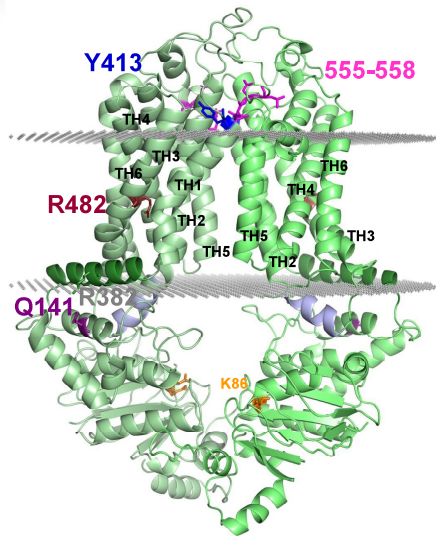
Type I +ATP

ABCG5-ABCG8

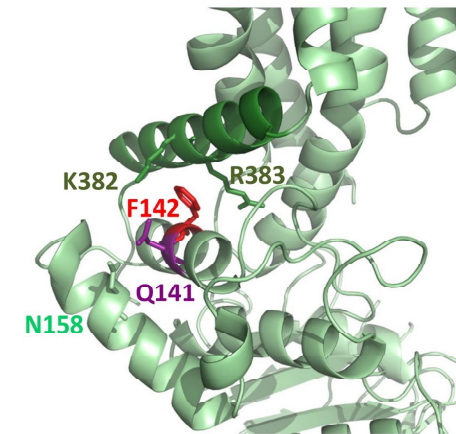




## Az ABCG2 modell



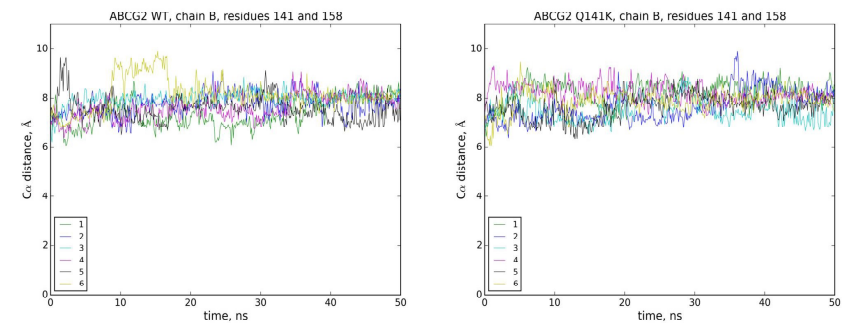
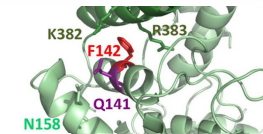
## A Q141 helyzete



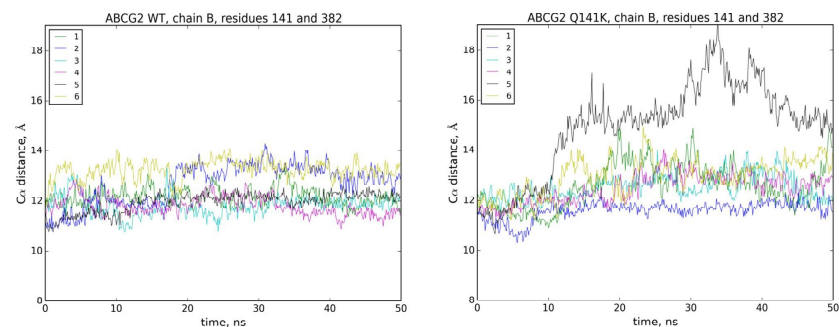
## Molekuláris Dinamikai (MD) szimulációk

- 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



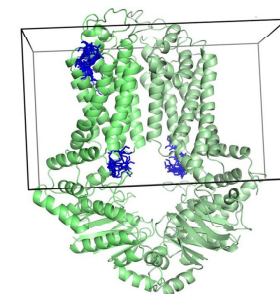
## A Q141K hatása a 141/382 (NBD/TMD) kapcsolatra



## Drogtő 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)

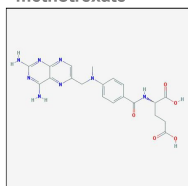


## Drogtő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

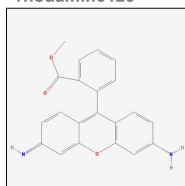
AutoDock Vina

- 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

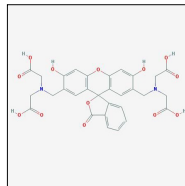
methotrexate



rhodamine123



calcein



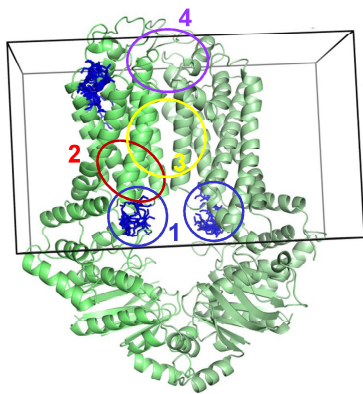
## Drogtő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

AutoDock Vina

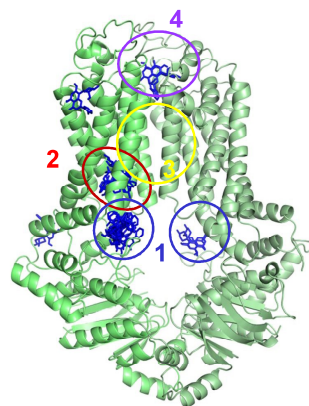
- Fix fehérje, flexibilis ligand
- Több konformáció (6 db, egyensúlyba hozott)
- Doboz; ligand odapróbálása nagyon sokszor (ebből 20/futás)
- Mindent oda lehet dokkolni... ezért szubsztrát + nemszubsztrát
- (6 ABCG2 konformáció) \* (20 pozitúra) \* (3 párhuzamos) \*  
(25 szubsztrát + 14 nem-szubsztrát)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

## Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

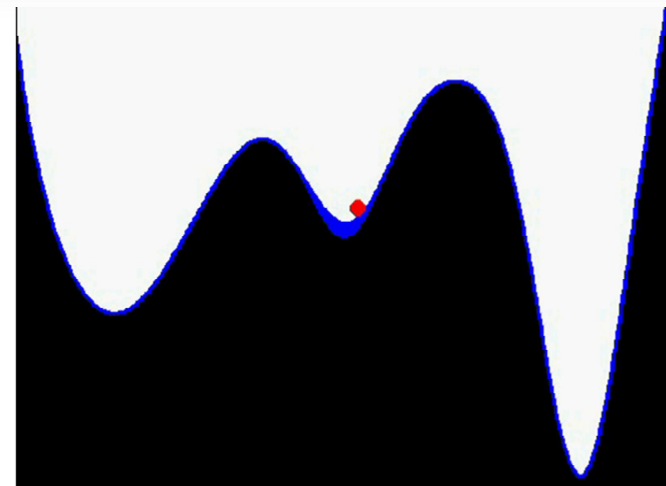
verapamil



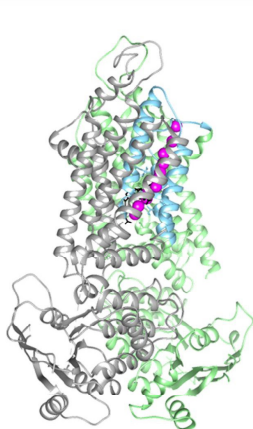
flavopiridol



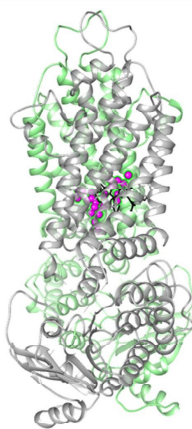
## Metadinamika I.



## Transzport útvonalak feltérképezése metadinamikával

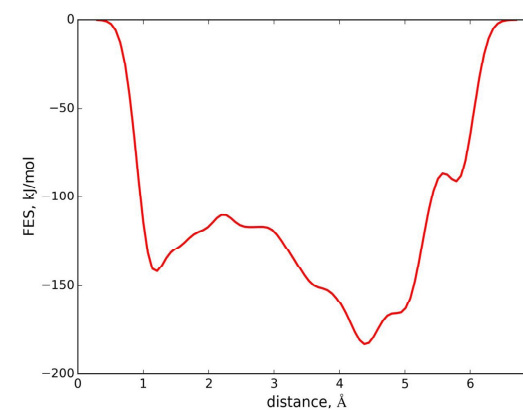


methotrexate



calcein

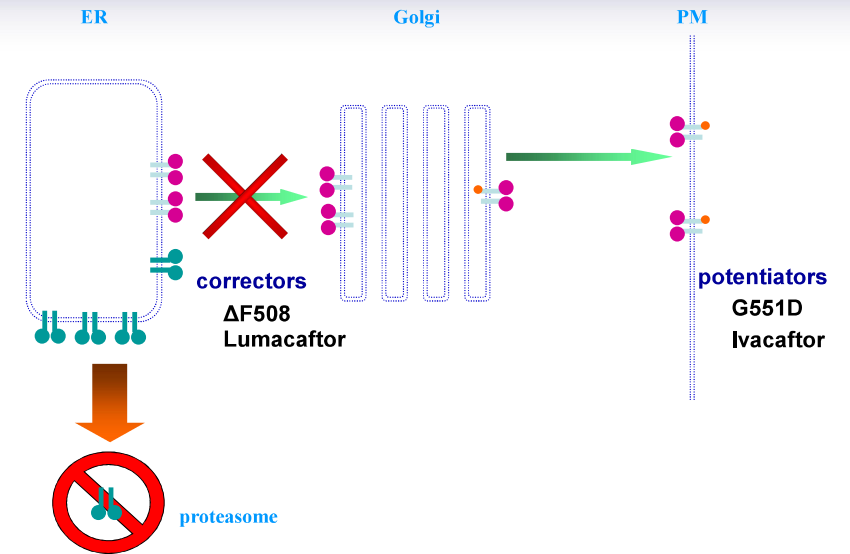
## FES - Free Energy Surface



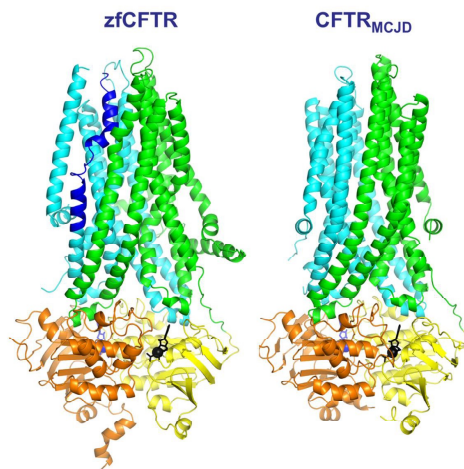
## Mai témák

- Fehérjék szerkezetek jóslása és meghatározása
- Fehérjék dinamikájának modellezése
- Összetett modellezés az ABC fehérjéken bemutatva
  - ABCG2 multi-drog transzporter
  - CFTR klorid csatorna

## Cisztás fibrózis, CFTR fehérje

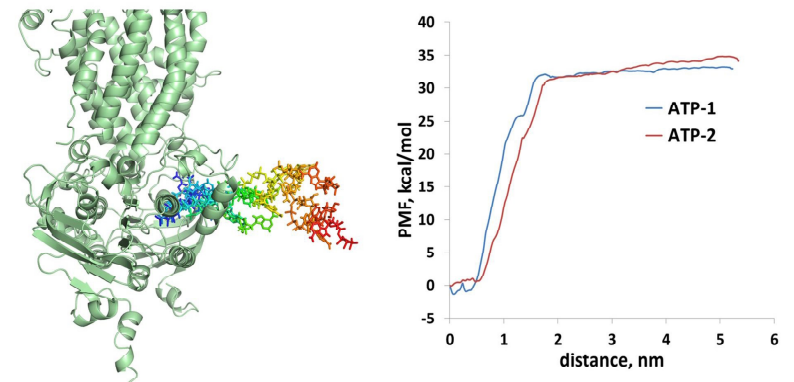


## The gating of the CFTR chloride channel

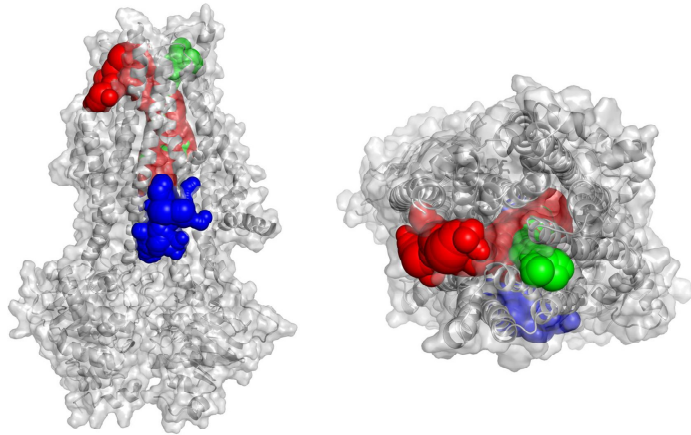


## Free energies of ATP-binding are the same at site-1&2

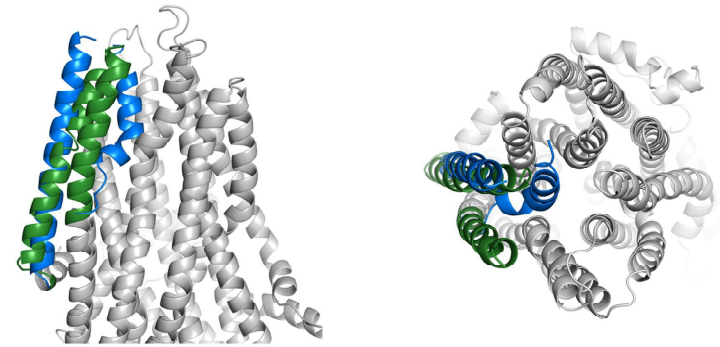
Paragi G. és mtsi, Szeged



## Where is the channel? Caver



## Modeling the broken TM8 of CFTR based on the MRP1 structure



## Where is the channel?

