

# 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

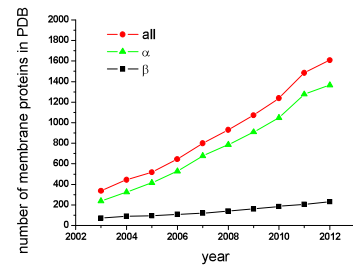
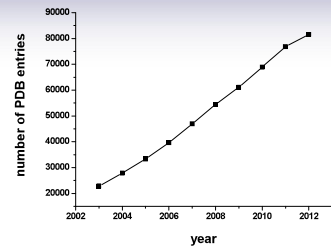
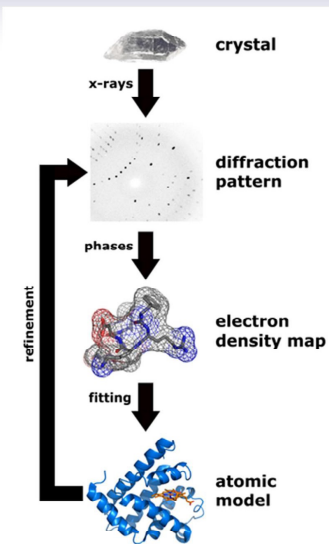
Atomi szintű információt ad mozgásokról.

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”

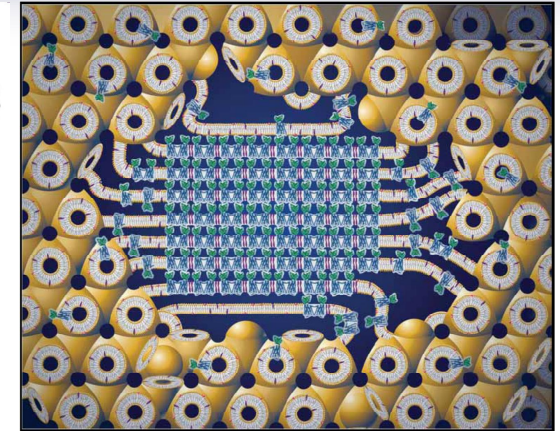
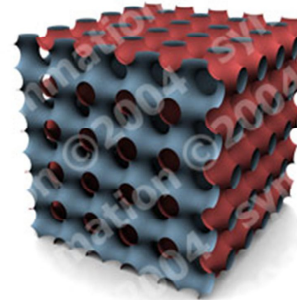
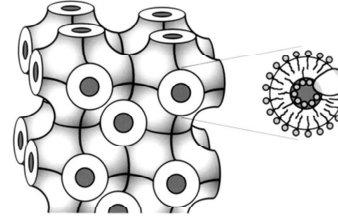
## Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



pdbtm.enzim.hu, Tudsány Gábor

## Szerkezet meghatározás – cubic phase

monoolein/water

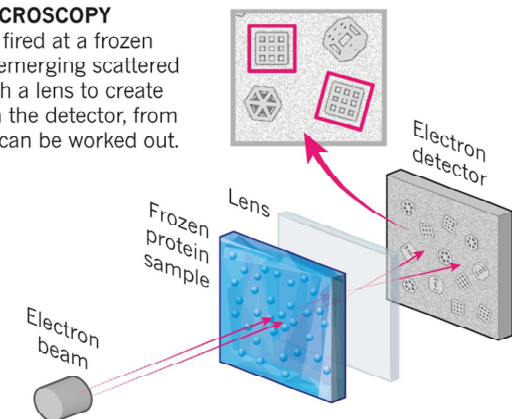


## Szerkezet meghatározás – „single particle”

Cryo-electron microscopy

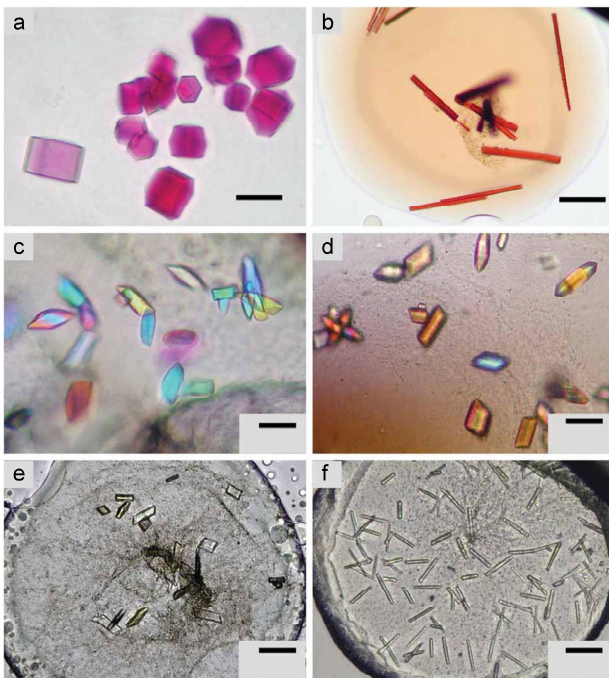
### CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

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

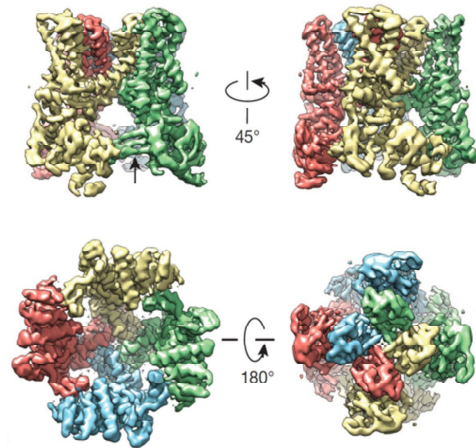


Crystals of membrane proteins growing in the lipidic mesophase.

- (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*

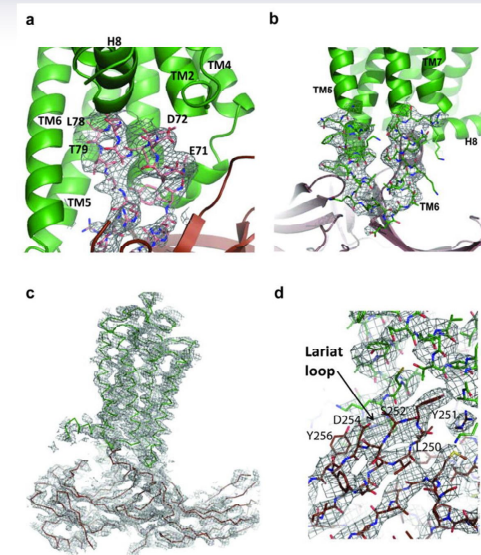
## Szerkezet meghatározás – „single particle”

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)

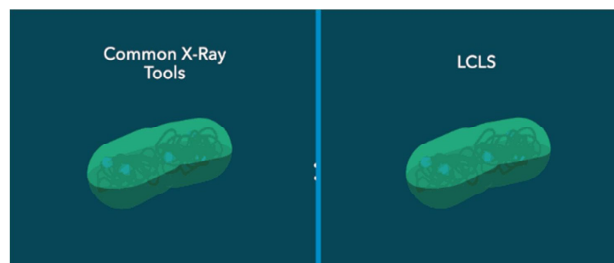


Nature. 2015 Jul 30;523(7562):561-7.

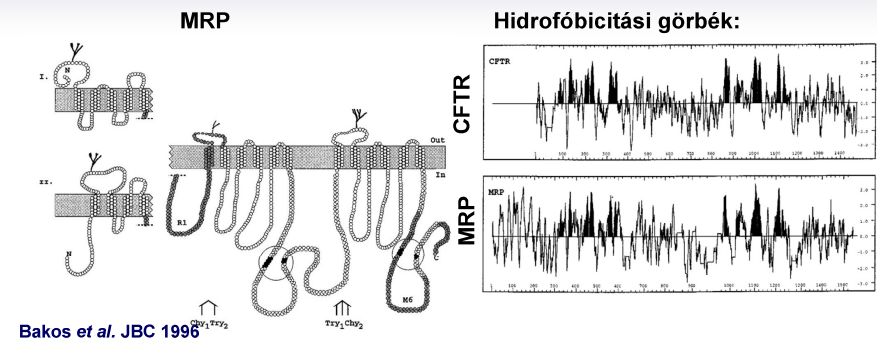
Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser.

## Szerkezet meghatározás – „teljes sejt”

Free Electron Laser (FEL)



## Membránfehérjék topológiája



Bakos et al. JBC 1996

CFTR topológiája kísérletekből ismert  
Chang et al. J Biol Chem. 1994 Jul 15;269(28):18572-5

Kísérletes topológia meghatározási módszerek:

- tag – felismerés
- Cys hozzáférhetőség

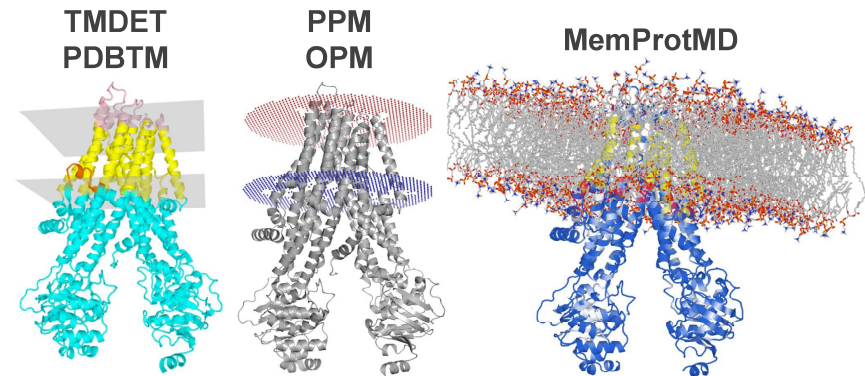
## Membrántopológia és TM hélixek predikciója szekvencia alapján

pl. CCTOP.enzim.hu

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

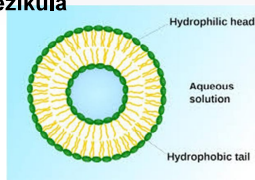
## TM hélixek predikciója szerkezet alapján

1. „water accessible area”, lipid kettősréteg lehetséges helye, pontozás – fitness függvény
2. molekula dinamika szimulációk

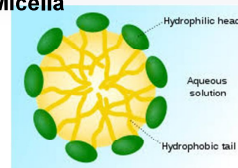


## Membrán mimetikumok / membrane mimetics

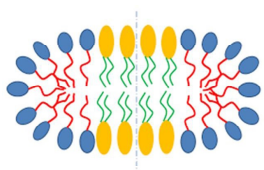
Vezikula



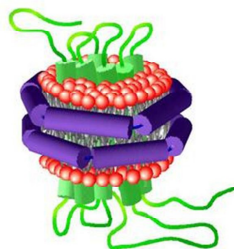
Micella



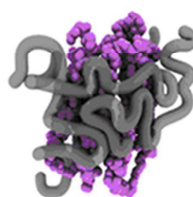
Bicella



Nanodisc

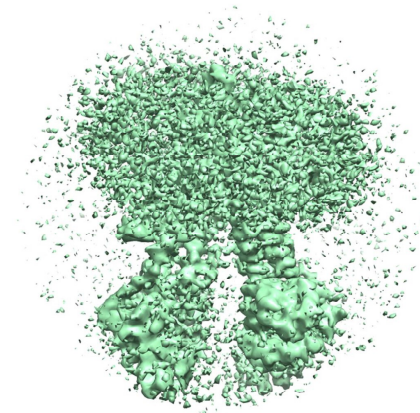


Amphipol

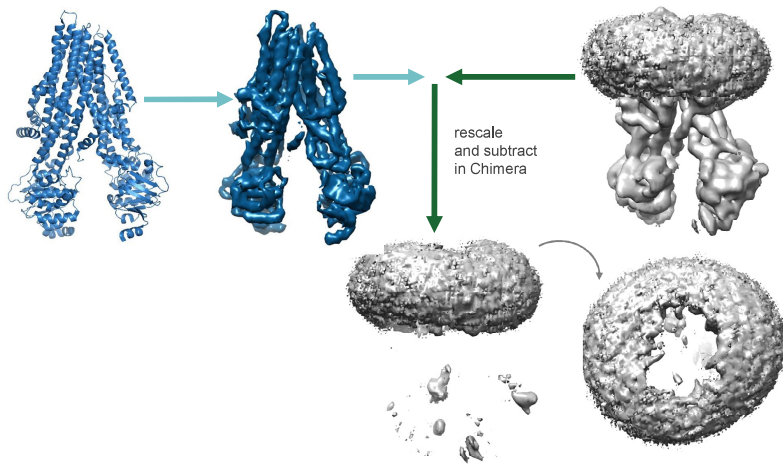


Membrane embedment data is in the electron density maps

CFTR (PDBID: 5UAK) EMD

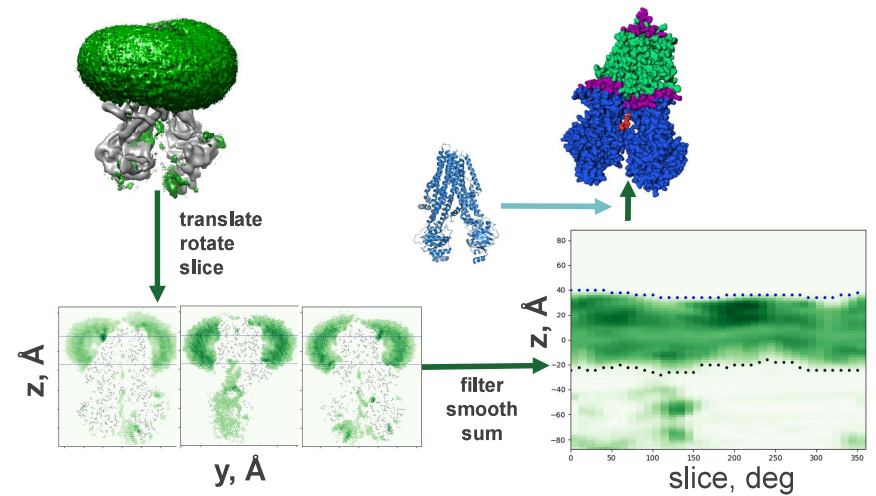


A membrane blob can be extracted from the electron density map



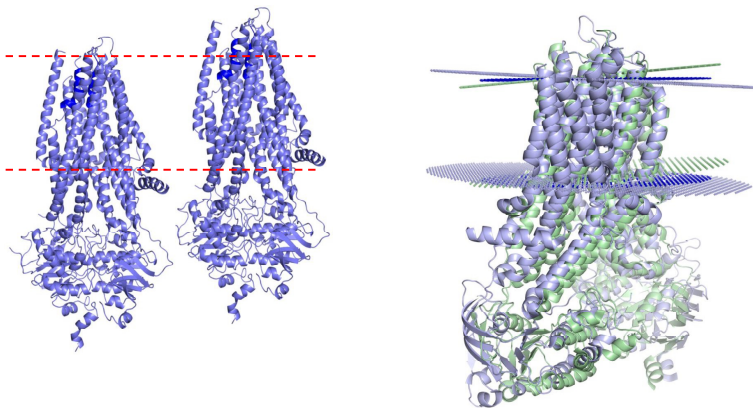
<http://memblob.hegelab.org>

The MemBlob can be converted to membrane boundaries

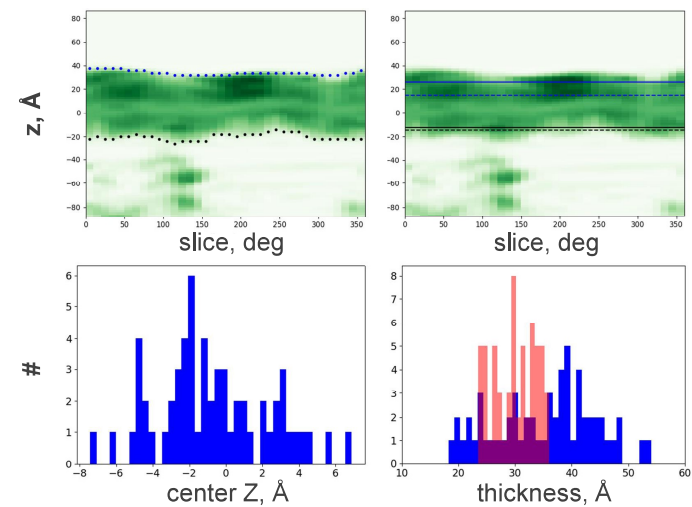


<http://memblob.hegelab.org>

Localization and tilting in a bilayer

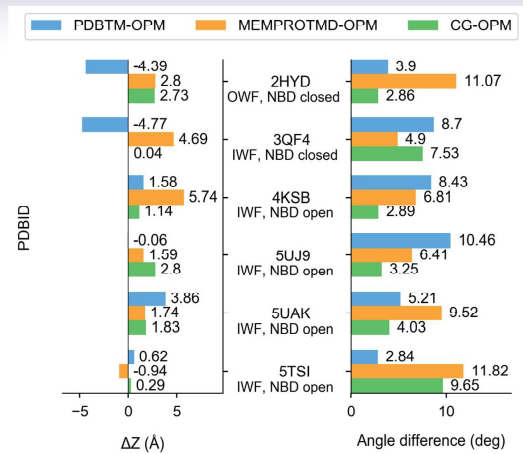


The deeper embedment could protect the protein



<http://memblob.hegelab.org>

## Tilting and localization in a bilayer



## Homológia modellezés I.

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

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

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

### Alignement – pl. ClustalW

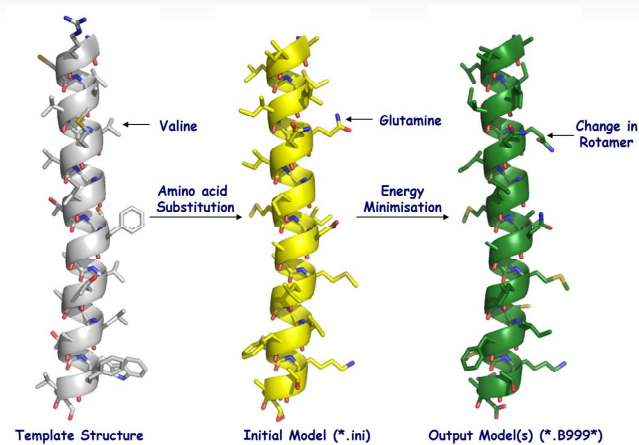
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

2HYD      -----MIKRYLQPVK-----PYKIRIFATIIVGIIKFGIPMLIP
3B5X      -----WQTFKRLWTYIR-----LYKAGLVVSTIALVINAAADTFMI
CFTR_HUMAN MQRSPLEKASVSVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLSDIYQIPVSDADNLS
              *      :      :      :      :      :      :
              5      10     15     20     25     30     35
M I K R Y L Q P V K - - - - - P Y K I R I F A T I I V G I I K F G I P M L I P
- - - - - W Q T F K R L W T Y I R - - - - - L Y K A G L V V S T I A L V I N A A A D T F M I
M Q R S P L E K A S V S V S K L F F S W T R P I L R K G Y R Q R L S D I Y Q I P V S D A D N L S

```

## Homológia modellezés II.

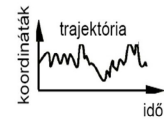
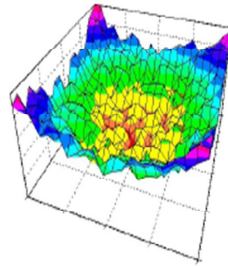


Van szerkezet, mozgassuk meg!

# Molecular dynamics

## Molekuláris dinamika (MD)

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



## A „force field”

Baker (2007)

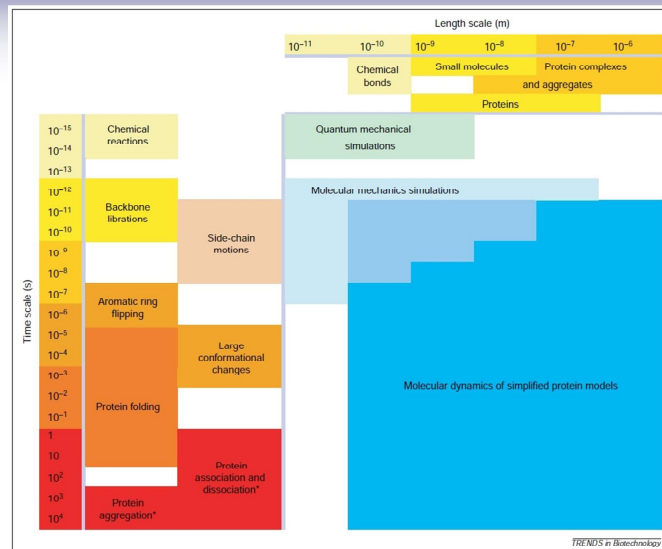
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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

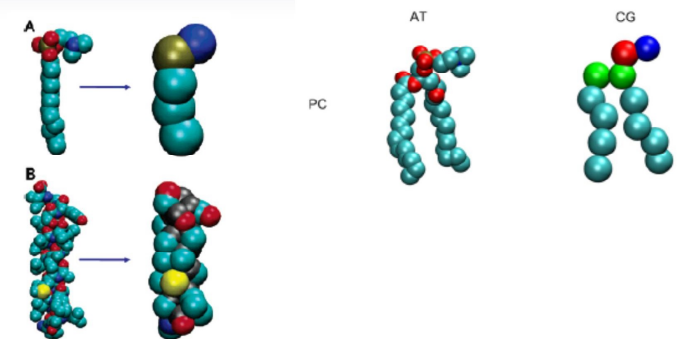


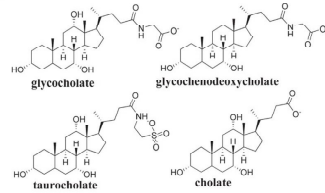
Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

Sansom, Oxford University  
Marrink, Groningen, MARTINI force field

## Lipid struktúrák összeszerelődése

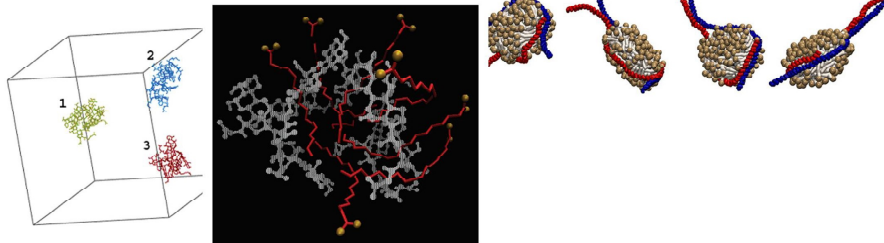
Molecular dynamics simulations of  
glycocholate-oleic acid mixed micelle assembly.

*Langmuir* 2010, 26(7), 4687–4692



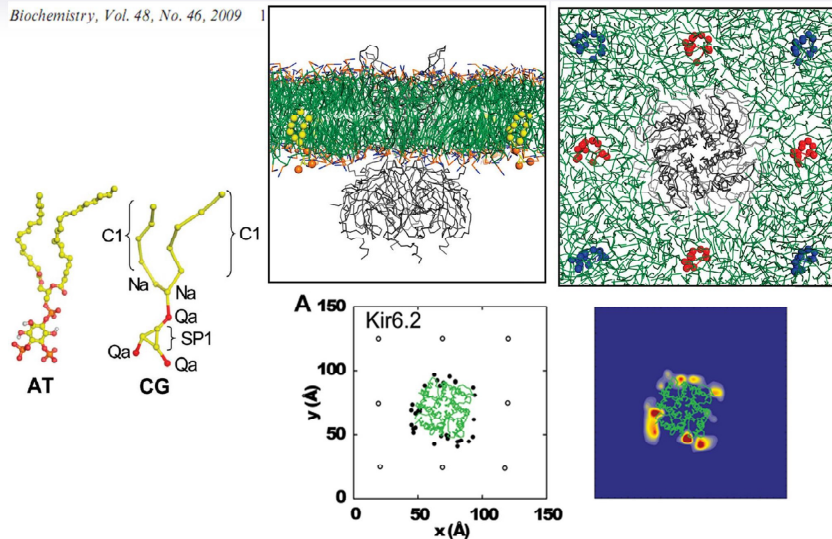
A.Y. Shih et al. / *Journal of Structural Biology* 157 (2007) 579–592

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

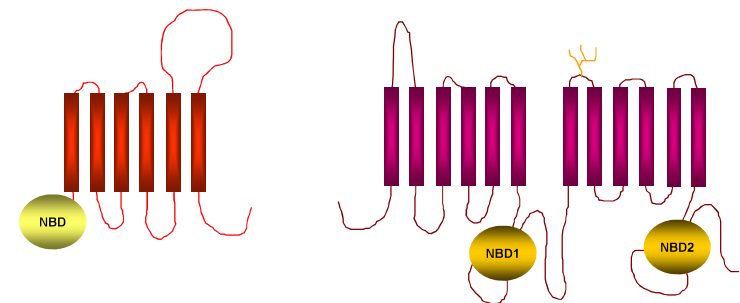


## PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

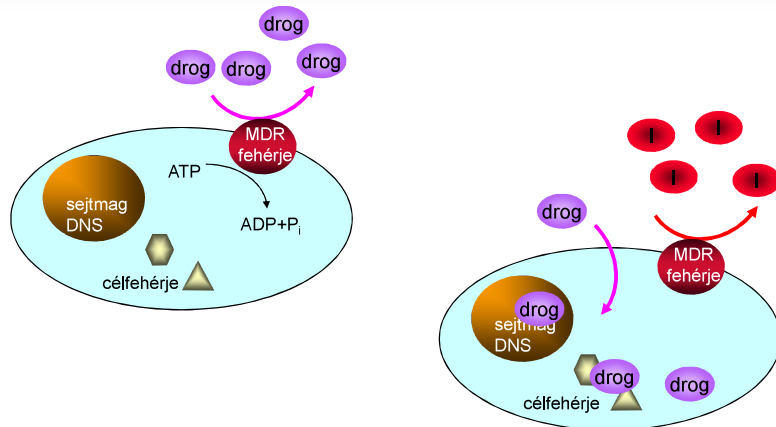
*Biochemistry*, Vol. 48, No. 46, 2009



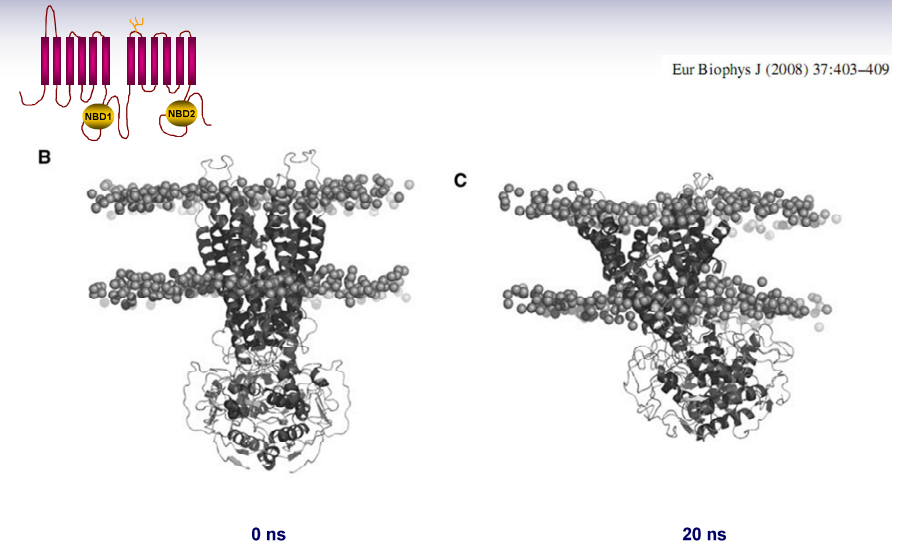
## ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



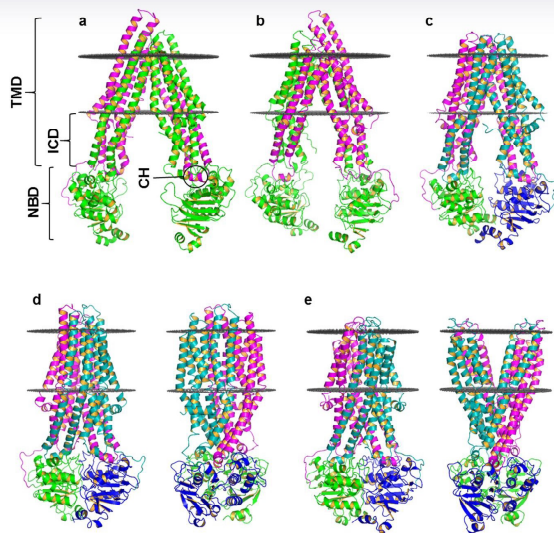
## A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése



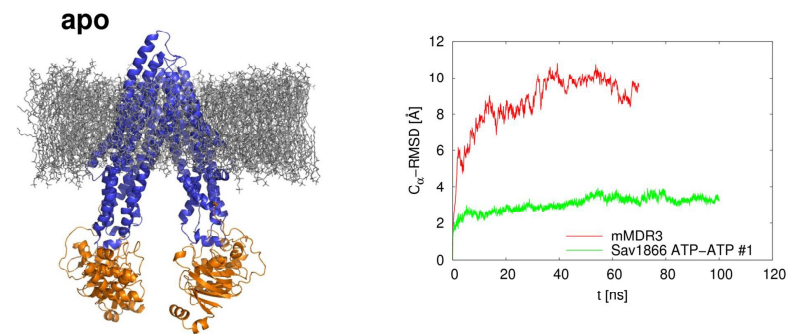
## Fehérjék konformációinak stabilitása



## ABC fehérjék konformációi (Type I)

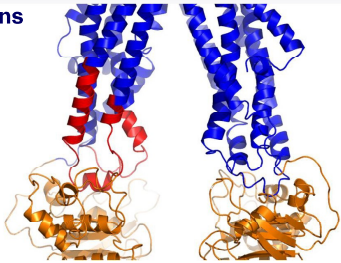


## Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil

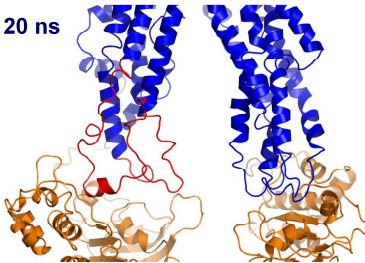


## Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil

t = 0 ns

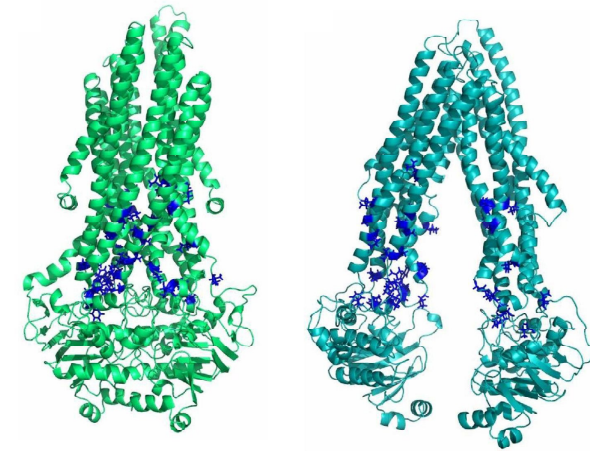


t = 20 ns



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

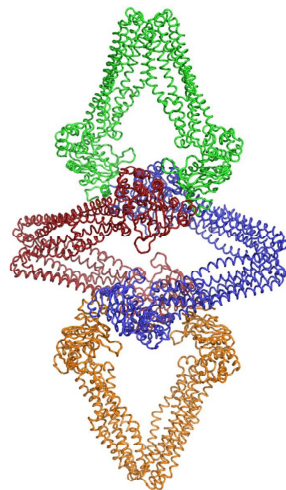
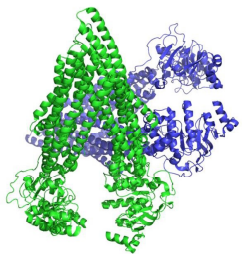
## Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre



## Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U

MsbA, PDBID:3B5W



## Események modellezése *biased MD*

- 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*