

# 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

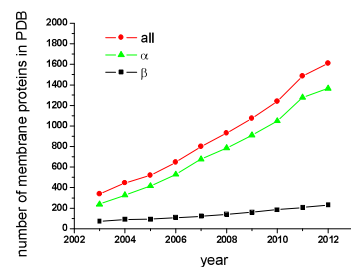
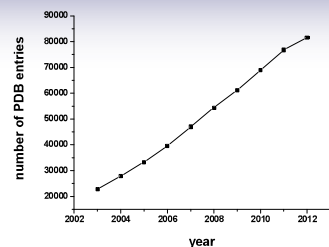
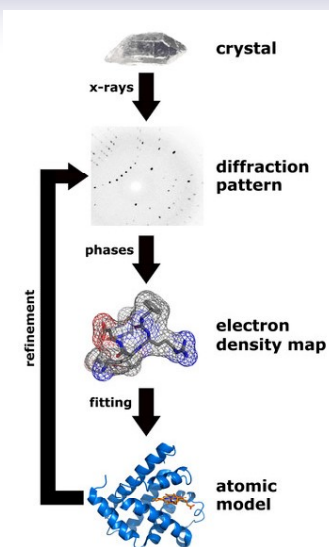
Atomi szintű információt ad mozgásokról.

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

## Membránfehérjék szerkezeti modellezése

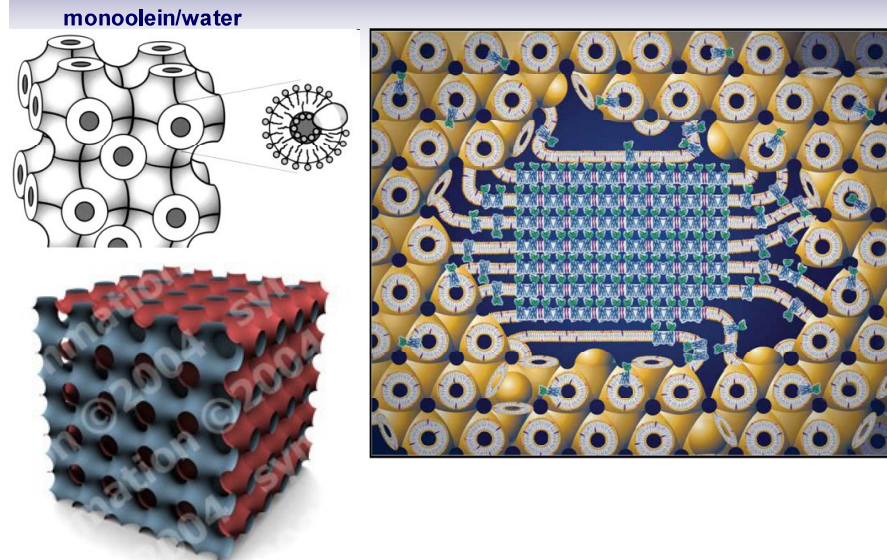
- Kísérleti adatok alapján
- Homológia modellezés
- „Threading” vagy ”fold recognition”

## Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



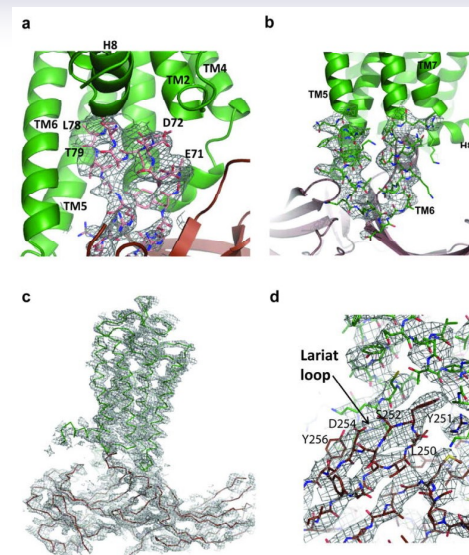
pdbtm.enzim.hu, Tudsány Gábor

## Szerkezet meghatározás – cubic phase



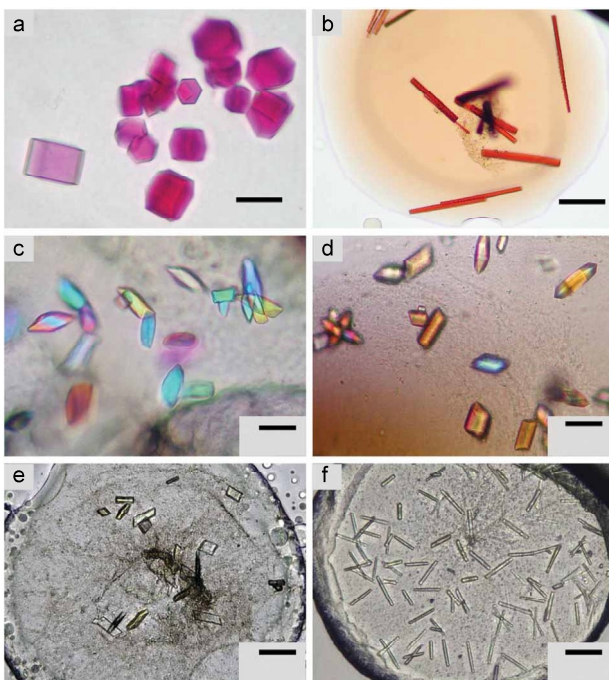
## Szerkezet meghatározás – „single particle”

Free Electron Laser (FEL)



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

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

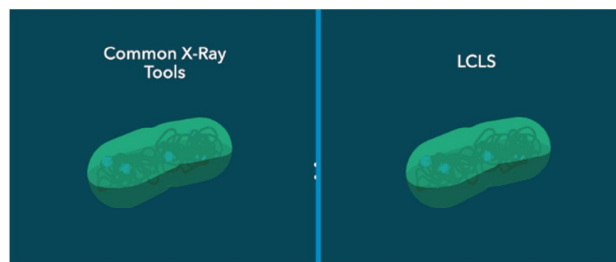


Crystals of membrane proteins growing in the lipidic mesophase.

- (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 – „teljes sejt”

Free Electron Laser (FEL)

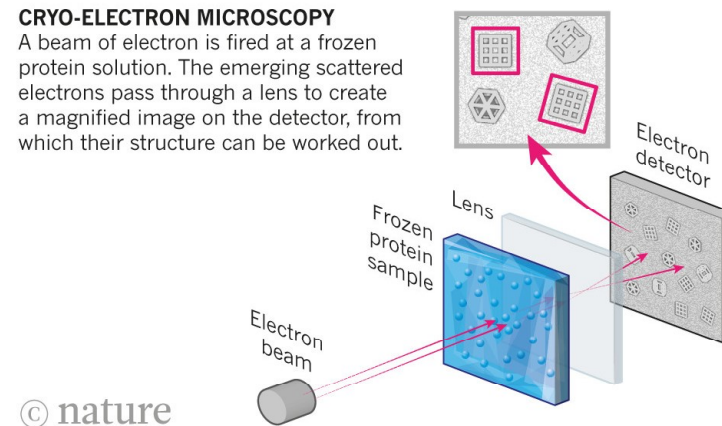


## Szerkezet meghatározás – „single particle”

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.

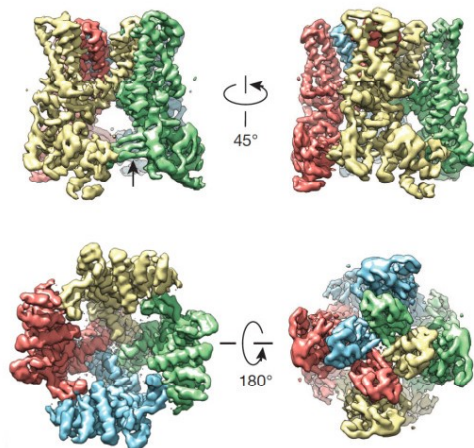


Ewen Callaway, Nature | News Feature

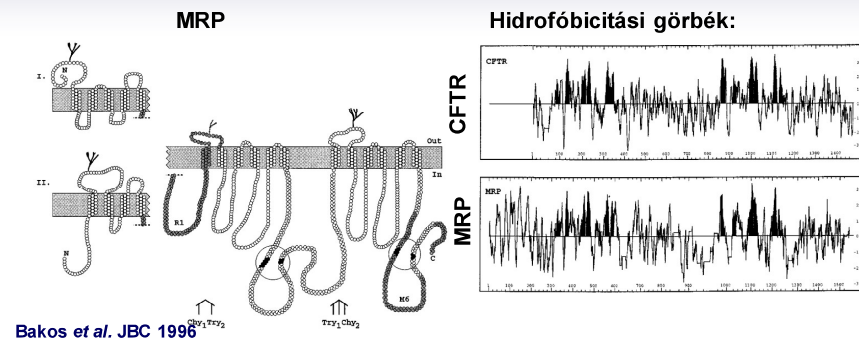
The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology, 09 September 2015

## 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.



## 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



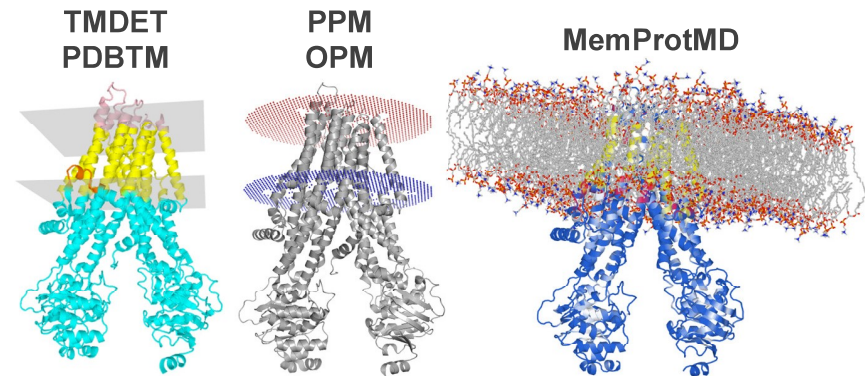
## Membrántopológia és TM hélixek predikciója szekvencia alapján

pl. CCTOP.enzim.hu

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

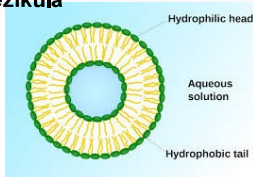
## TM hélixek predikciója szerkezet alapján

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

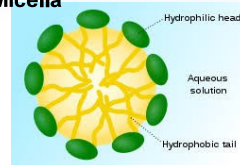


## Membrán mimetikumok / membrane mimetics

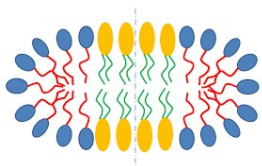
Vezikula



Micella



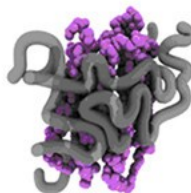
Bicella



Nanodisc

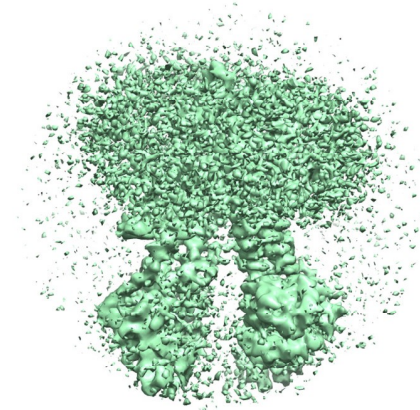


Amphipol



Membrane embedding data is in the electron density maps

CFTR (PDBID: 5UAK) EMD

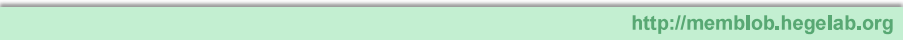




A membrane blob can be extracted from the electron density map



The **MemBlob** can be converted to membrane boundaries



# Homológia modellezés I.

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

[illegible]

### Alignement – pl. ClustalW

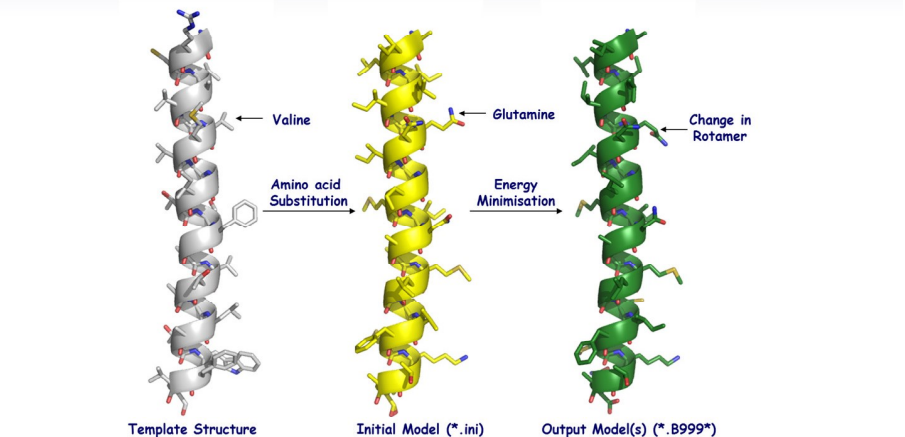
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

2HYD -----MIKRIYQVK-----PYKIRIFATIIVGIKFGIMLIP  
3BSX -----WQTFKRLWTYIR-----LYKAGLVSITAIIVNAADMTYI  
CFTR\_HUMAN MQRSPLEKASVSKLFFSWTRPIILRKGRVRLSDLYQIPVSDSNLIS

5 10 15 20 25 30 35

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

## Homológia modellezés II.

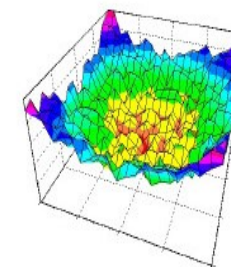


Van szerkezet, mozgassuk meg!

## Molecular dynamics

### Molekuláris dinamika (MD)

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



## A „force field”

Baker (2007)

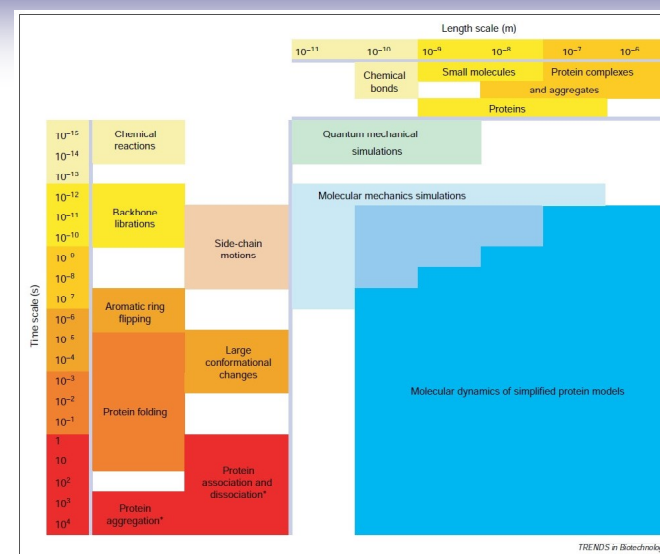
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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)

## Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

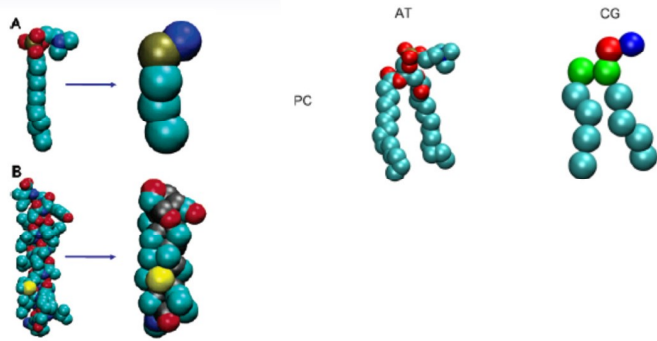
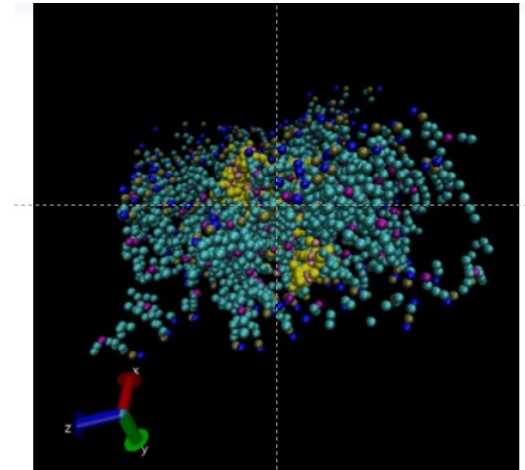


Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

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

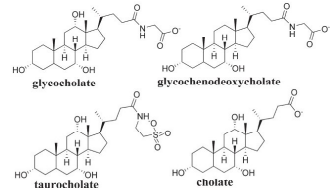
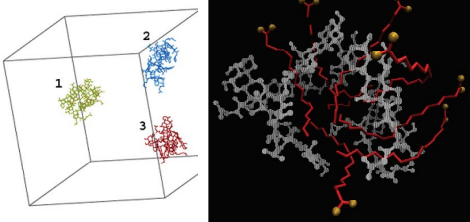
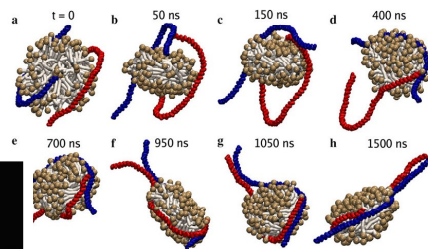


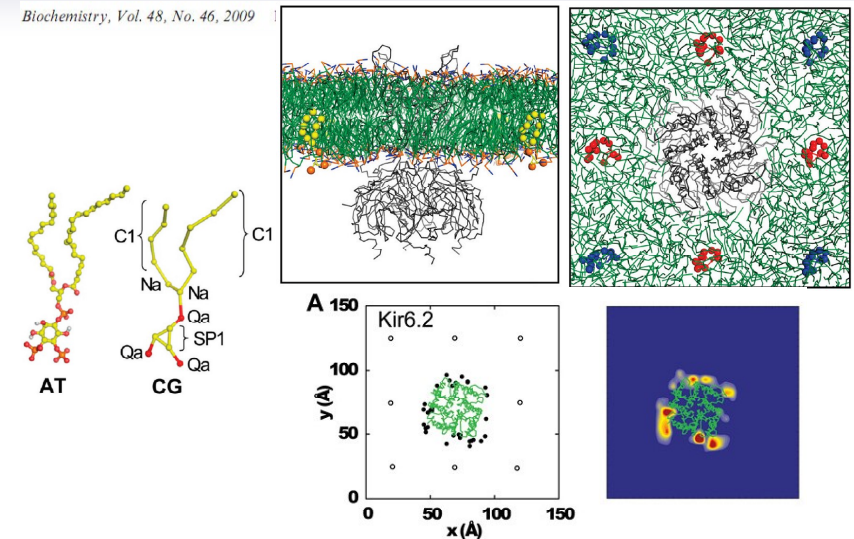
Figure 1. Chemical structures of the four common bile salts: glycocholate, glychenodeoxycholate, taurocholate, and cholate.

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



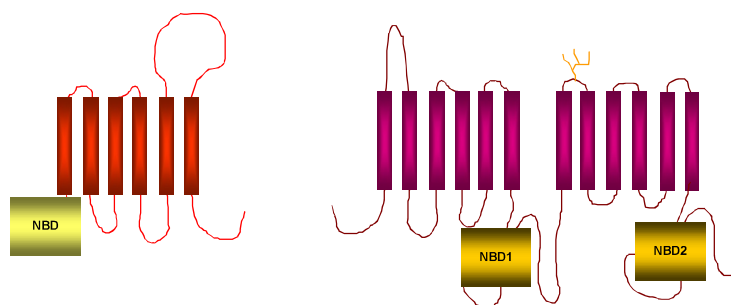
## PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

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

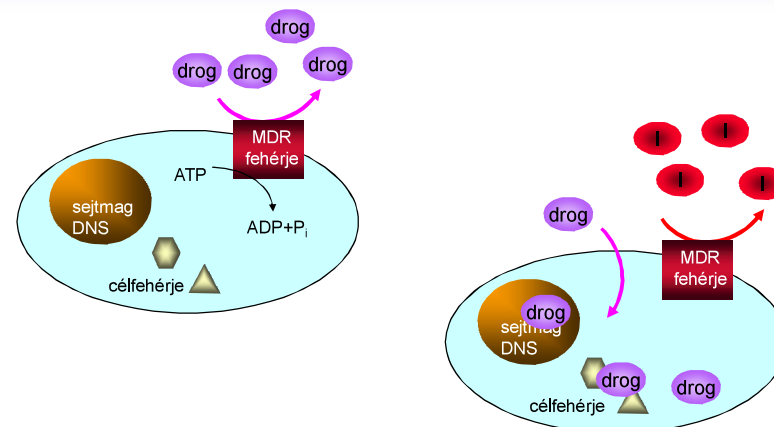




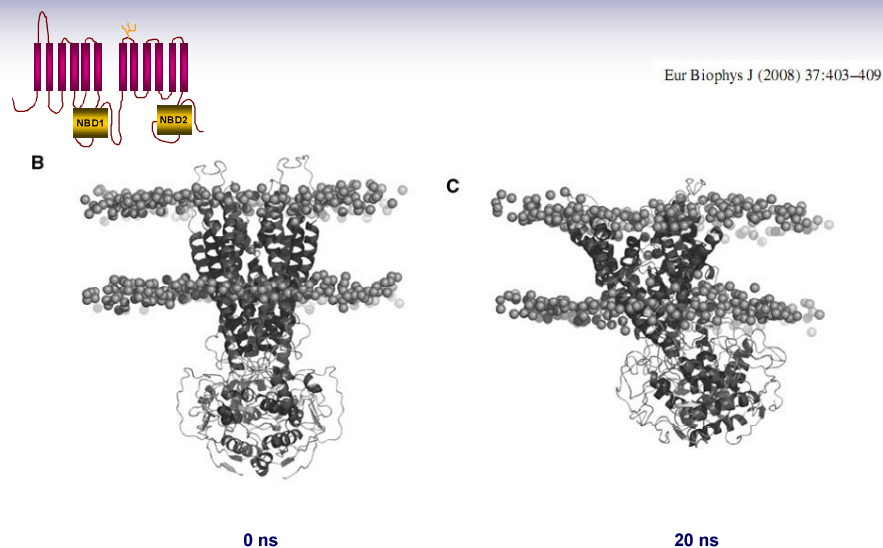
## ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



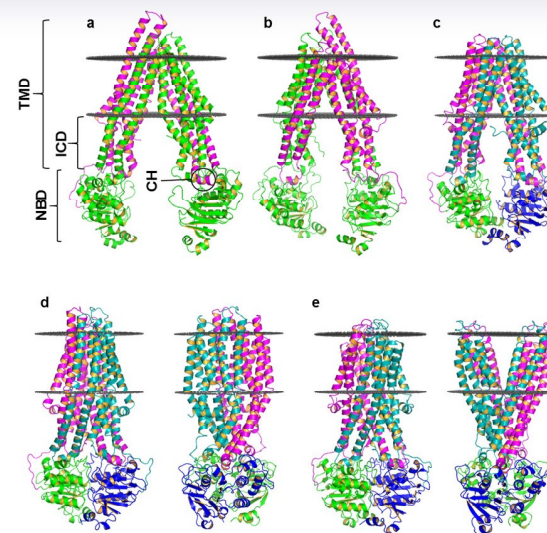
## A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése



## Fehérjék konformációinak stabilitása

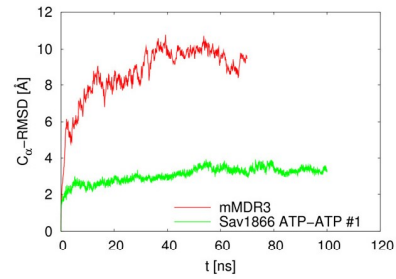
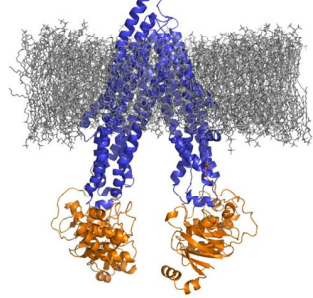


## ABC fehérjék konformációi (Type I)



## Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil

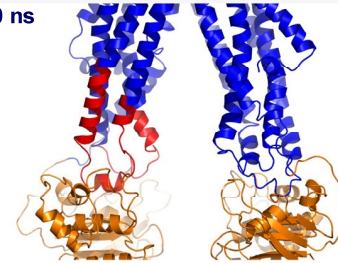
apo



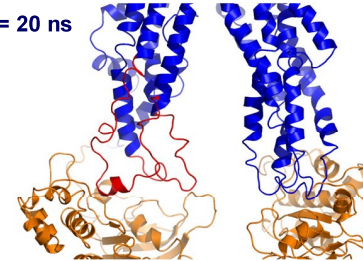
Gyimesi et al. BBA 2012

## Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil

t = 0 ns

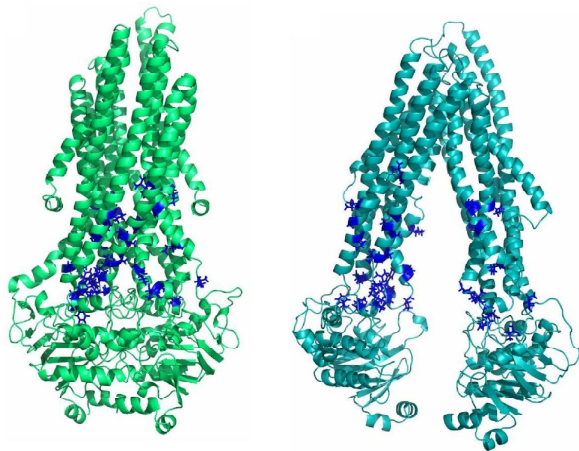


t = 20 ns



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

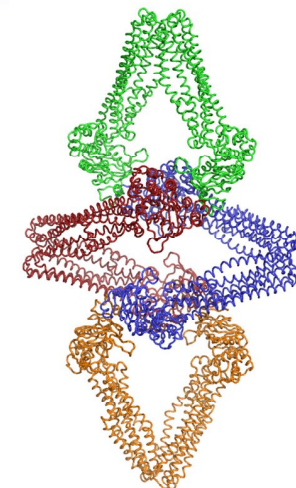
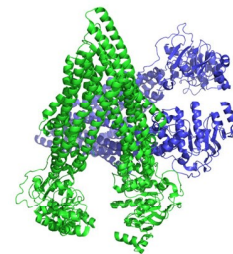
## Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre



## Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U

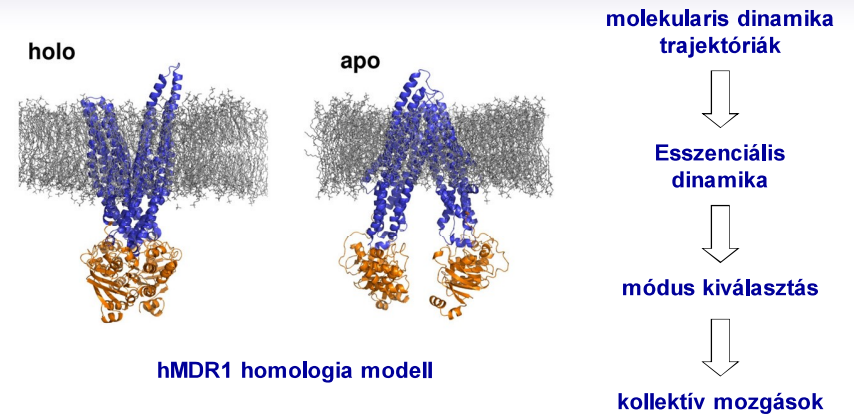
MsbA, PDBID:3B5W



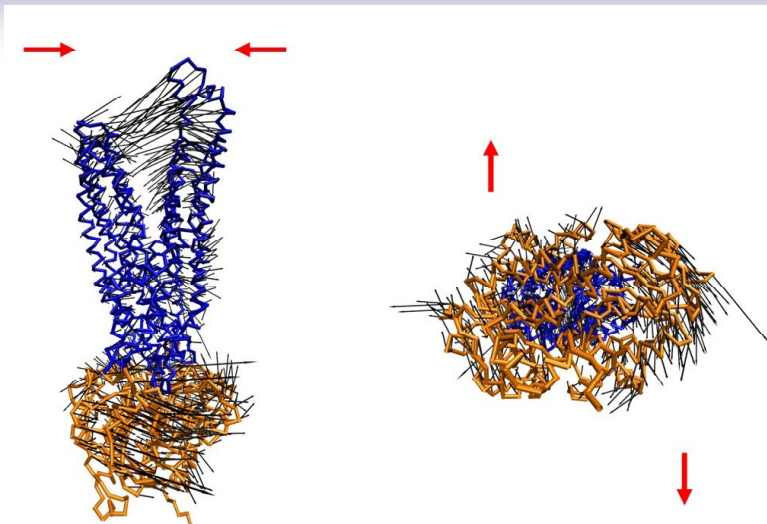
## Események modellezése *biased MD*

- 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*

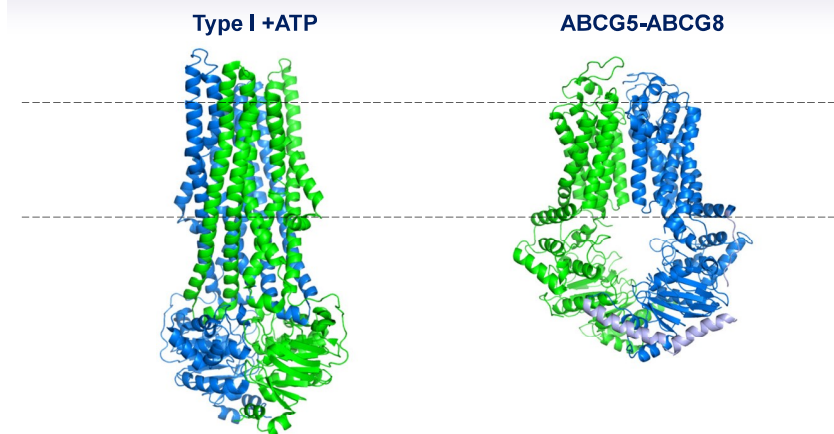
## Zárt-nyitott átmenet jellemzése esszenciális dinamika



## Zárt-nyitott átmenet

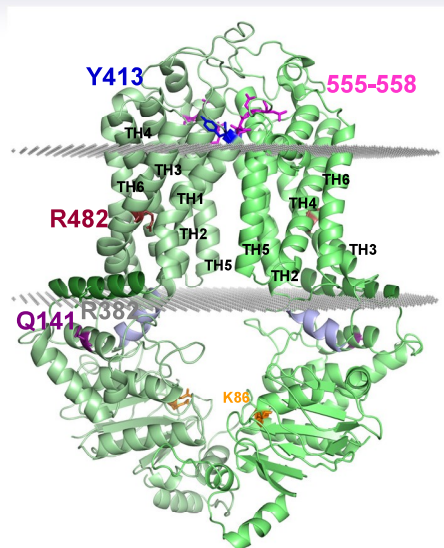


## ABCG alcsalád - Type II

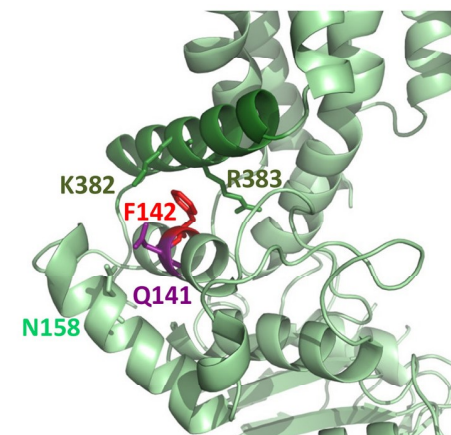




## Az ABCG2 modell



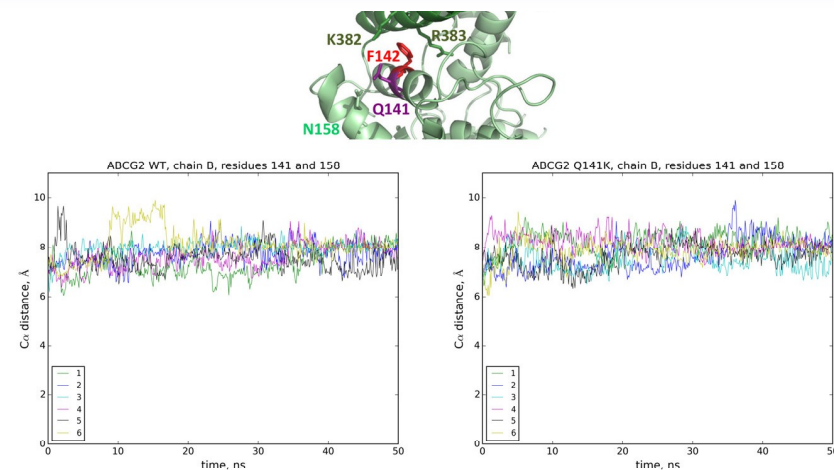
## A Q141 helyzete



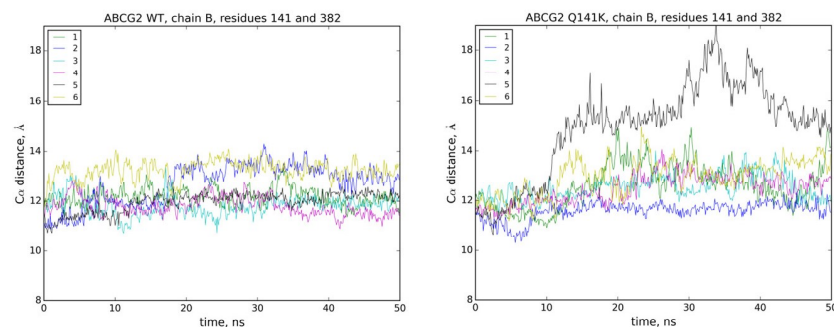
## Molekuláris Dinamikai (MD) szimulációk

- 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



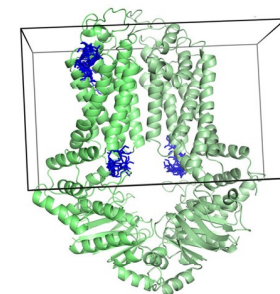
## A Q141K hatása a 141/382 (NBD/TMD) kapcsolatra



## 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)

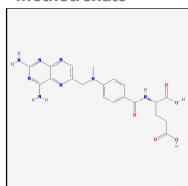


## Drogtő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

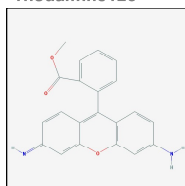
AutoDock Vina

- 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

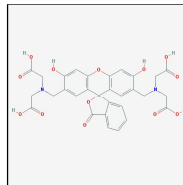
methotrexate



rhodamine123



calcein



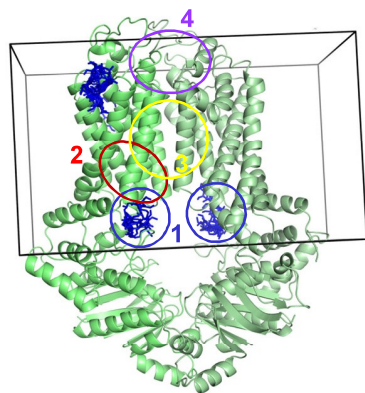
## Drogtő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

AutoDock Vina

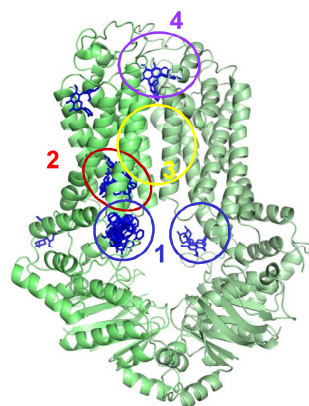
- Fix fehérje, flexibilis ligand
- Több konformáció (6 db, egyensúlyba hozott)
- Doboz; ligand odapróbálása nagyon sokszor (ebből 20/futás)
- Mindent oda lehet dokkolni... ezért szubsztrát + nemszubsztrát
- (6 ABCG2 konformáció) \* (20 pozitúra) \* (3 párhuzamos) \*  
(25 szubsztrát + 14 nem-szubsztrát)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

## Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

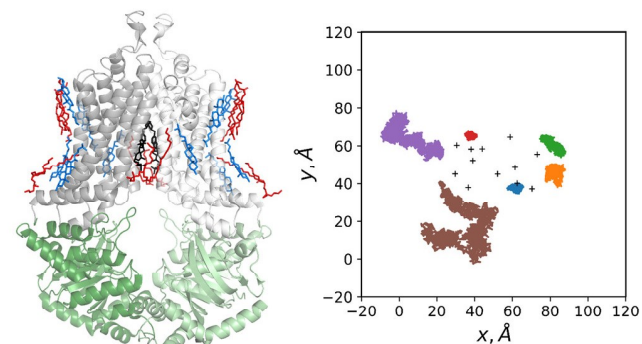
verapamil



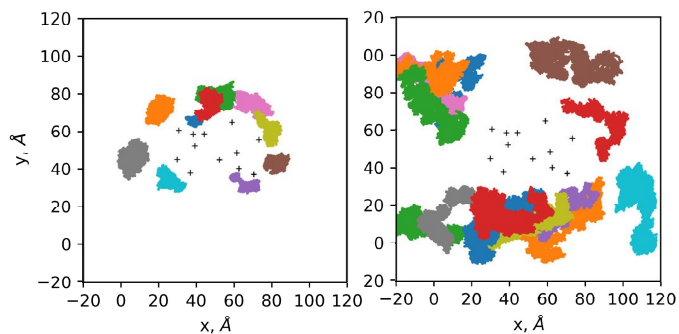
flavopiridol



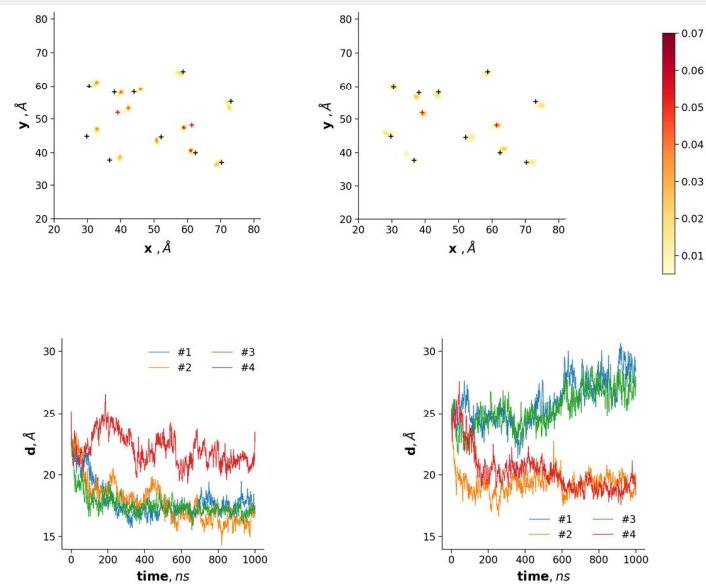
## A koleszterin-hatás



## MD szimulációk POPC:CHOL membránban

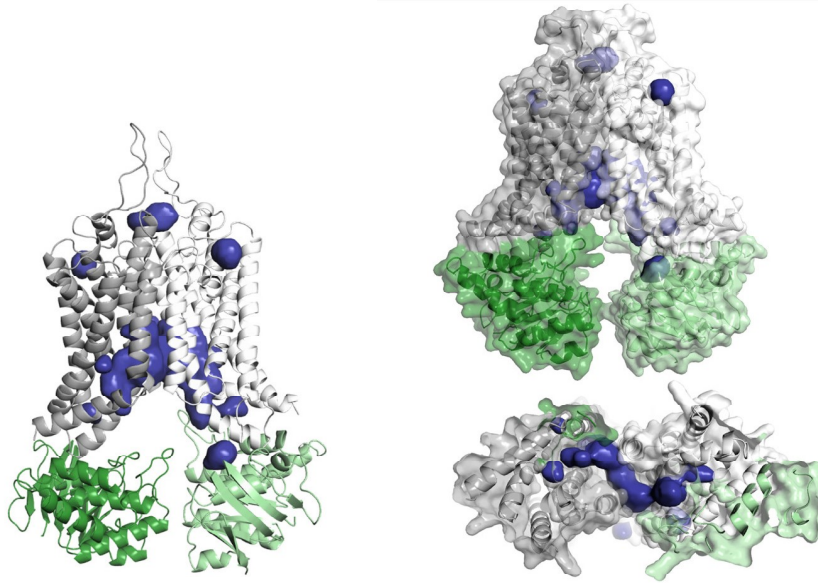


## A koleszterin elősegíti a transzportot megelőző záródást





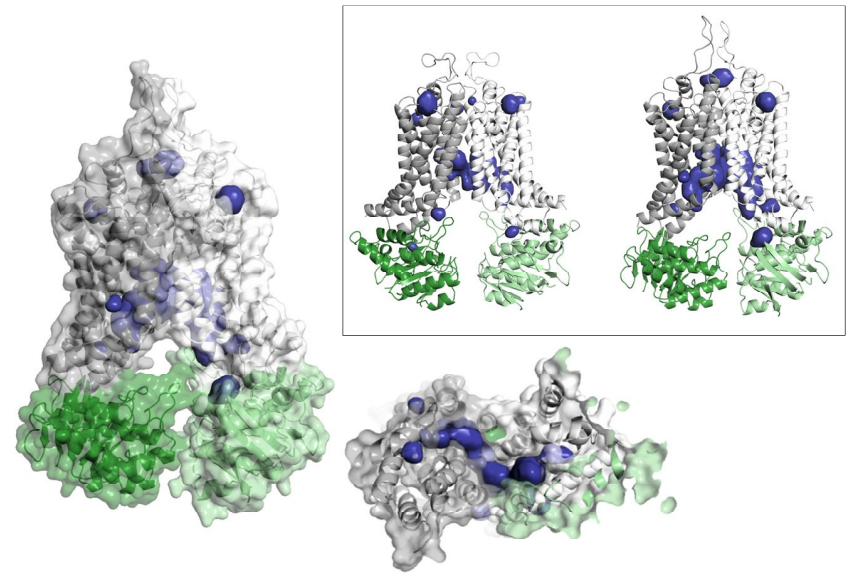
## A drog-kötő zsebek dinamikus változása



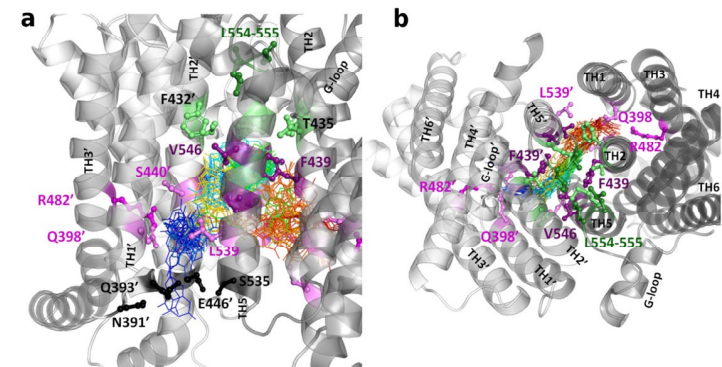
## A transzport leírása egyensúlyi szimulációkkal



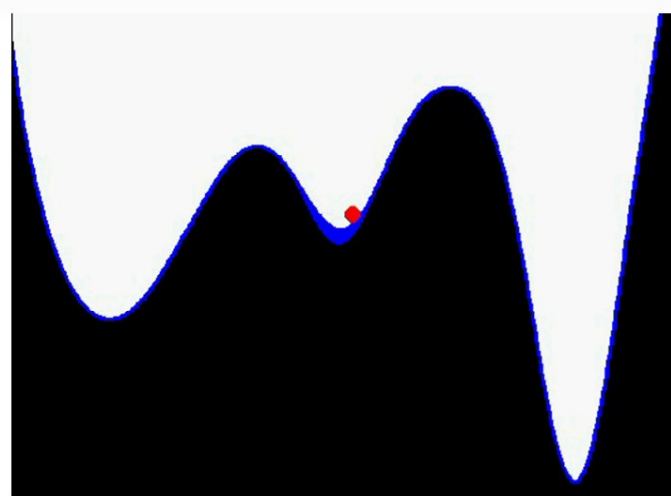
## A drog-kötő zsebek dinamikus változása



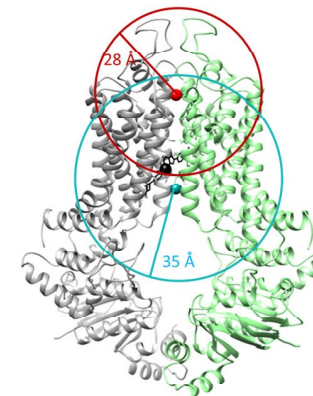
## A transzport leírása egyensúlyi szimulációkkal



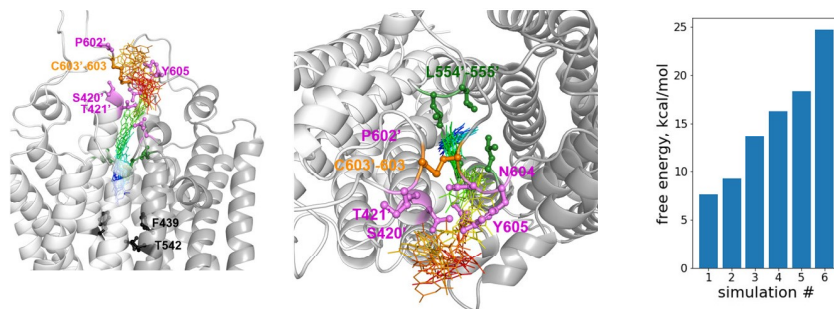
## A „exit” jellemzése metadinamikával



## Az „exit” jellemzése metadinamikával



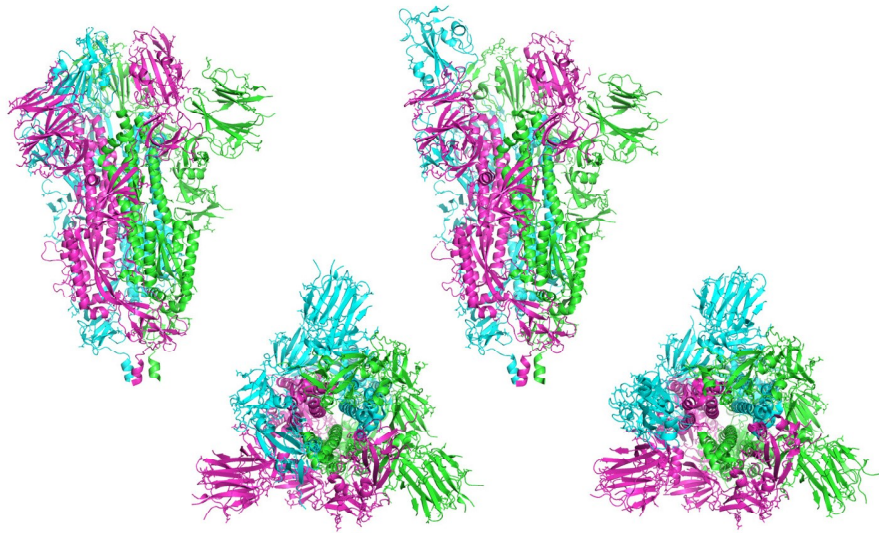
## A „exit” jellemzése metadinamikával



## SARS-CoV-2

- **SARS-Cov** sok adat, szekvenciális és szerkezeti hasonlóság, homológia (modellezés)
- **Nagy erőforrás ráfordítás** már most rengeteg (szerkezeti) adat
- **Kezelési megközelítések:**
  - passzív immunizálás
  - immunizálás  
(állatok immunizálása tesztrendszerek fejlesztéséhez)
  - gyógyszerfejlesztés

## SARS-CoV-2, Spike fehérje



## Összefoglalás

- Fehérje szerkezet
- Fehérje dinamika
- Számítási módszerek igen fontosak
- Fehérjék működésének és mutációk hatásának megismerése
- Gyógyszertervezés

[www.hegelab.org](http://www.hegelab.org)  
[hegedus.tamas@hegelab.org](mailto:hegedus.tamas@hegelab.org)