

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.**

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)**

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

Harmadlagos szerkezet jóslása

Ab initio folding

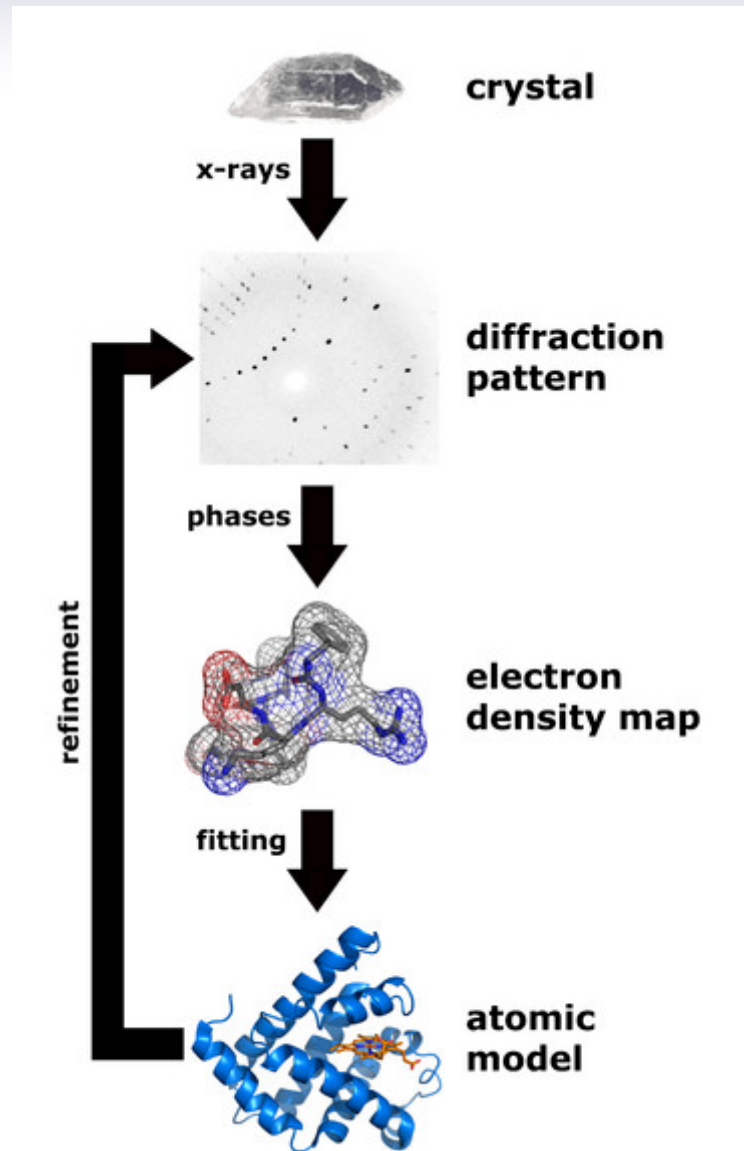
- **CASP** (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction)
- kényszerfeltételek kísérletekből

„Threading”, fold recognition

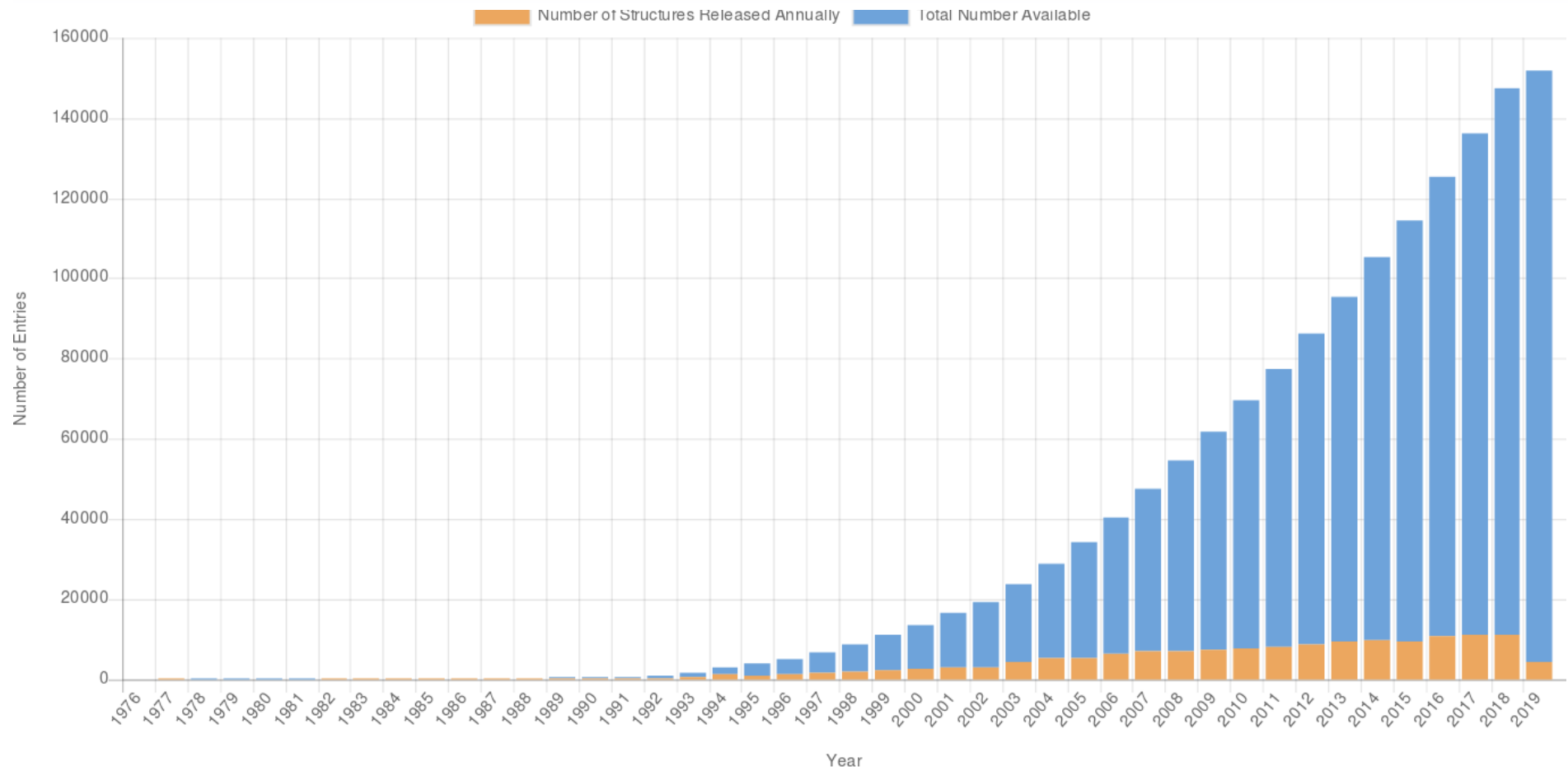
Homológia modellezés

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

Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia

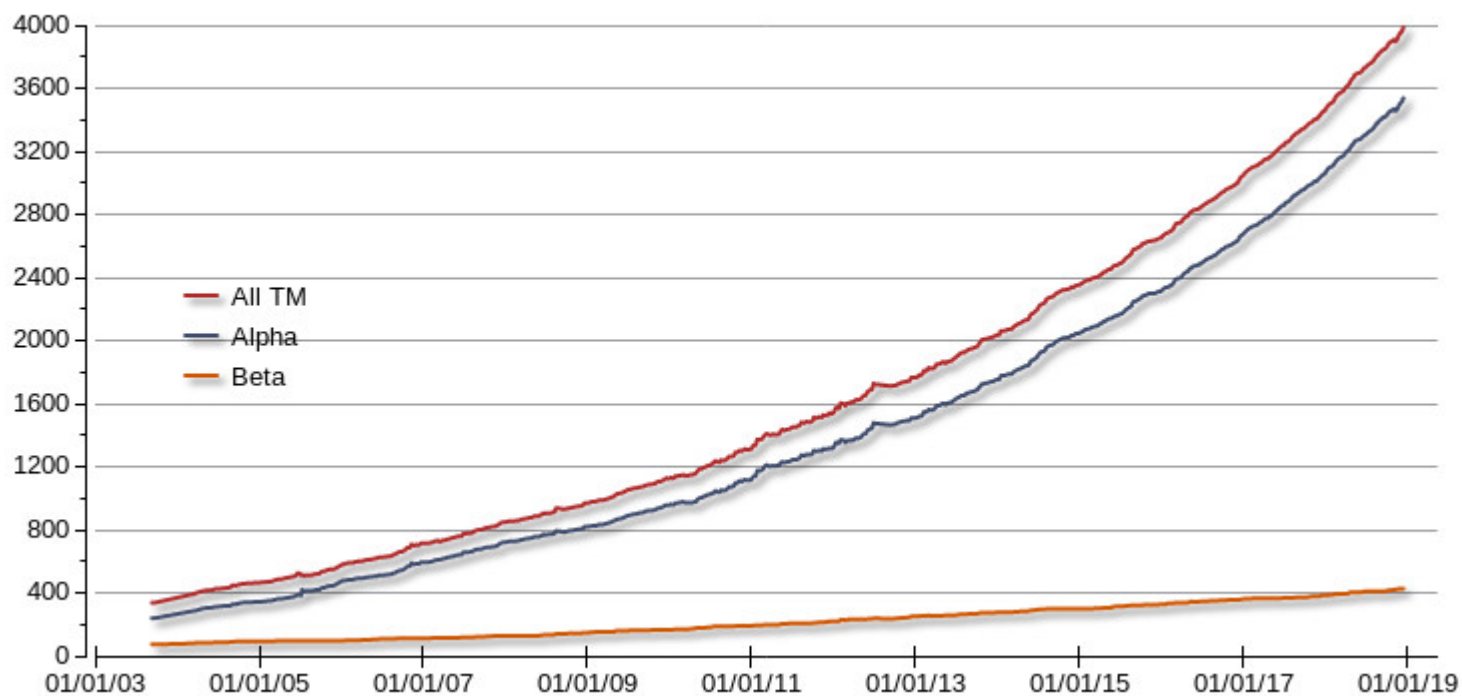


Szerkezetek száma a PDB/RCSB adatbázisban



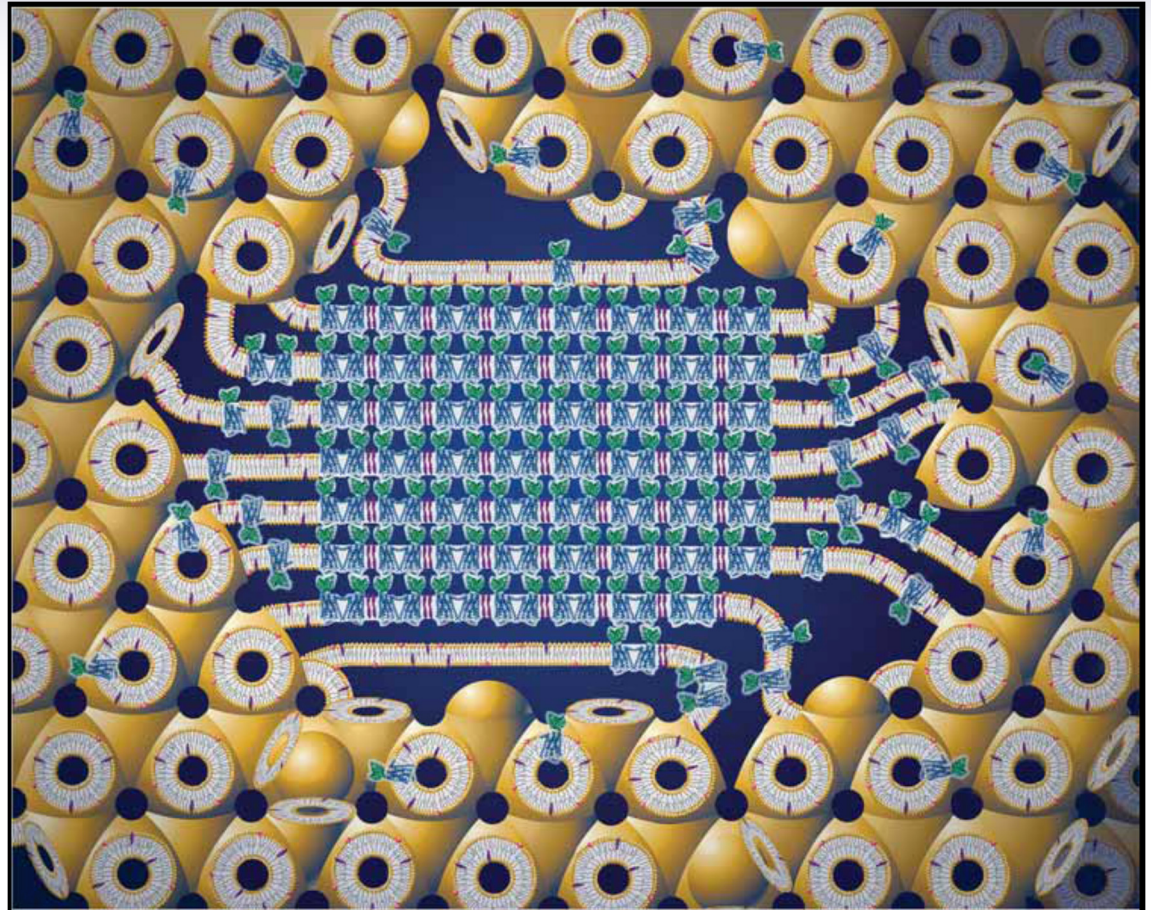
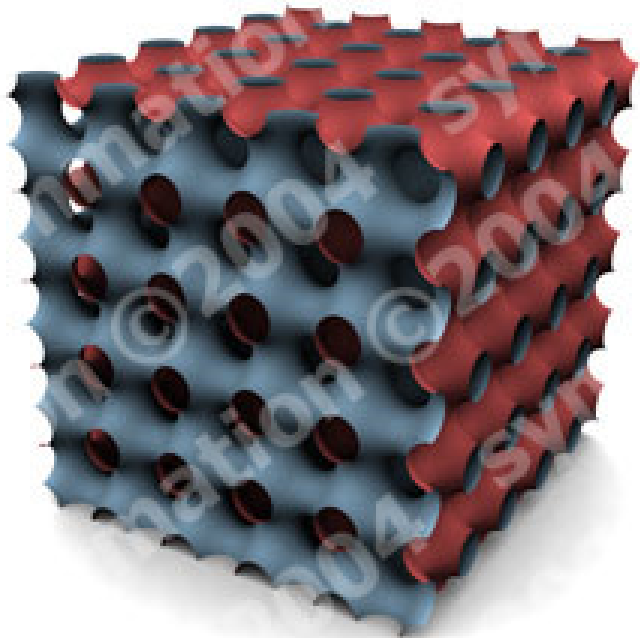
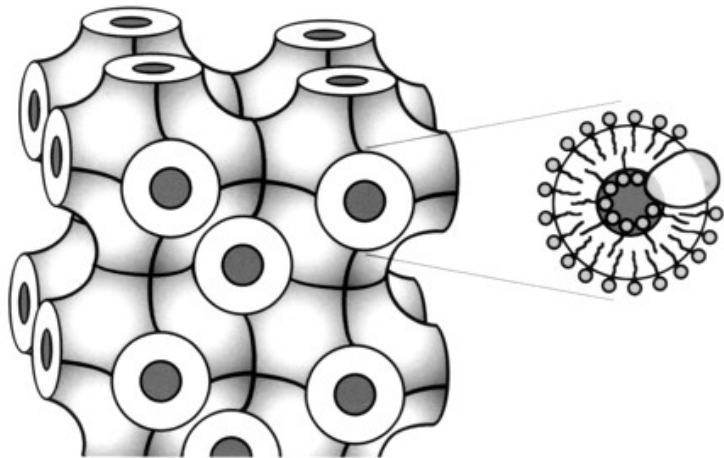
RCSB

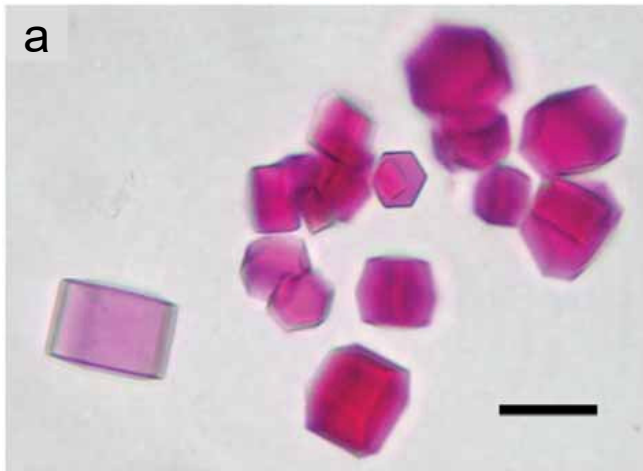
Transzmembrán fehérje szerkezetek



Szerkezet meghatározás – cubic phase

monoolein/water





Crystals of membrane proteins growing in the lipidic mesophase.

(a) bacteriorhodopsin

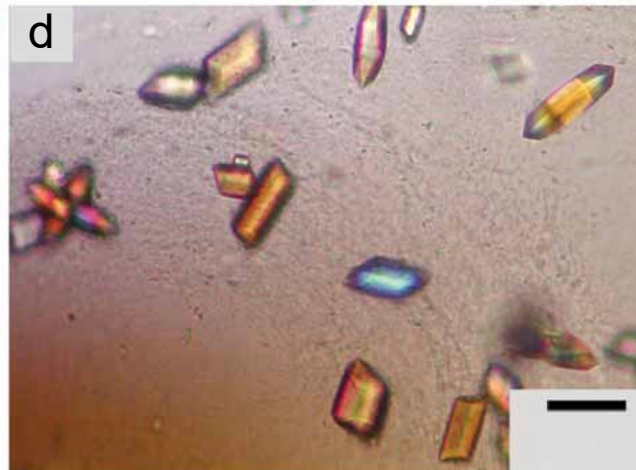
(b) light-harvesting complex II

(c) adhesin/invasin OpcA

(d) vitamin B12 transporter BtuB

(e) human $\beta 2$ adrenergic receptor-T4 lysozyme chimera

(f) carbohydrate transporter from *Pseudomonas*

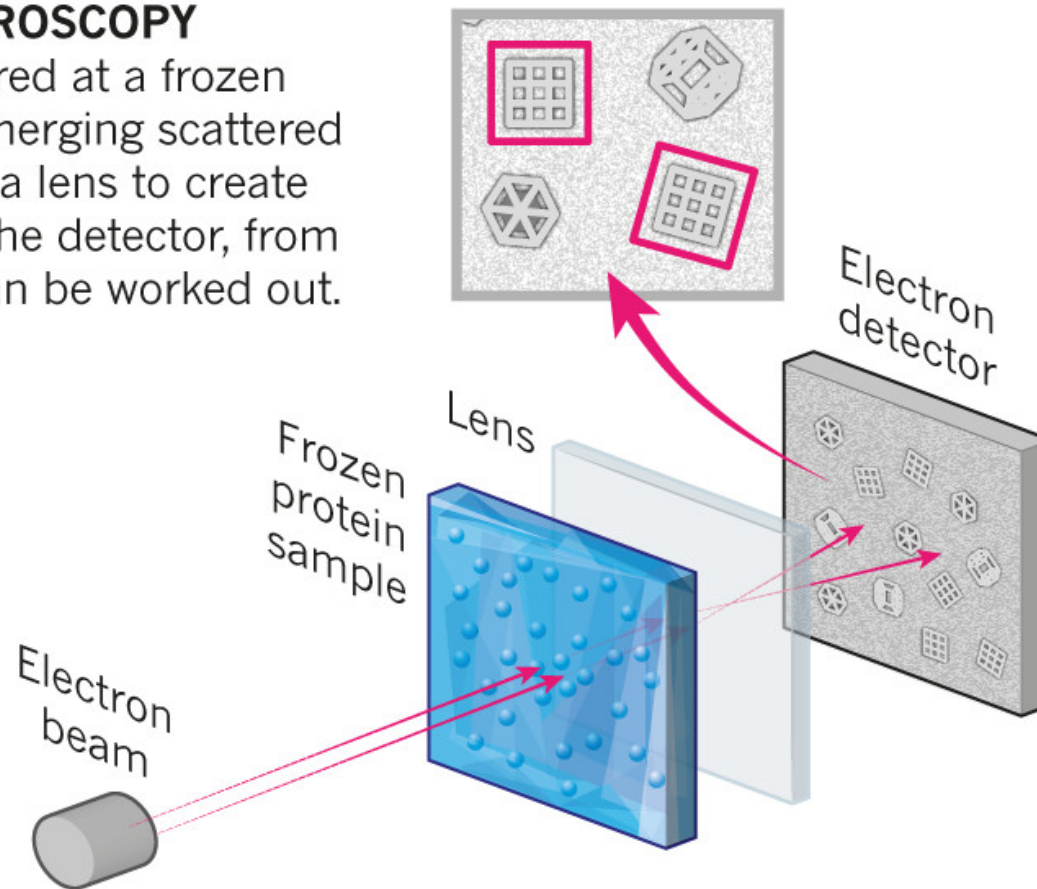


Szerkezet meghatározás – „single particle”

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.



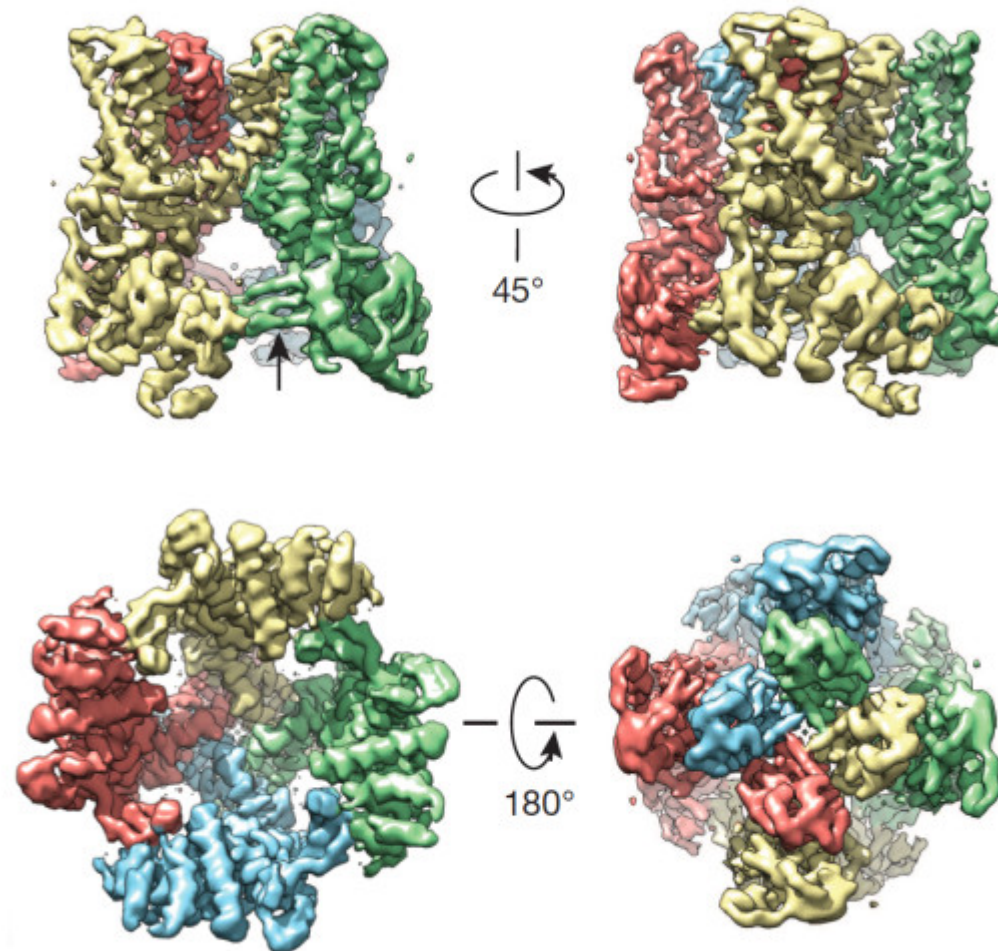
© nature

Ewen Callaway, Nature | News Feature

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

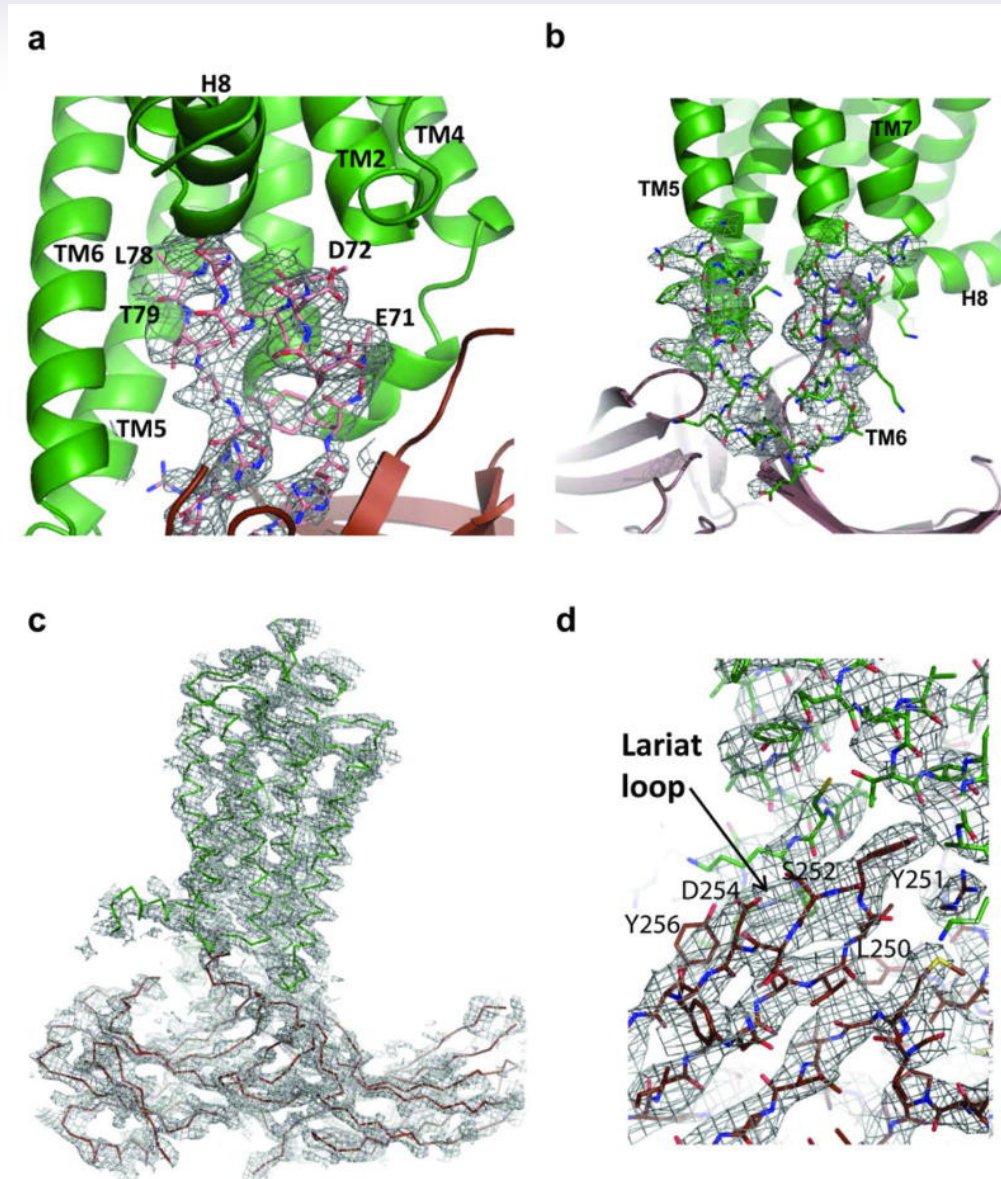
Szerkezet meghatározás – „single particle”

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)

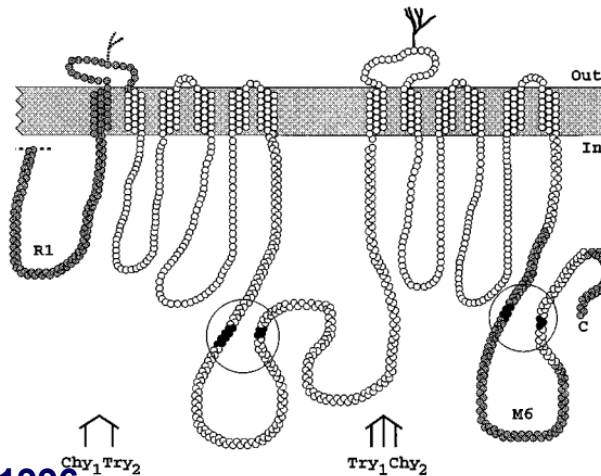
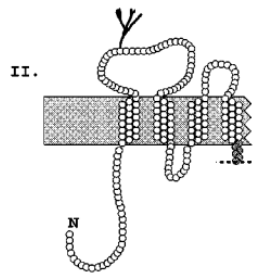
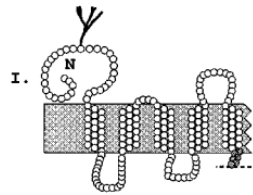


Nature. 2015 Jul
30;523(7562):561-7.

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

Membránfehérjék topológiája

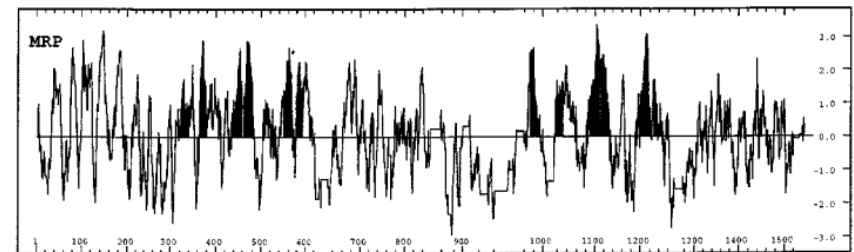
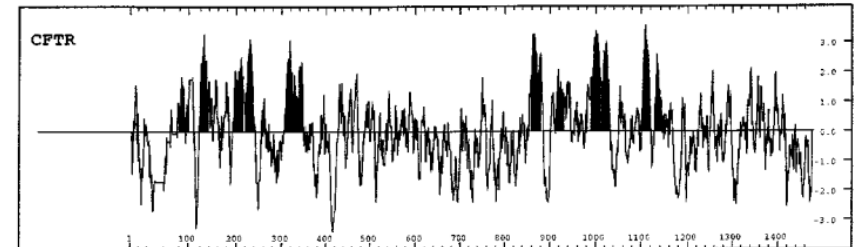
MRP



CFTR

MRP

Hidrofóbicitási görbék:



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

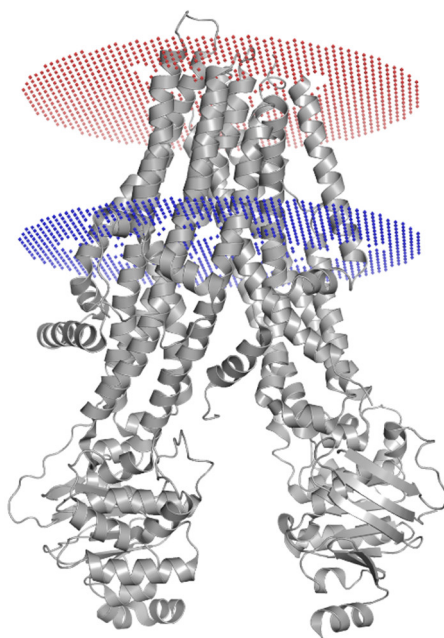
TM hélixek predikciója szerkezet alapján

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

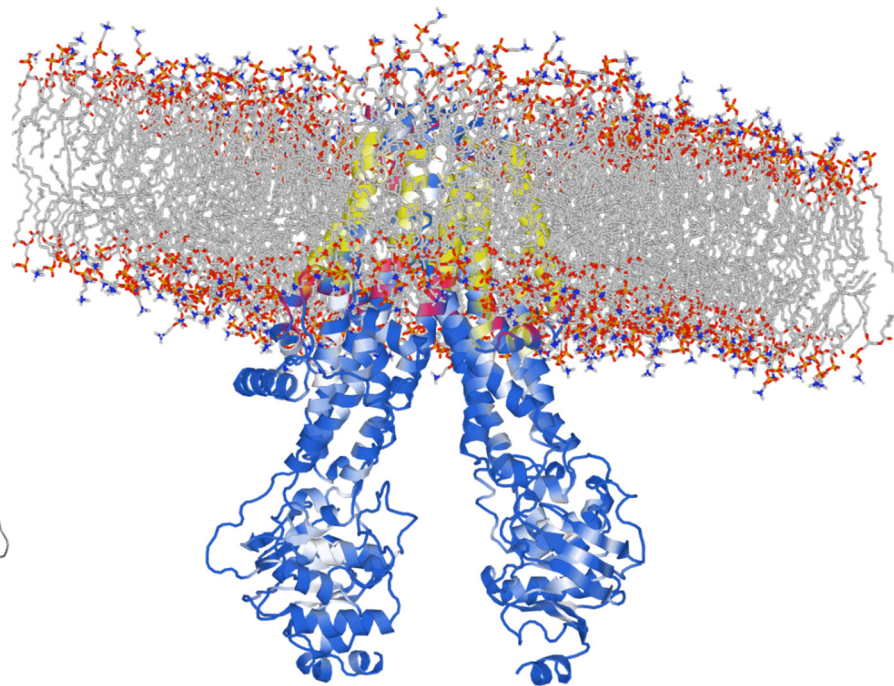
**TMDet
PDBTM**



**PPM
OPM**

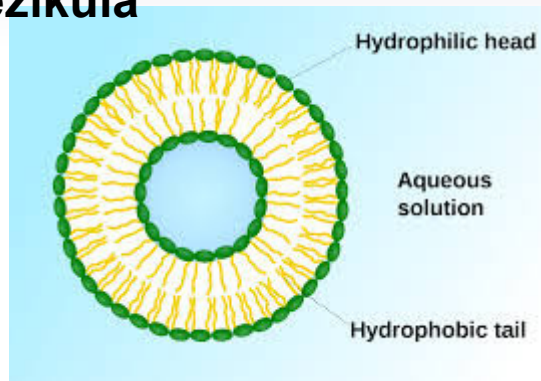


MemProtMD

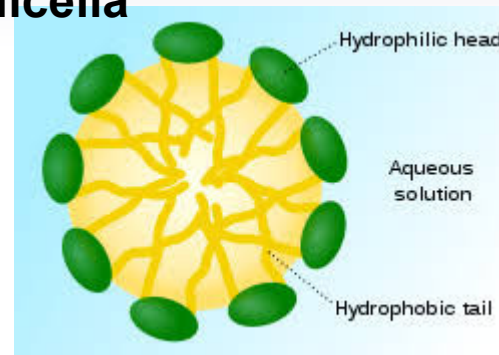


Membrán mimetikumok / membrane mimetics

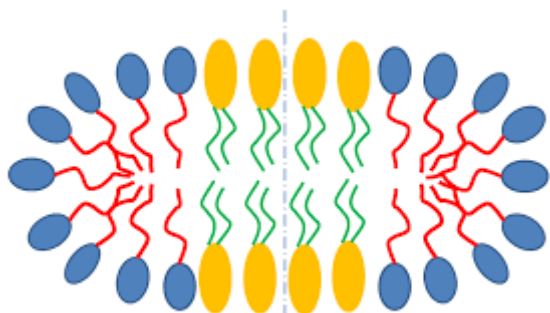
Vezikula



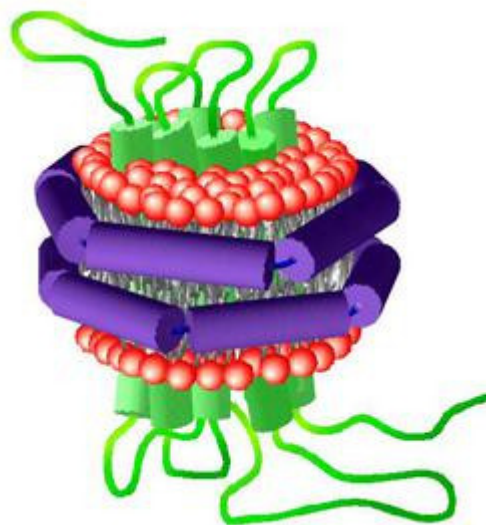
Micella



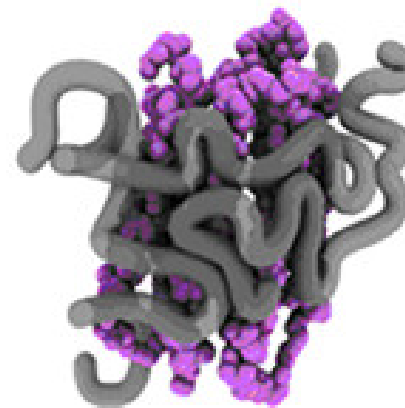
Bicella



Nanodisc

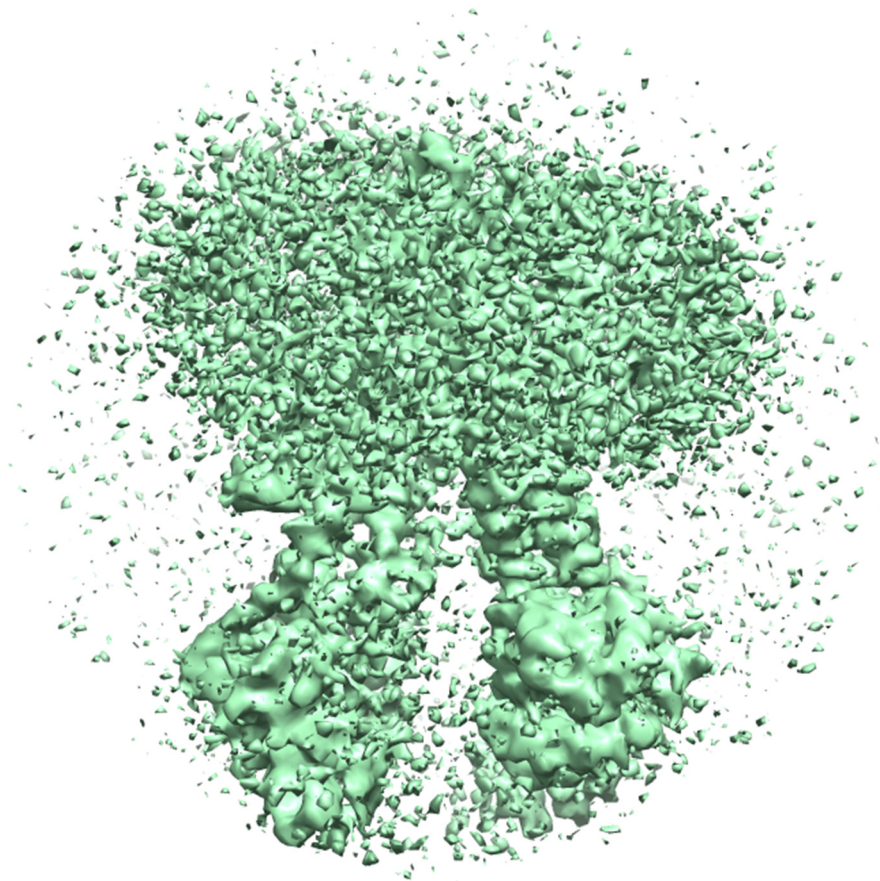


Amphipol

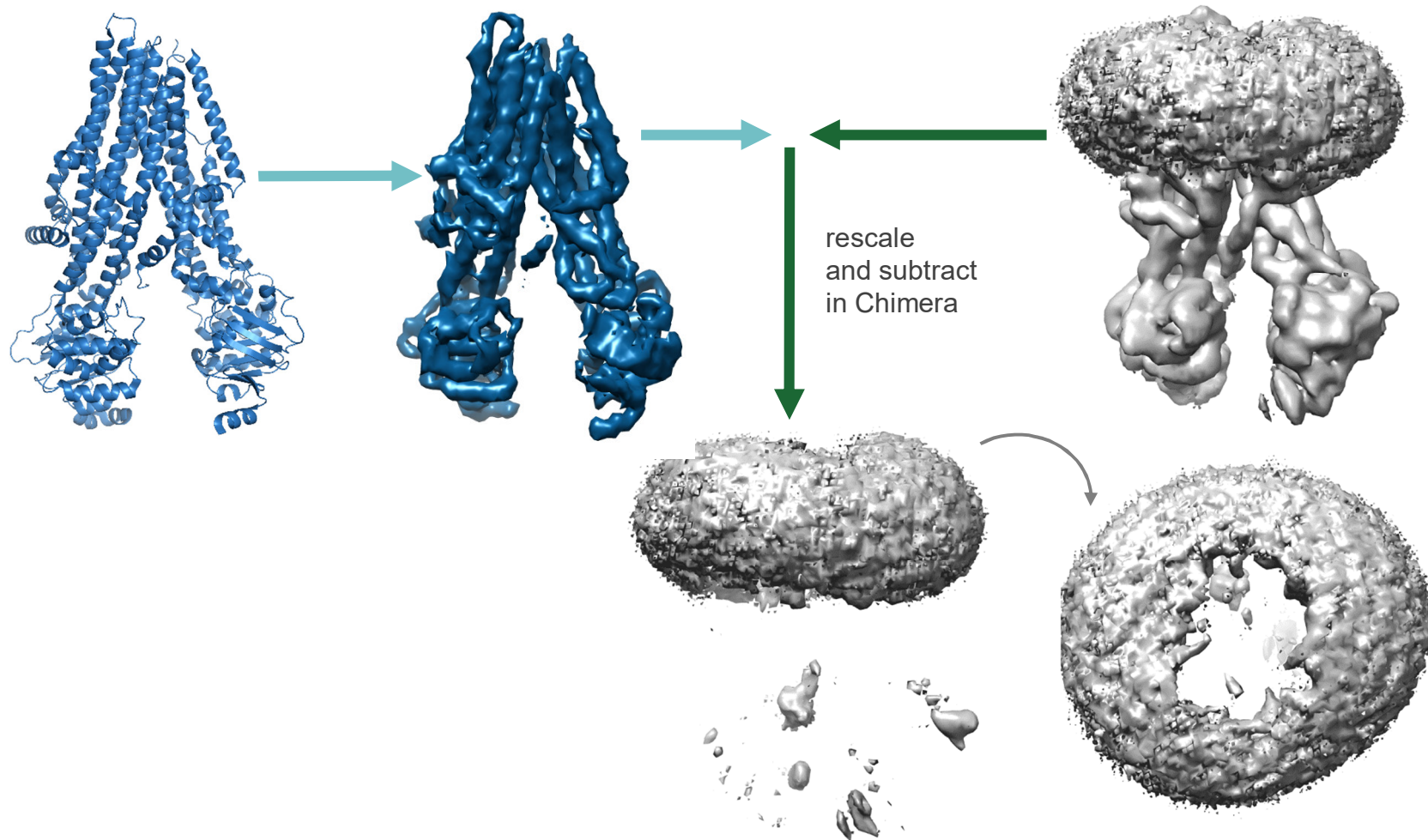


Membrane embedding data is in the
electron density maps

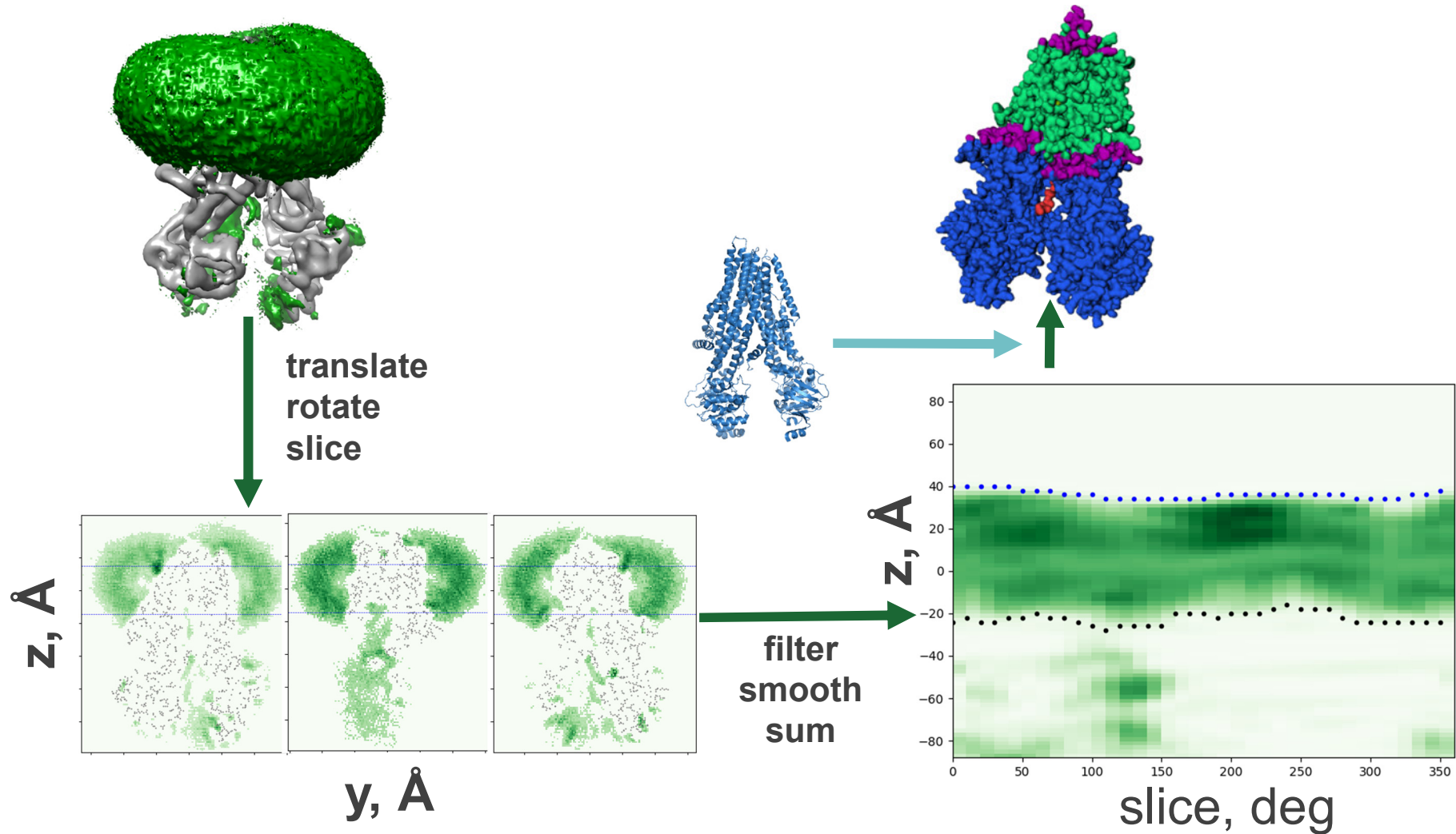
CFTR (PDBID: 5UAK) EMD



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**

BLOSUM (BLOcks of Amino Acid SUBstitution Matrix) matrix is a substitution matrix

BLOSUM (BLOCKs of Amino Acid Substitution)
is a substitution matrix

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

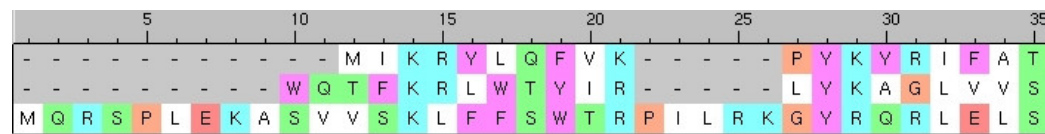
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Alignement – pl. ClustalW

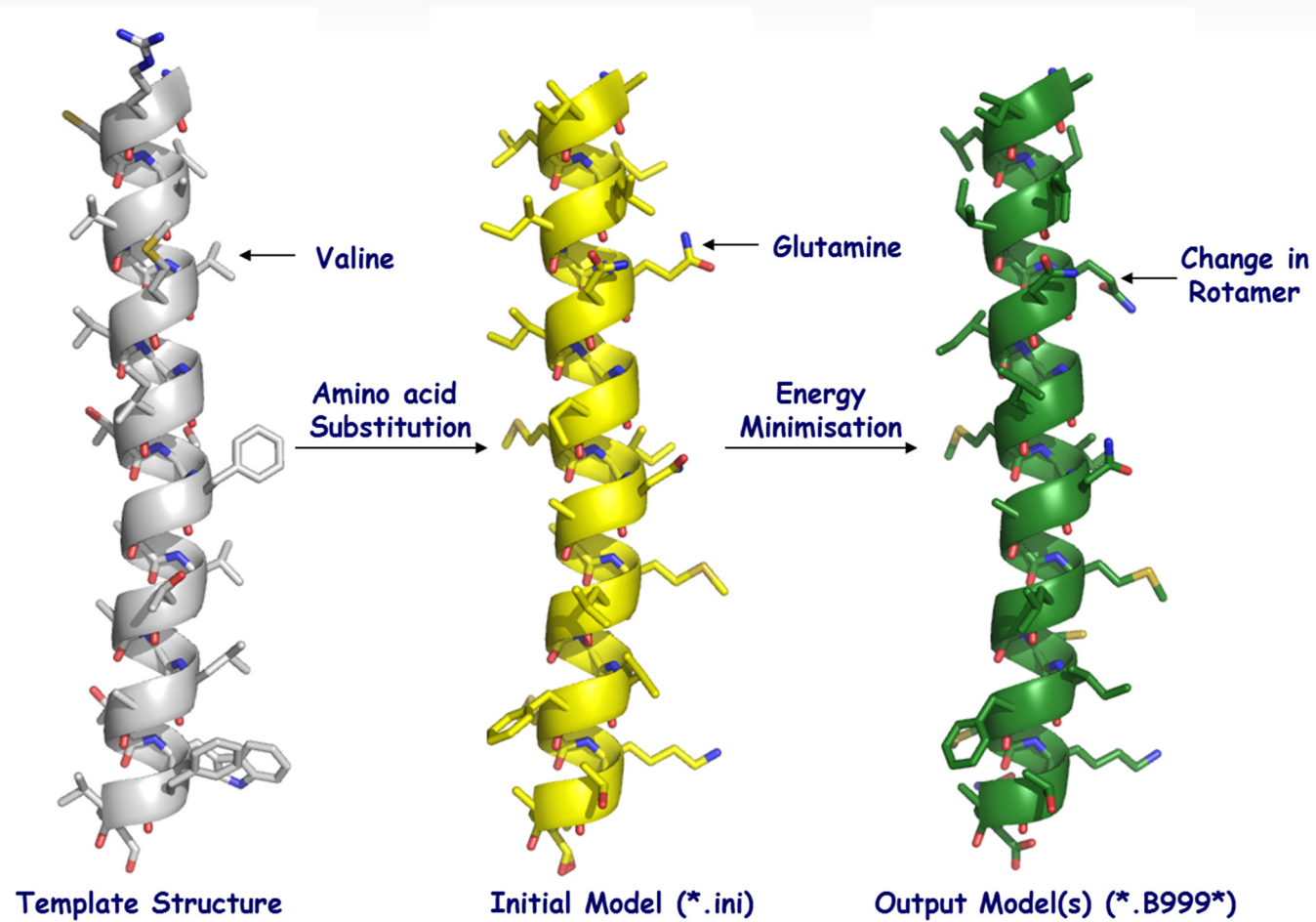
```

2HYD      -----MIKRYLQFVK-----PYKYRIFATIIVGIIKFGIPMLIP
3B5X      -----WQTFKRLWTYIR-----LYKAGLVVSTIALVINAAADTYMI
CFTR_HUMAN MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPIILRKYRQRLELSDIYQIPSVDSADNLS
              *       :       :       *       :       :       *       :       :

```



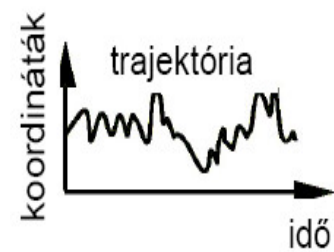
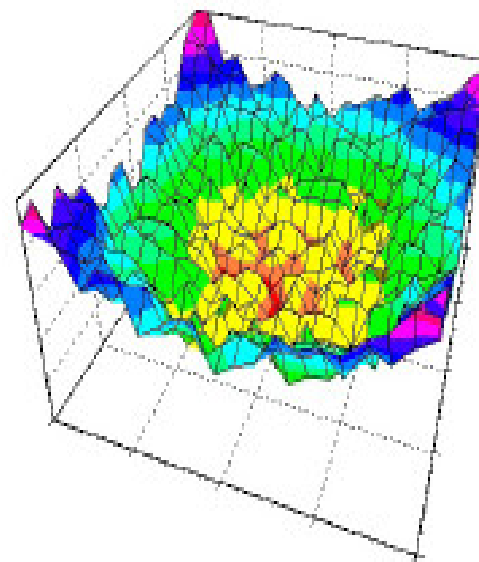
Homológia modellezés II.



Molecular dynamics

Molekuláris dinamika (MD)

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



A „force field“

Baker (2007)

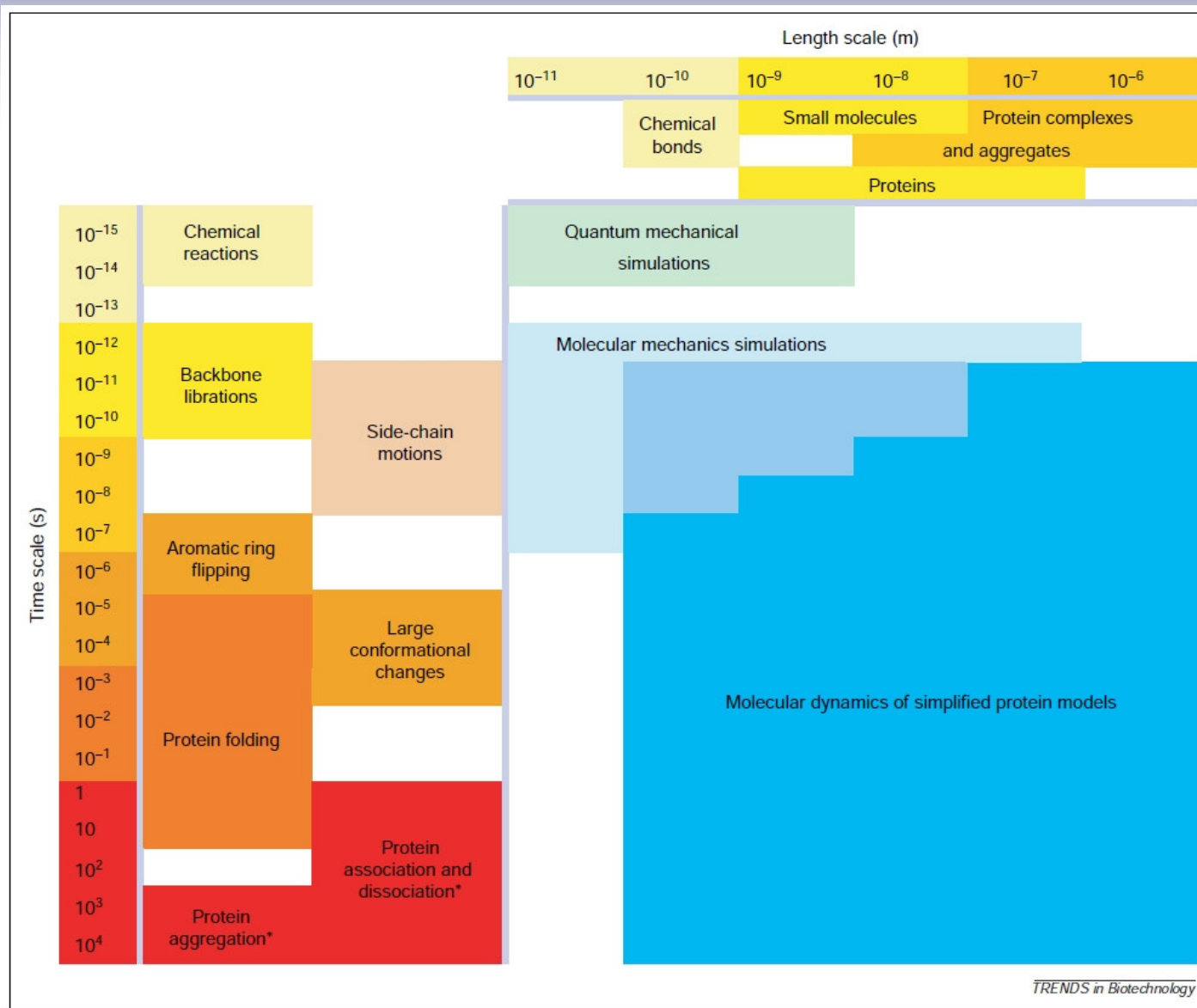
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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

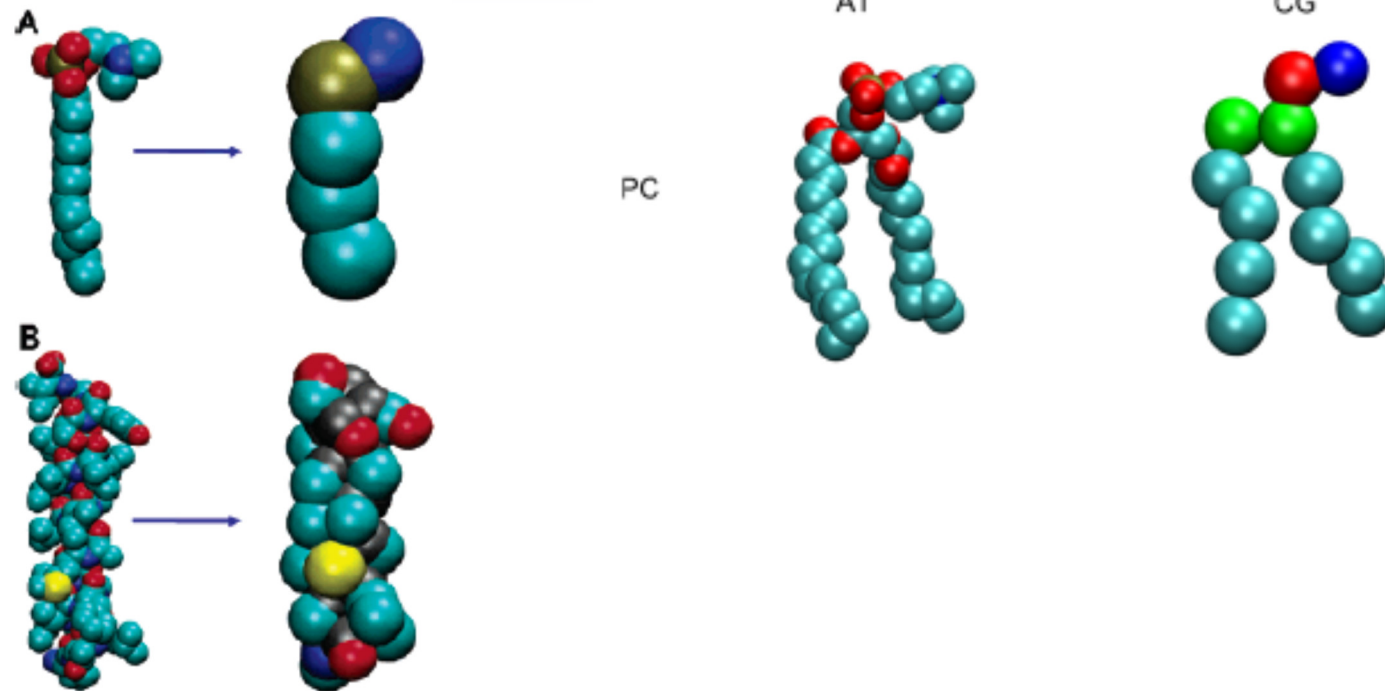
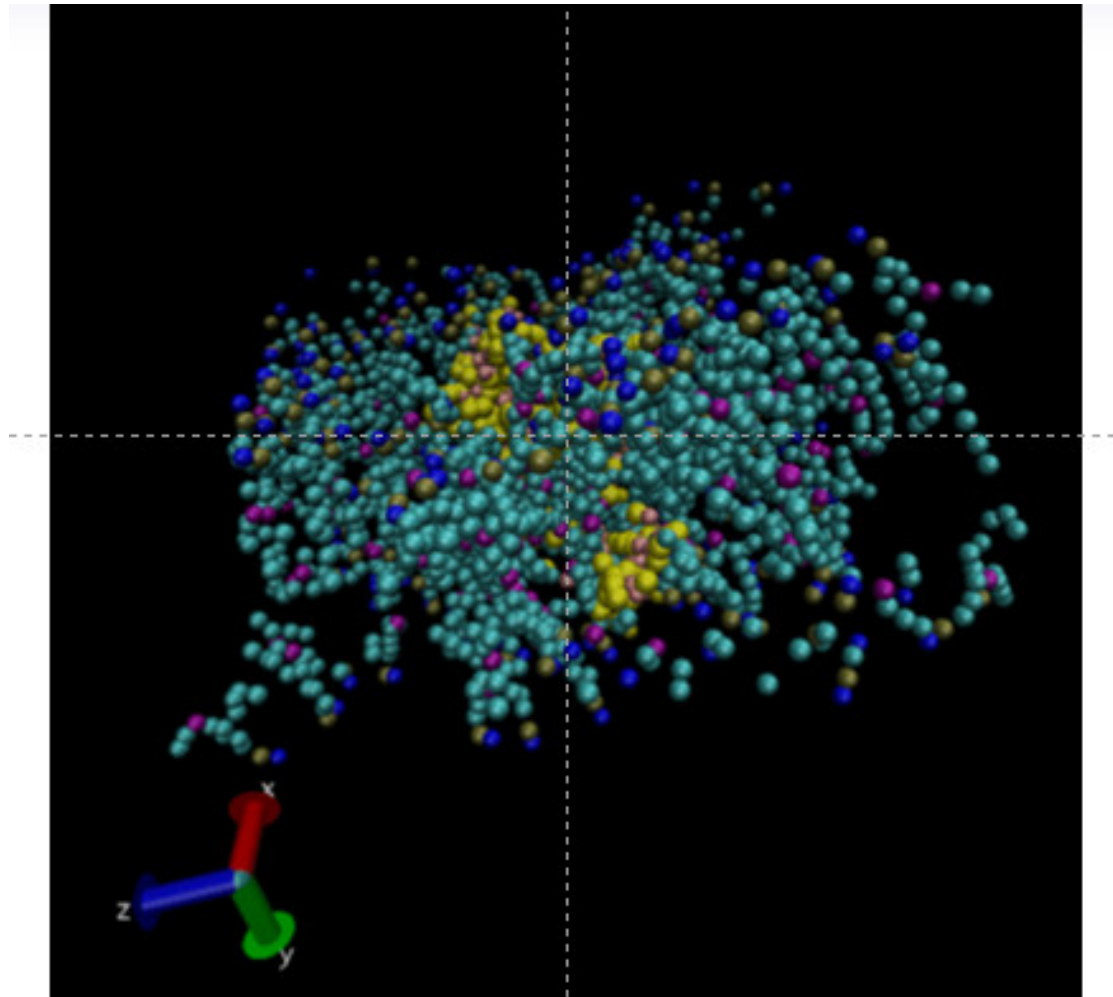


Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

Kettősréteg felépülése a fehérje köré



Lipid struktúrák összeszerelődése

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

Langmuir 2010, 26(7), 4687–4692

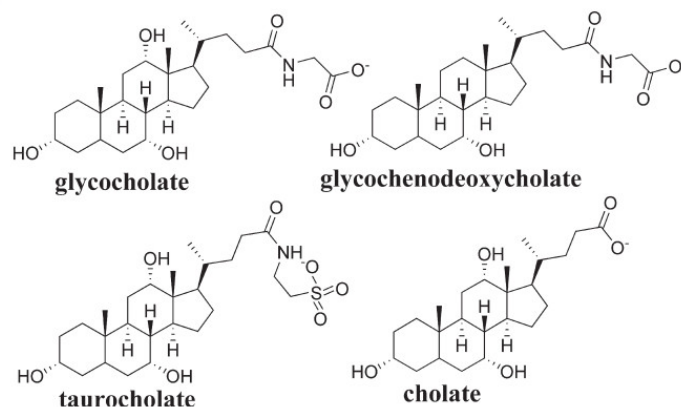
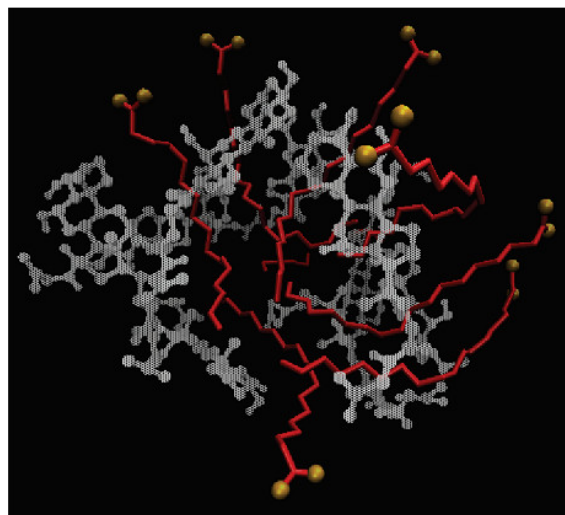
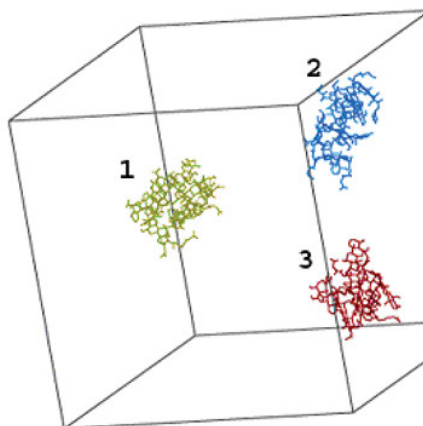
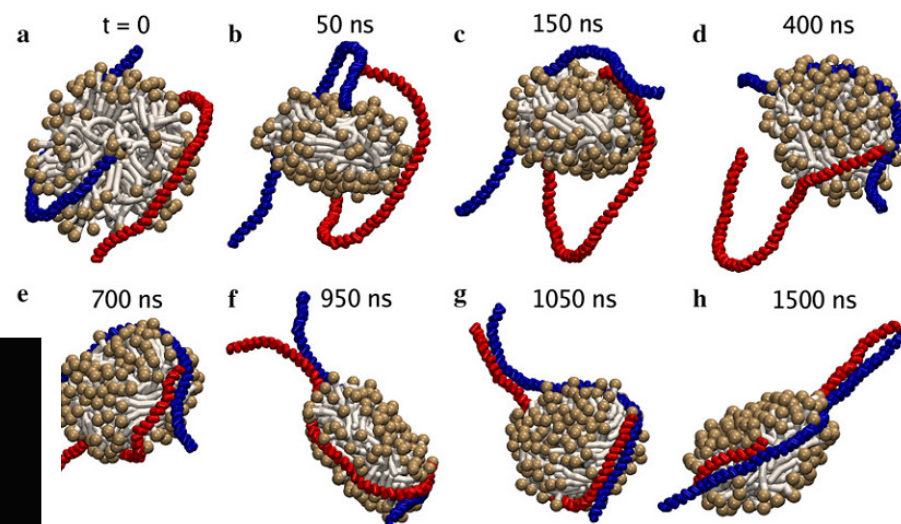


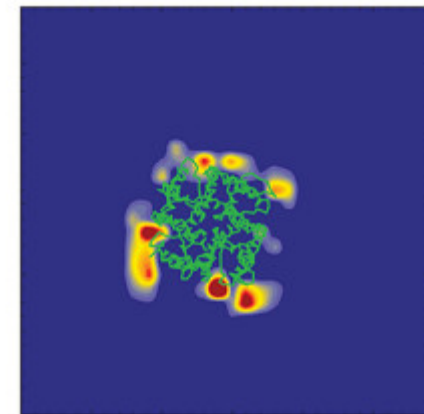
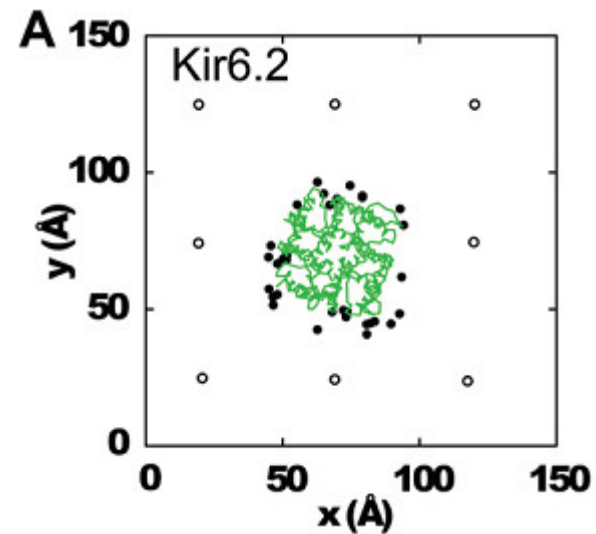
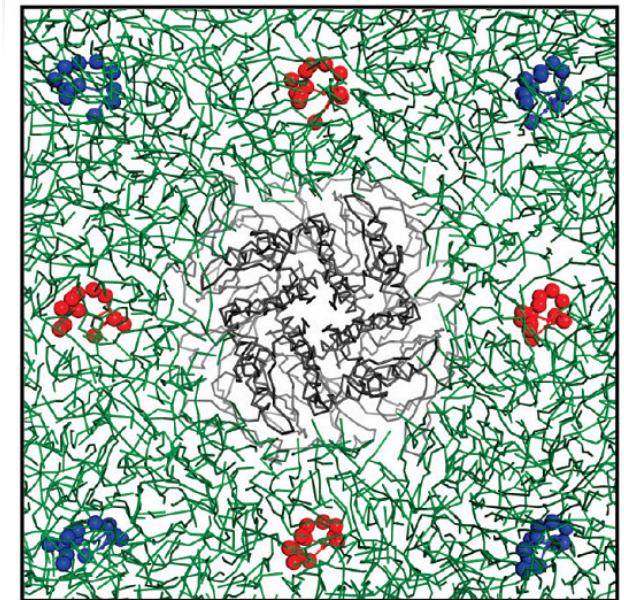
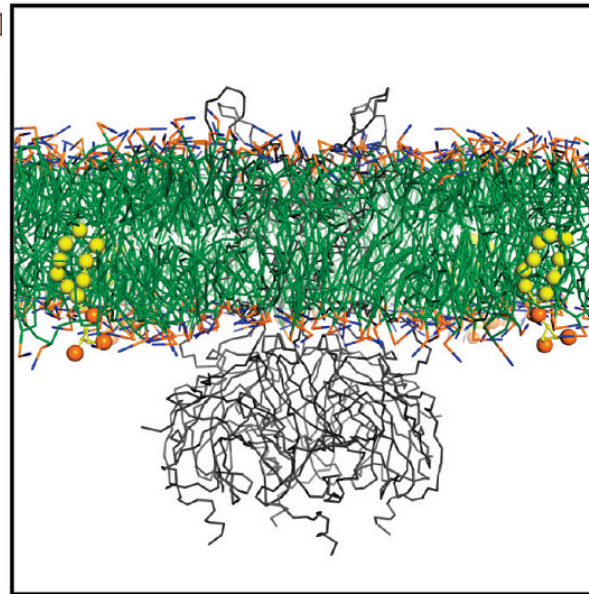
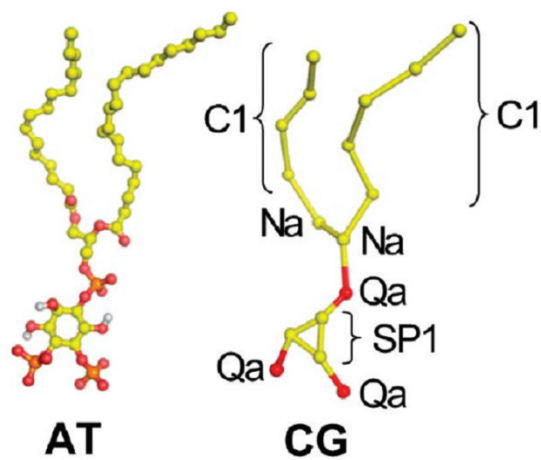
Figure 1. Chemical structures of the four common bile salts: glycocholate, glycochenodeoxycholate, taurocholate, and cholate.

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

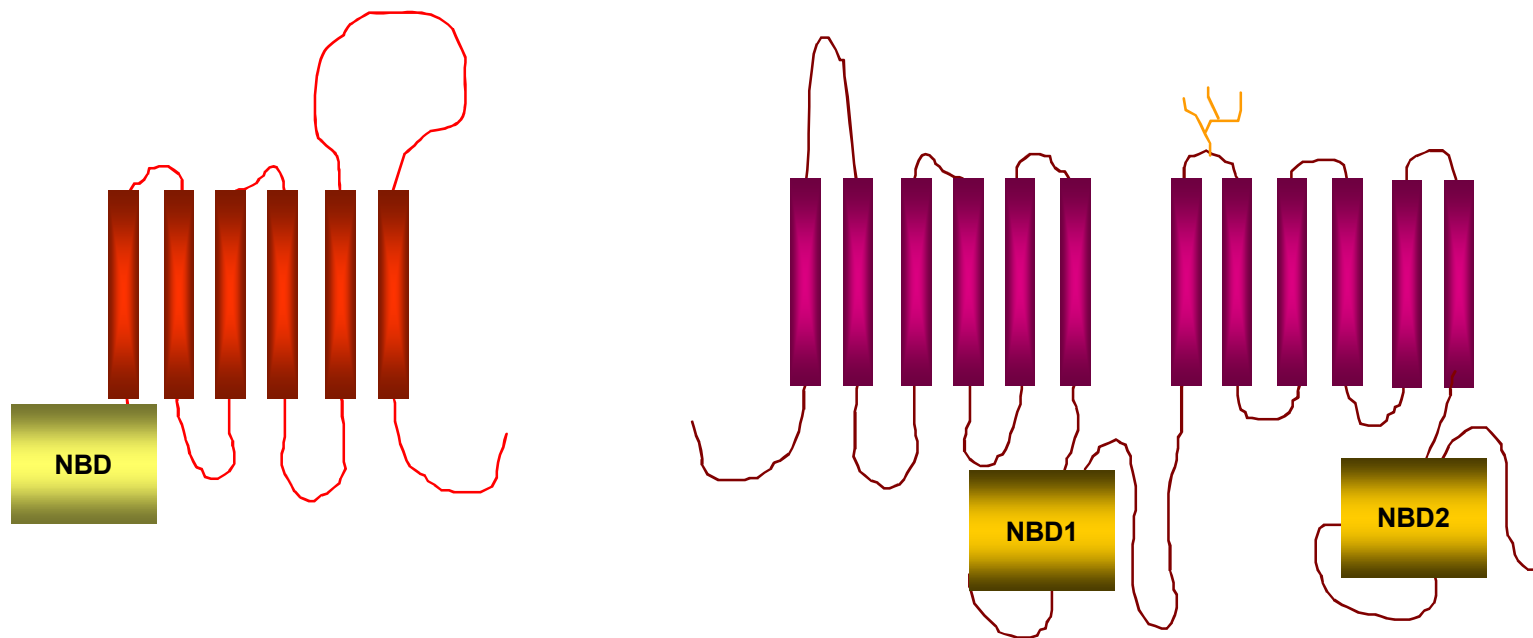


PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

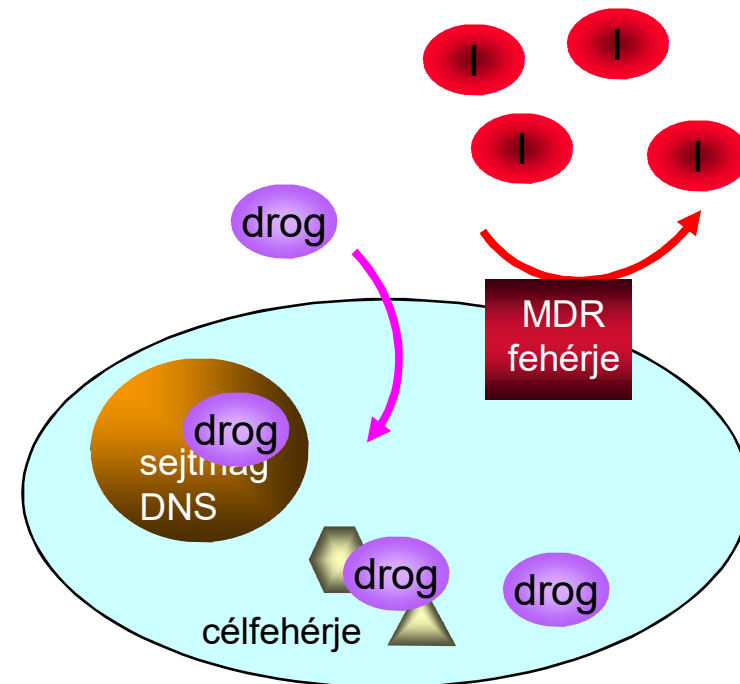
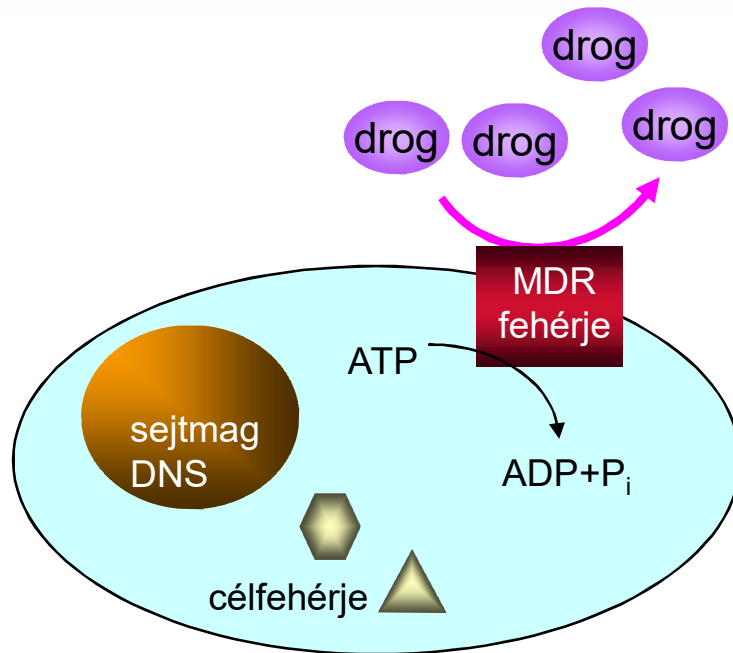
Biochemistry, Vol. 48, No. 46, 2009 1



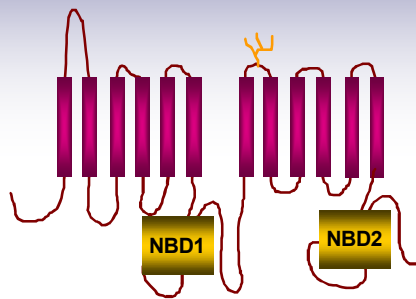
ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése

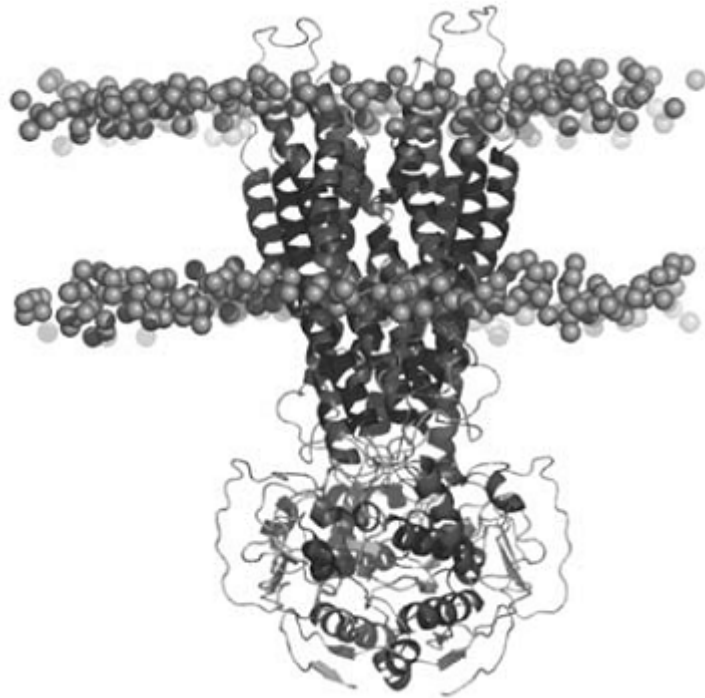


Fehérjék konformációinak stabilitása



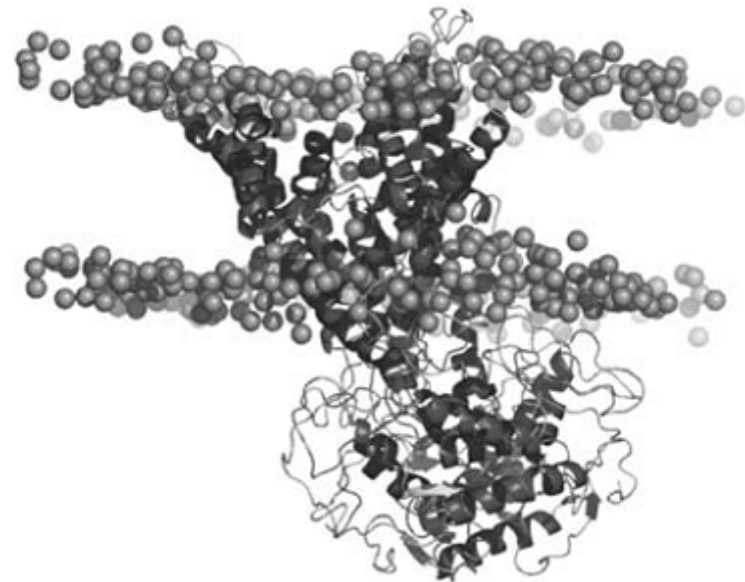
Eur Biophys J (2008) 37:403–409

B



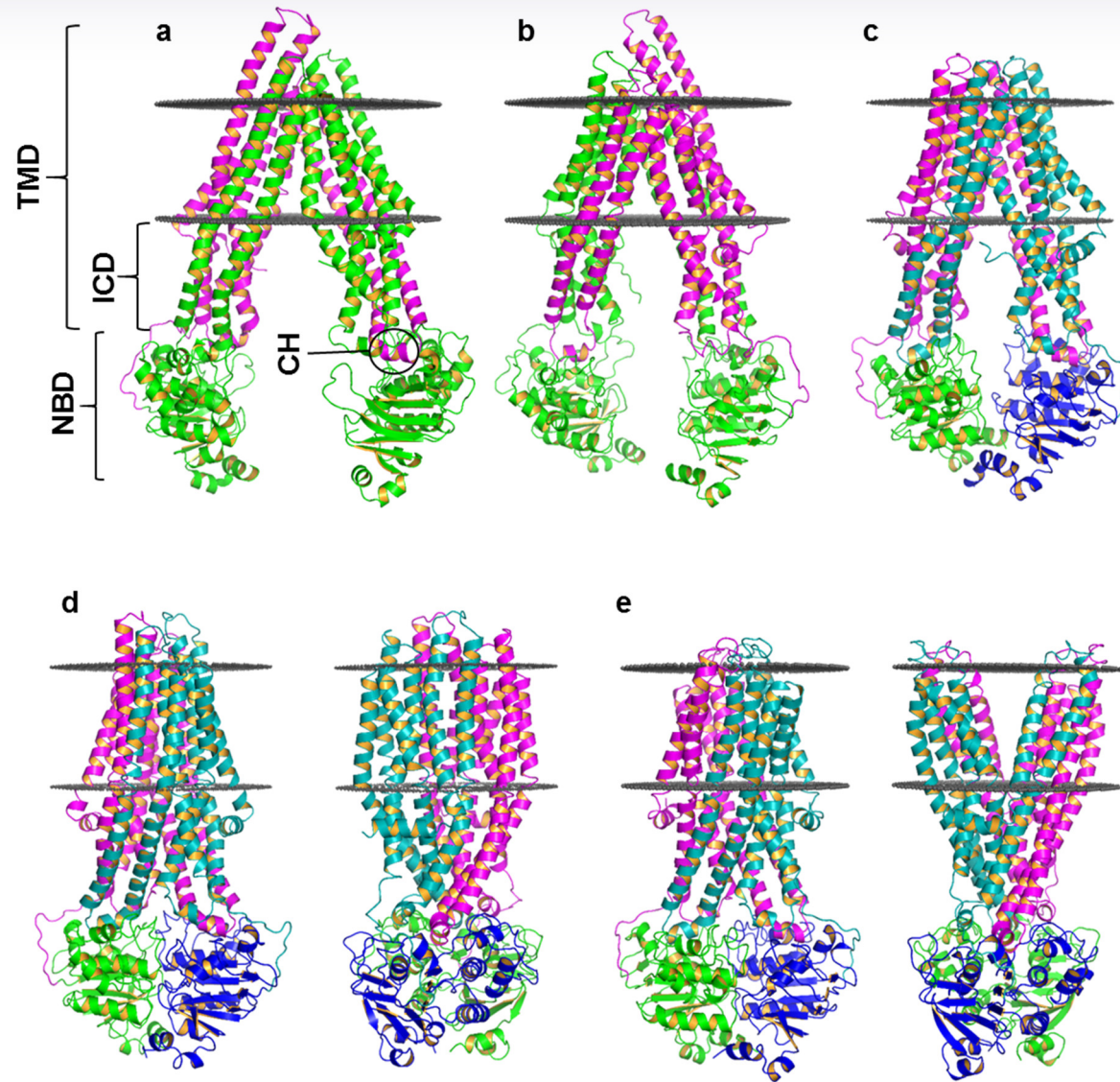
0 ns

C

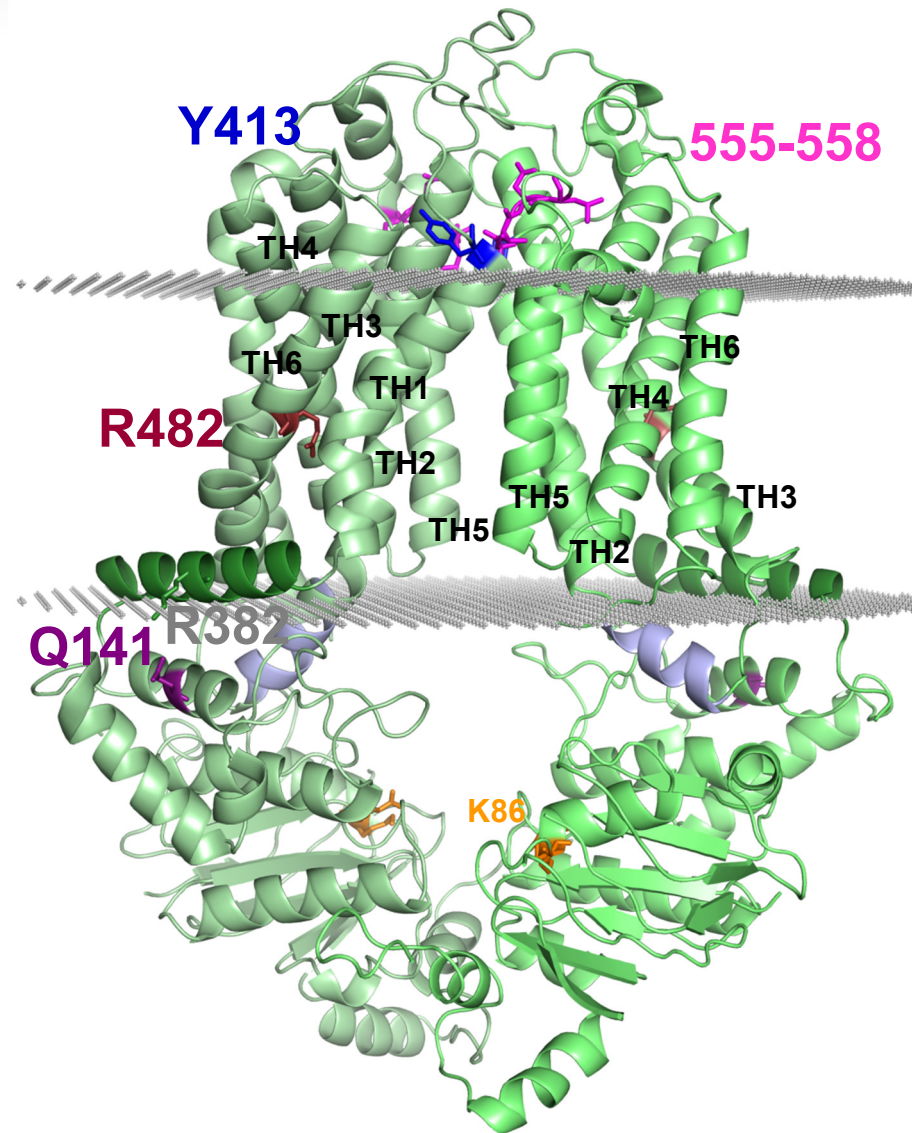


20 ns

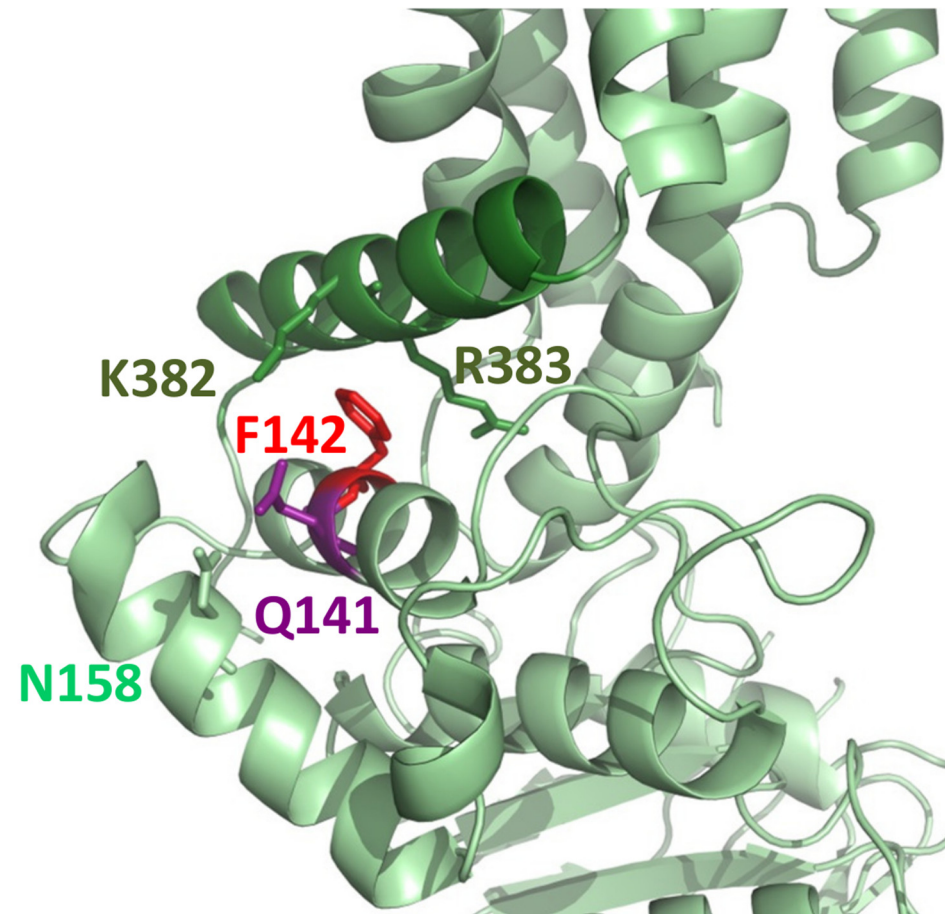
ABC fehérjék konformációi (Type I)



Az ABCG2 modell



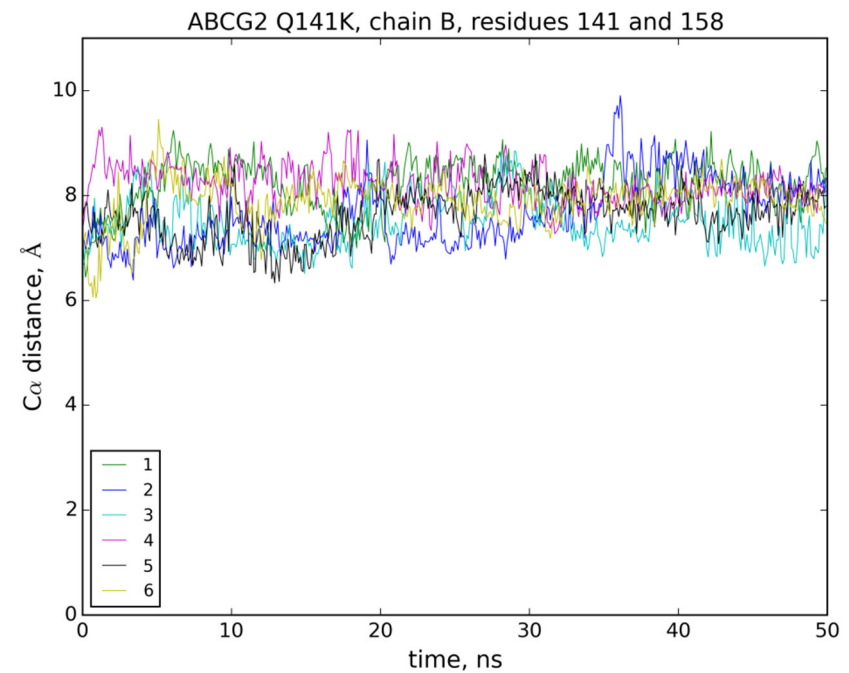
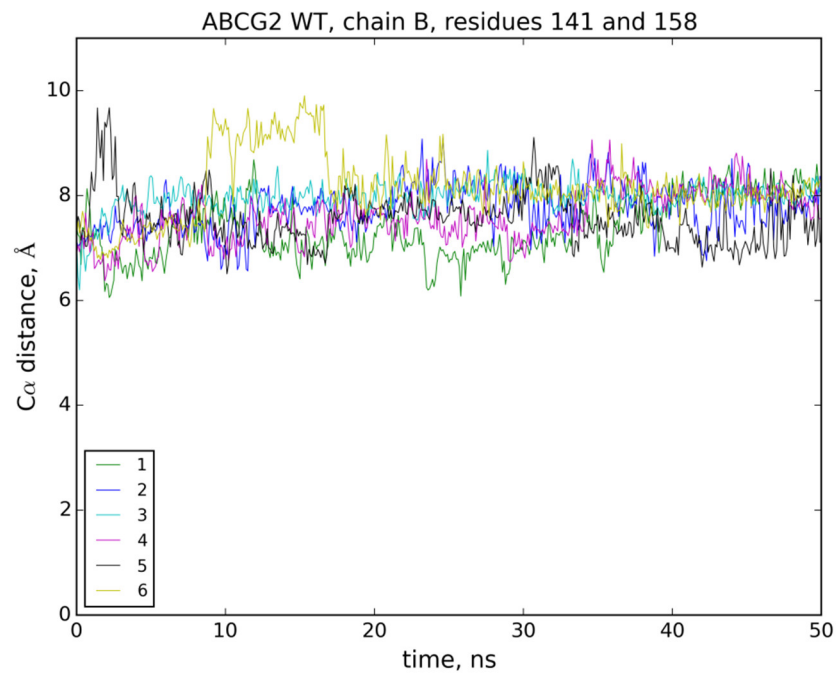
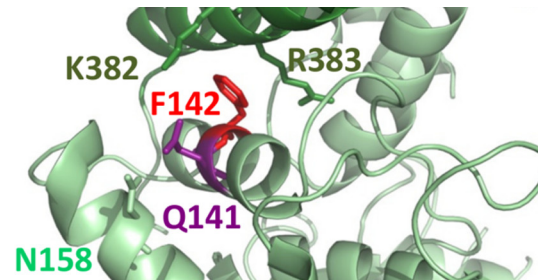
A Q141 helyzete



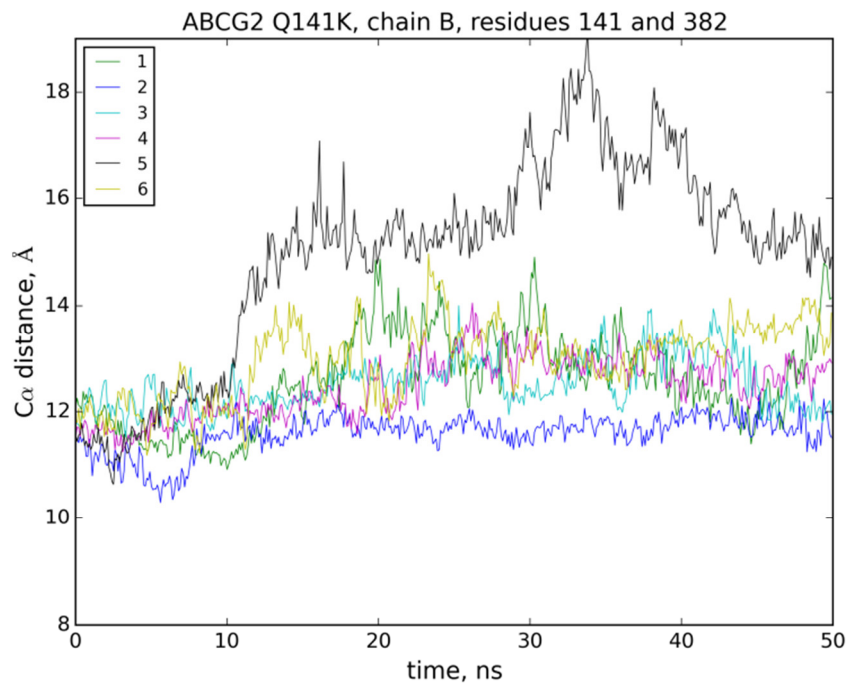
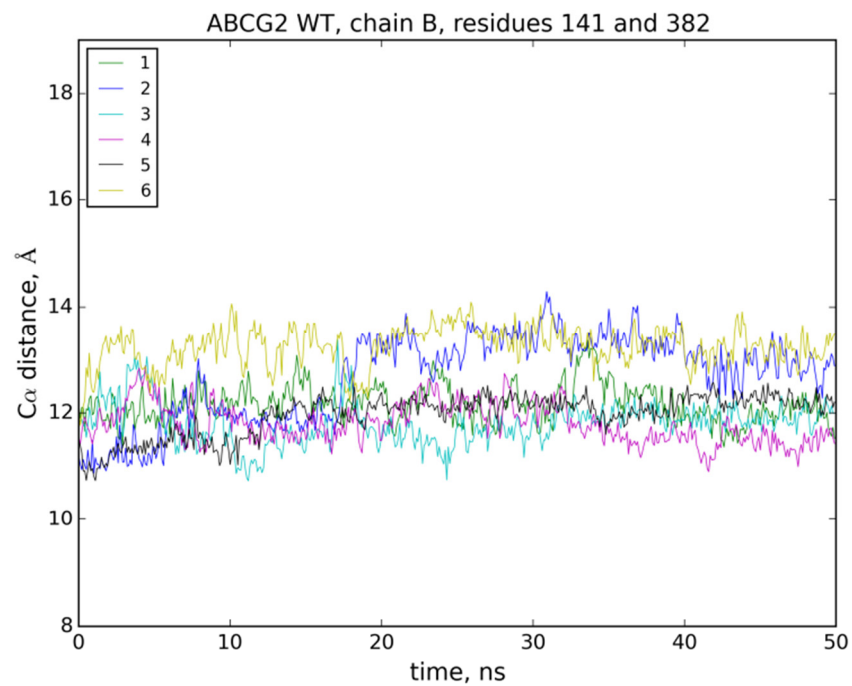
Molekuláris Dinamikai (MD) szimulációk

- 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



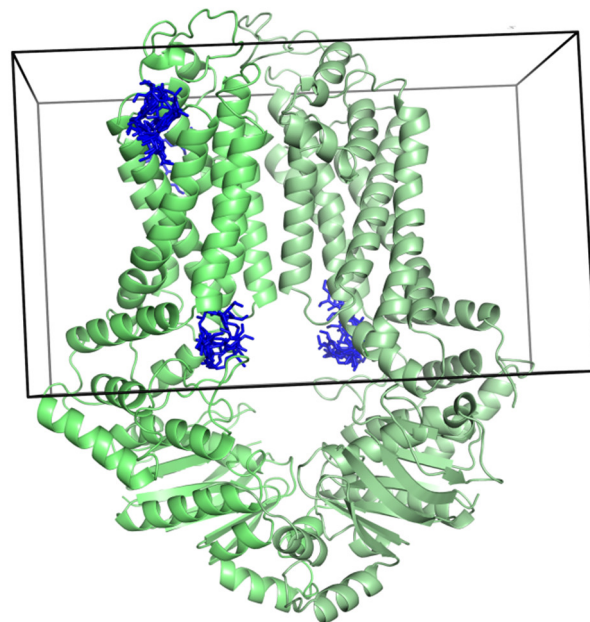
A Q141K hatása a 141/382 (NBD/TMD) kapcsolatra



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)

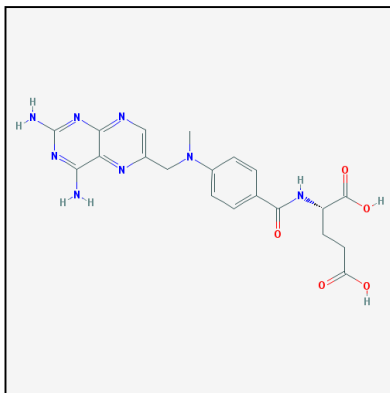


Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

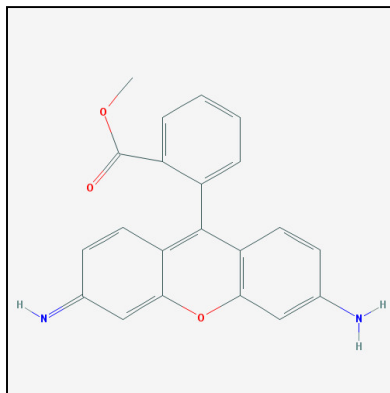
AutoDock Vina

- 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

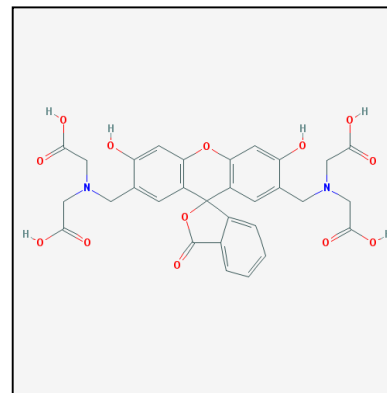
methotrexate



rhodamine123



calcein



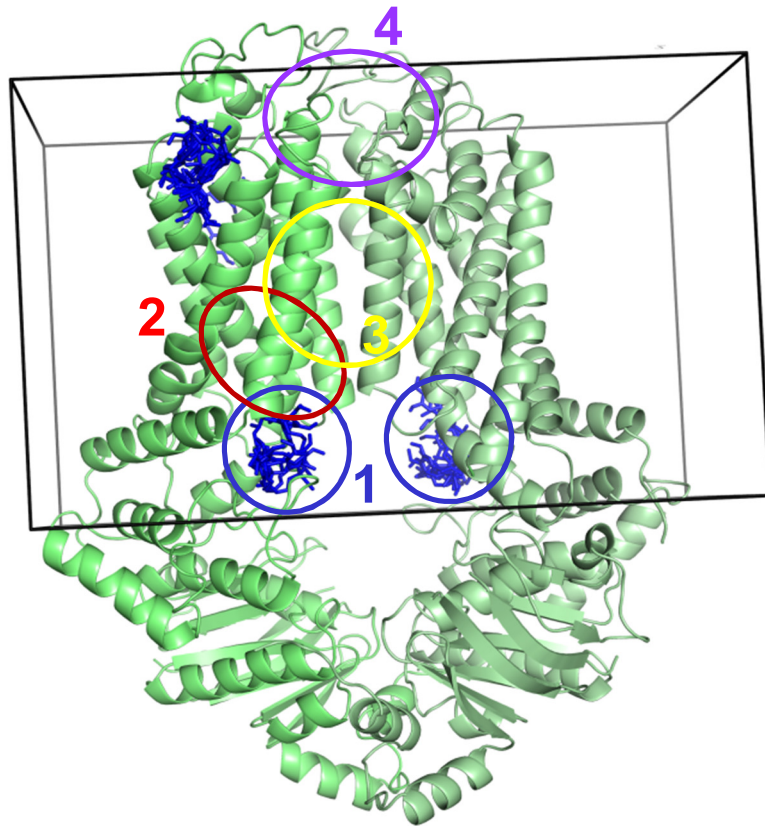
Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

AutoDock Vina

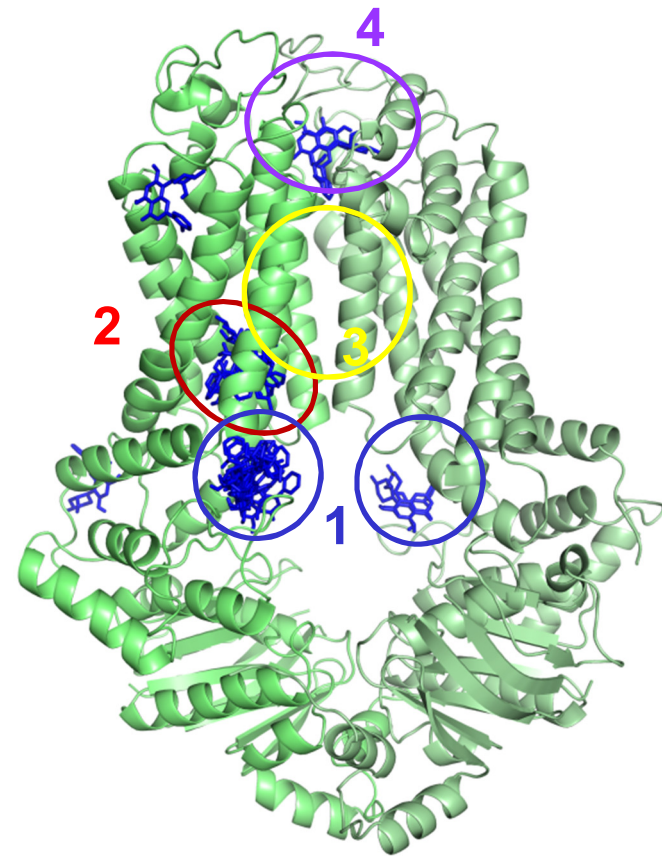
- Fix fehérje, flexibilis ligand
- Több konformáció (6 db, egyensúlyba hozott)
- Doboz; ligand odapróbálása nagyon sokszor (ebből 20/futás)
- Mindent oda lehet dokkolni... ezért szubsztrát + nemszubsztrát
- (6 ABCG2 konformáció) * (20 pozitúra) * (3 párhuzamos) *
(25 szubsztrát + 14 nem-szubsztrát) =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

Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

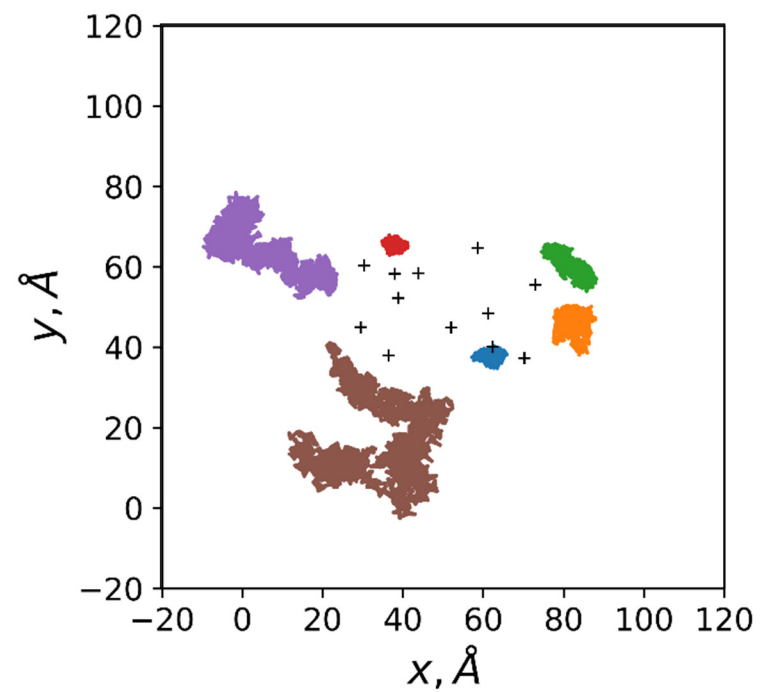
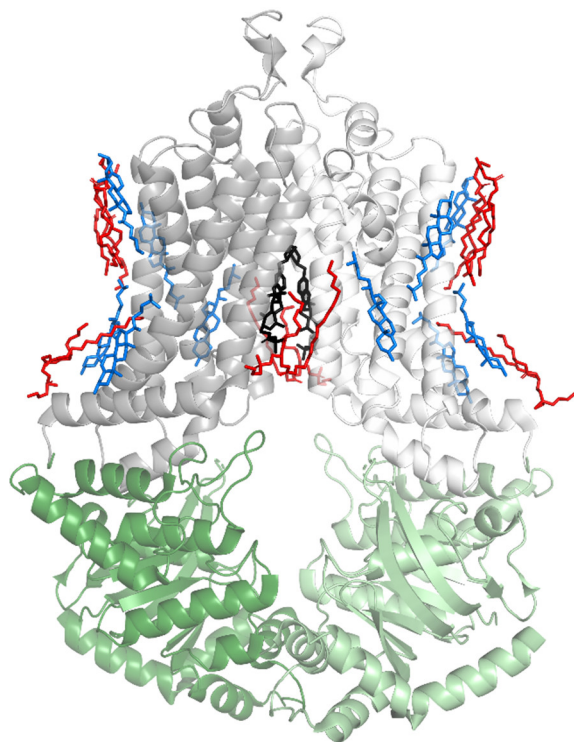
verapamil



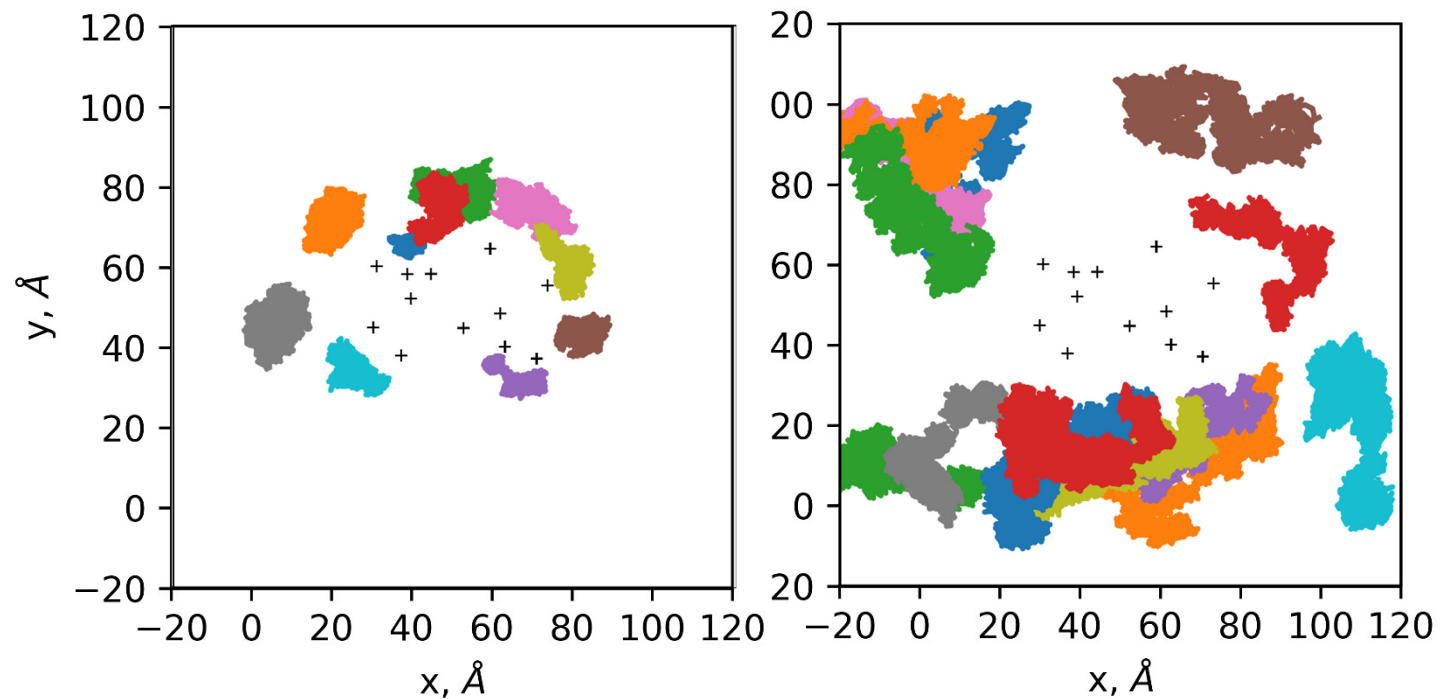
flavopiridol



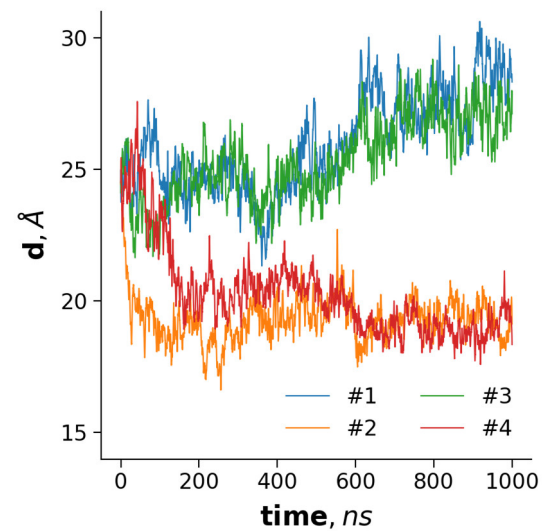
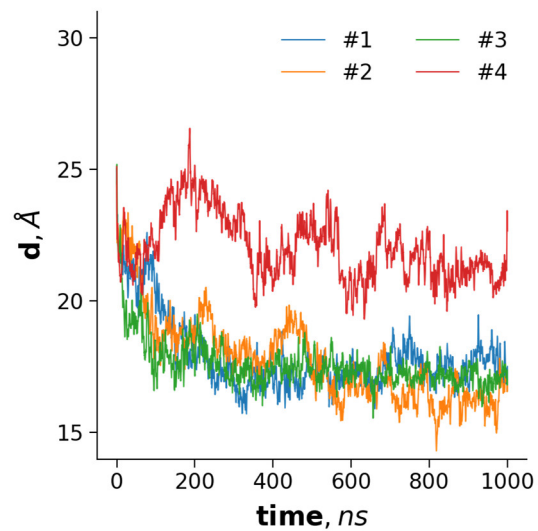
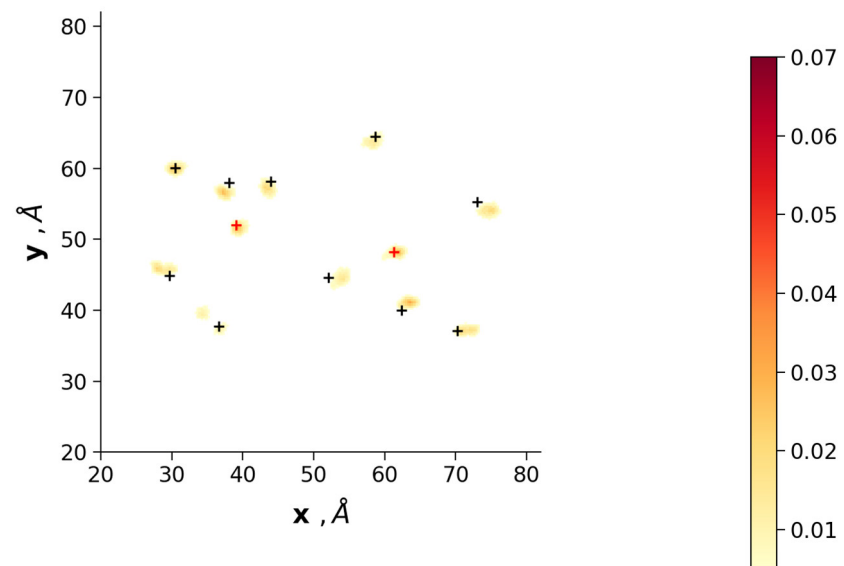
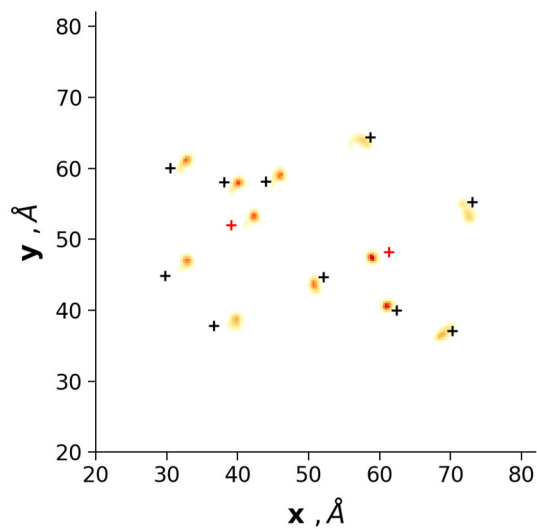
A koleszterin-hatás



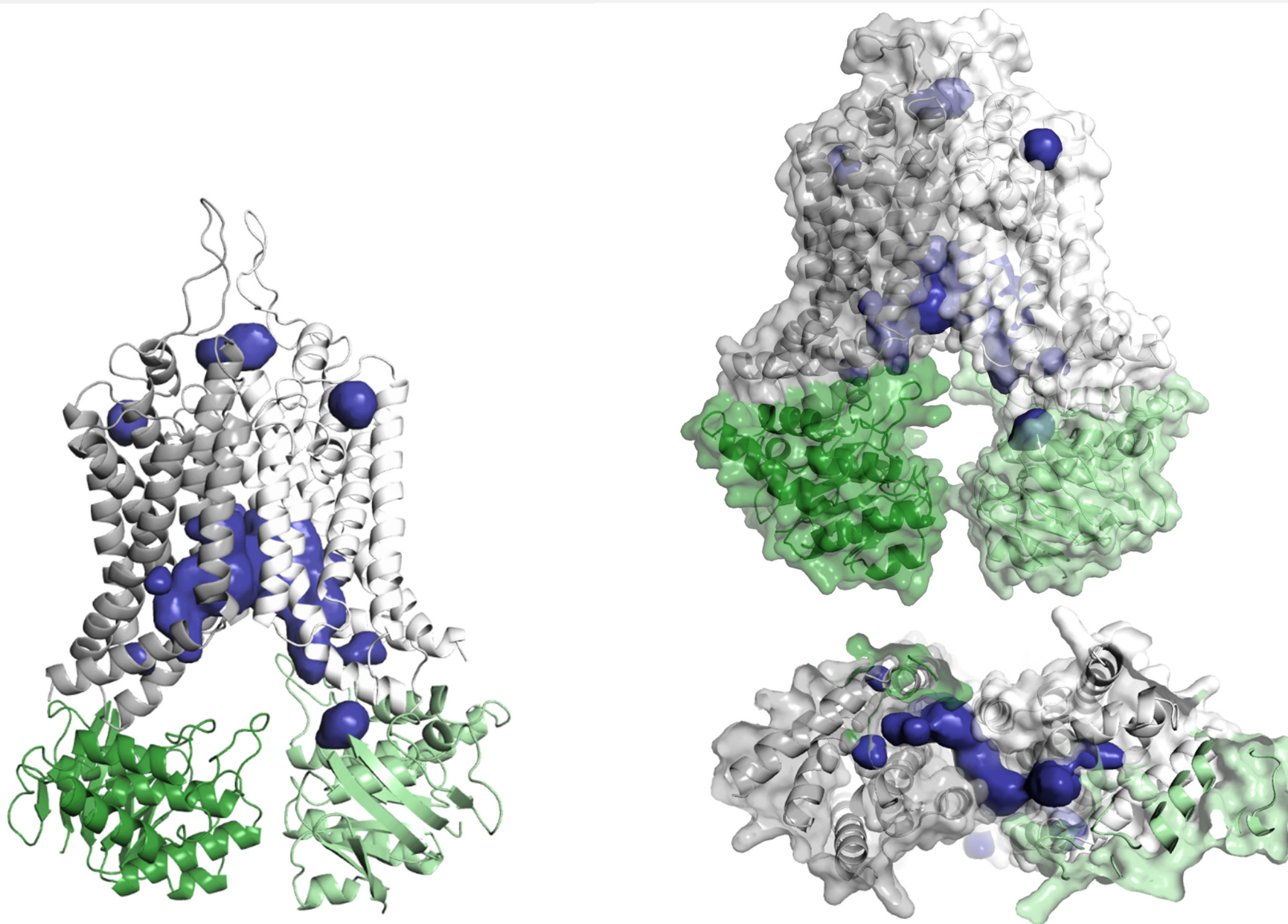
MD szimulációk POPC:CHOL membránban



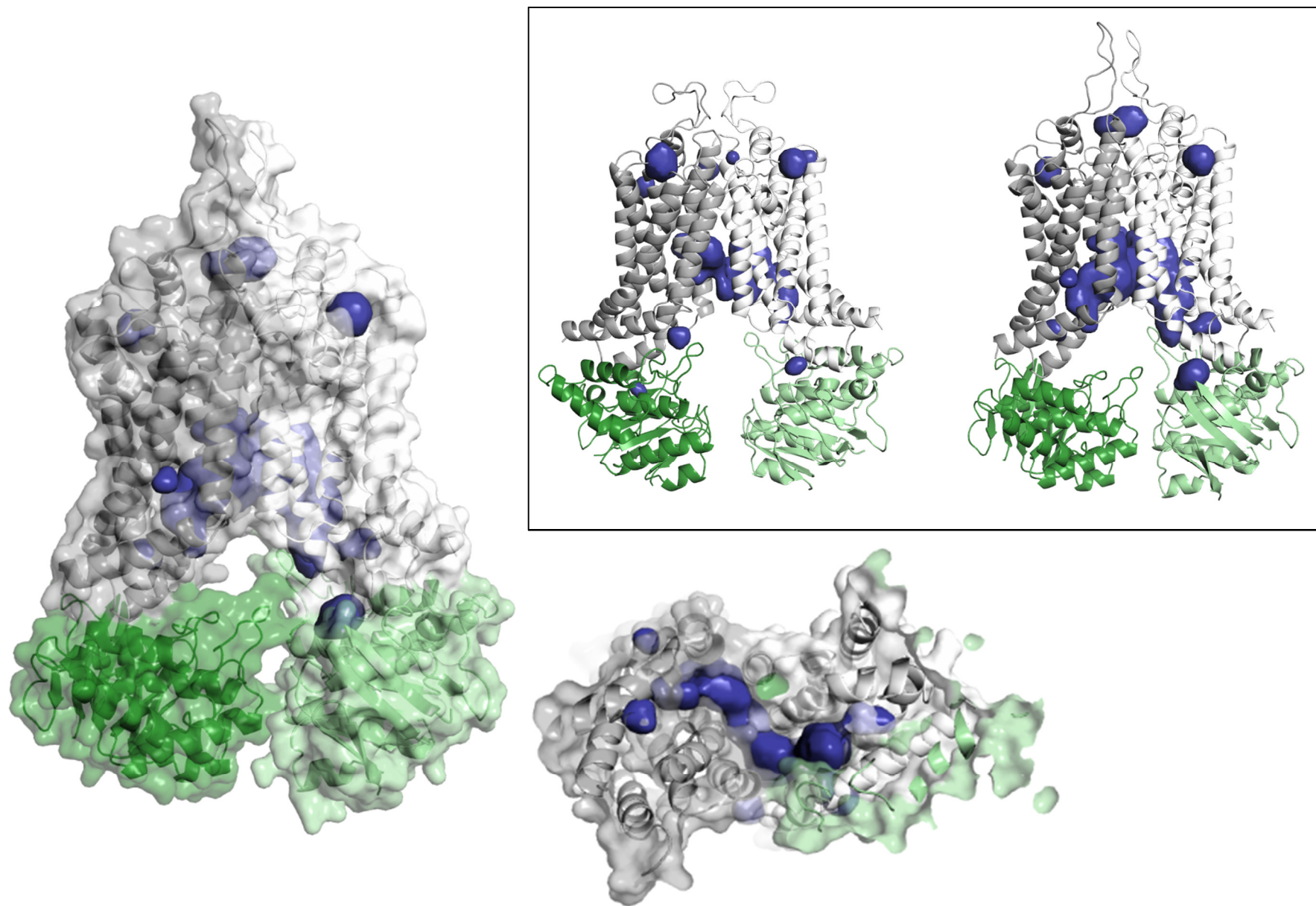
A koleszterin elősegíti a transzportot megelőző záródást



A drog-kötő zsebek dinamikus változása



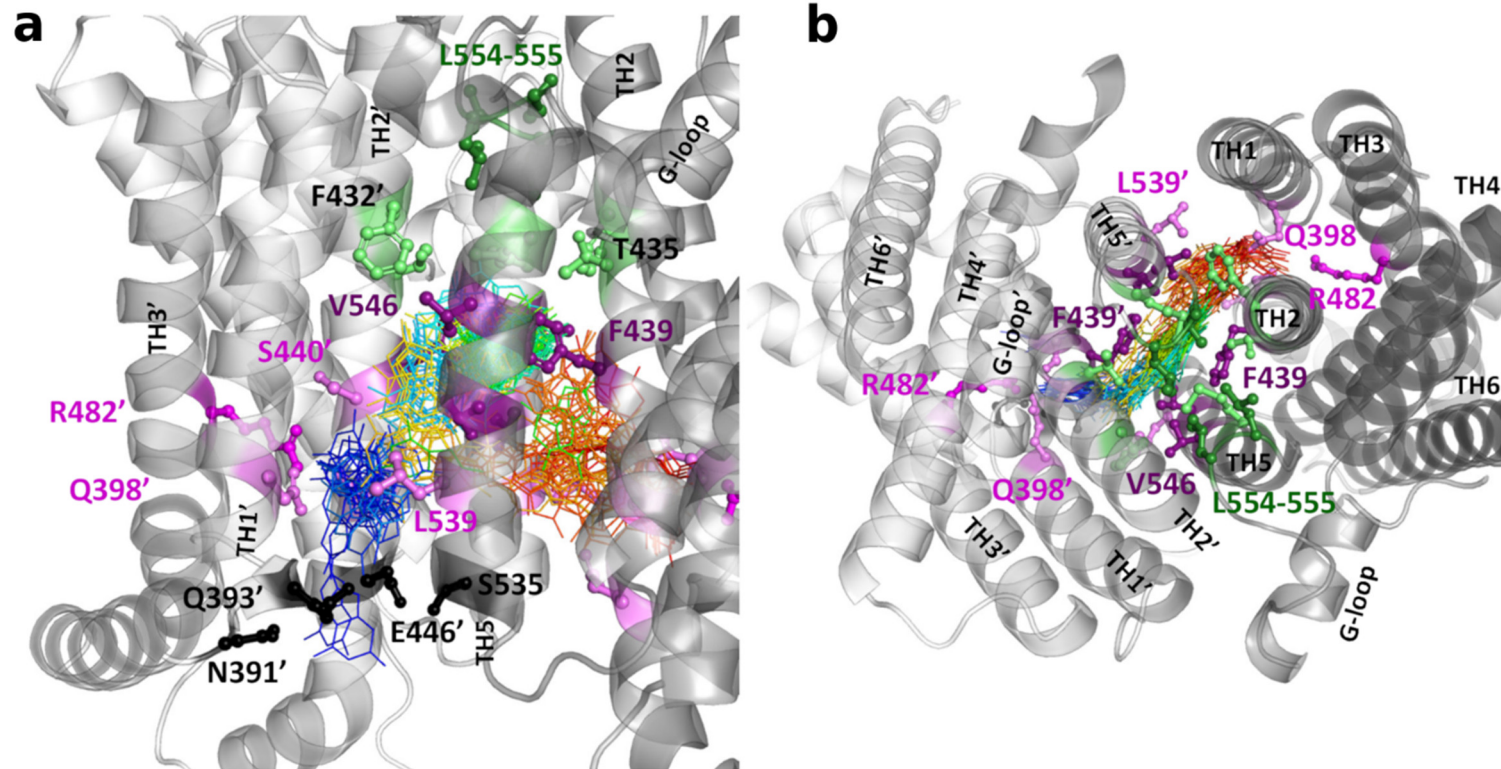
A drog-kötő zsebek dinamikus változása



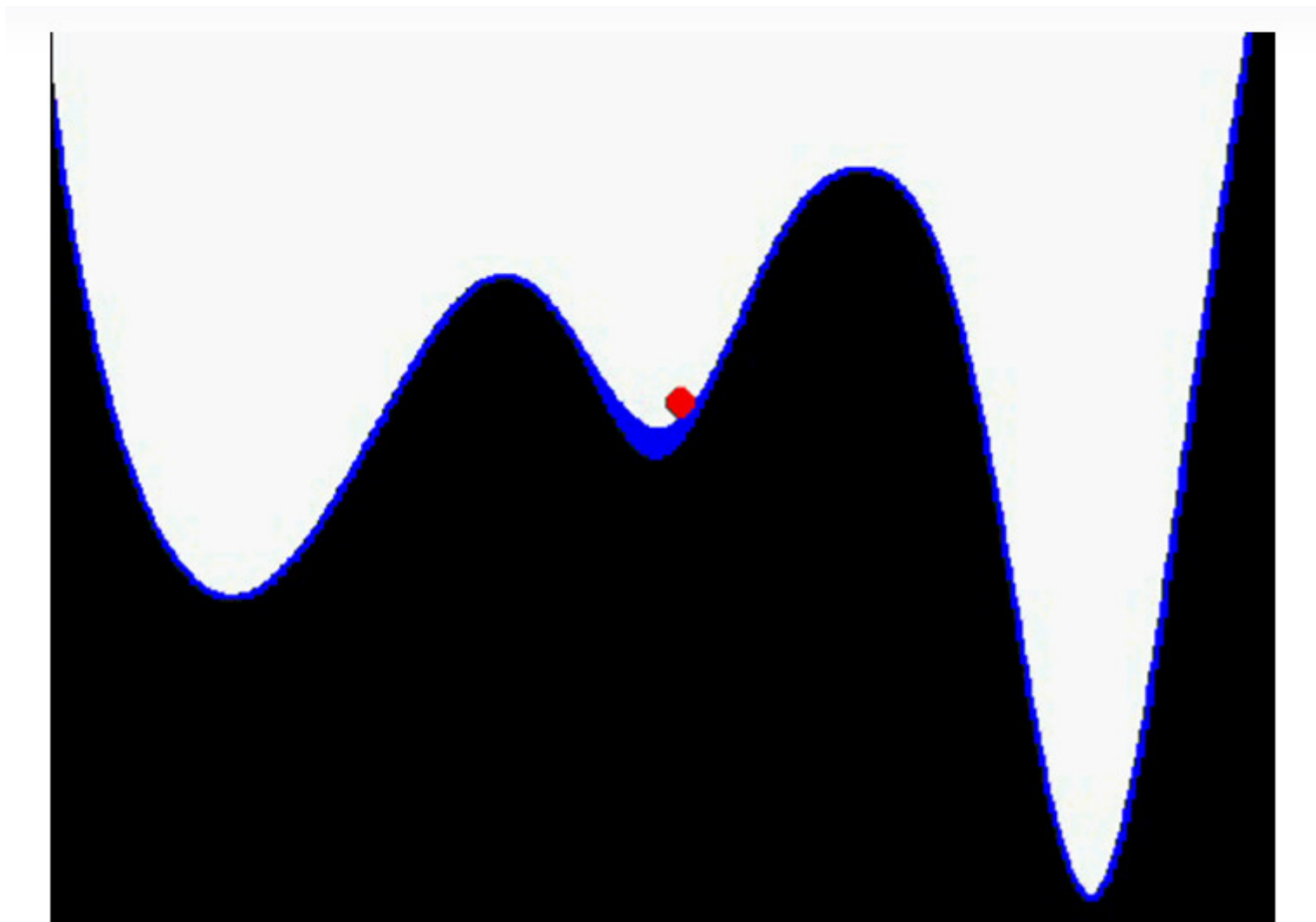
A transzport leírása egyensúlyi szimulációkkal



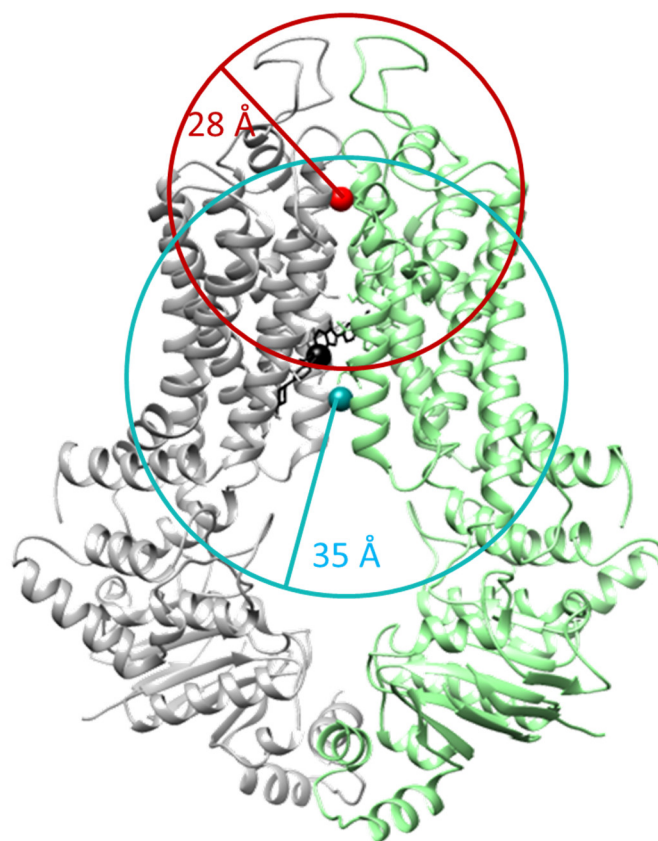
A transzport leírása egyensúlyi szimulációkkal



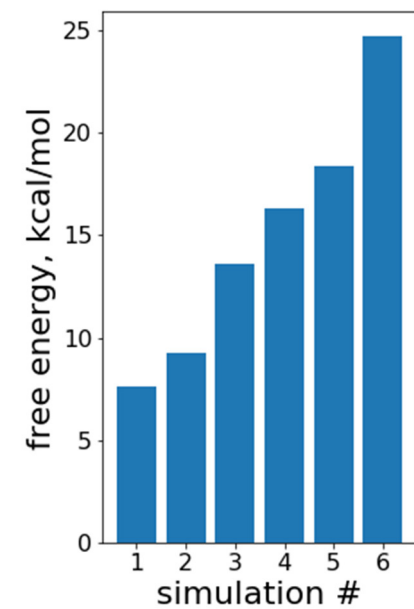
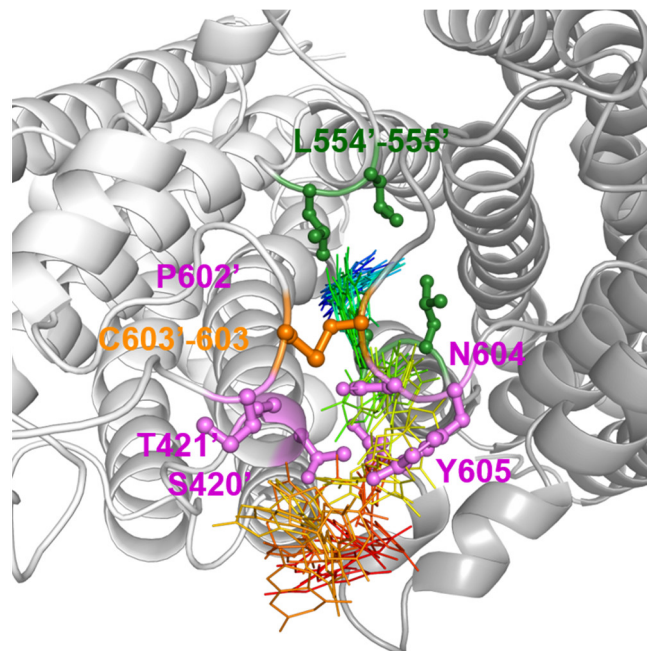
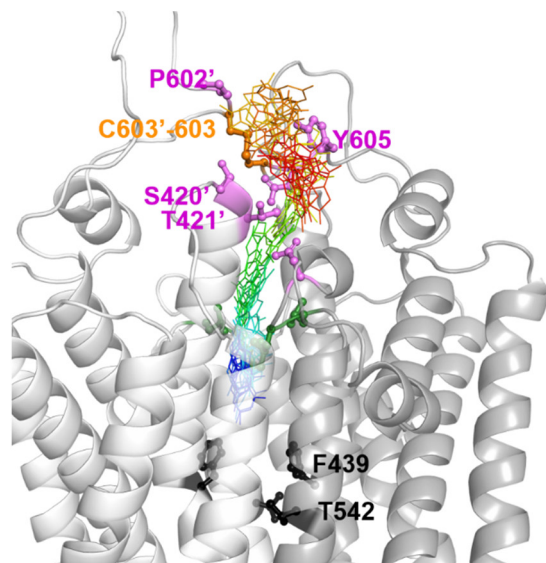
A „exit” jellemzése metadinamikával



Az „exit” jellemzése metadinamikával



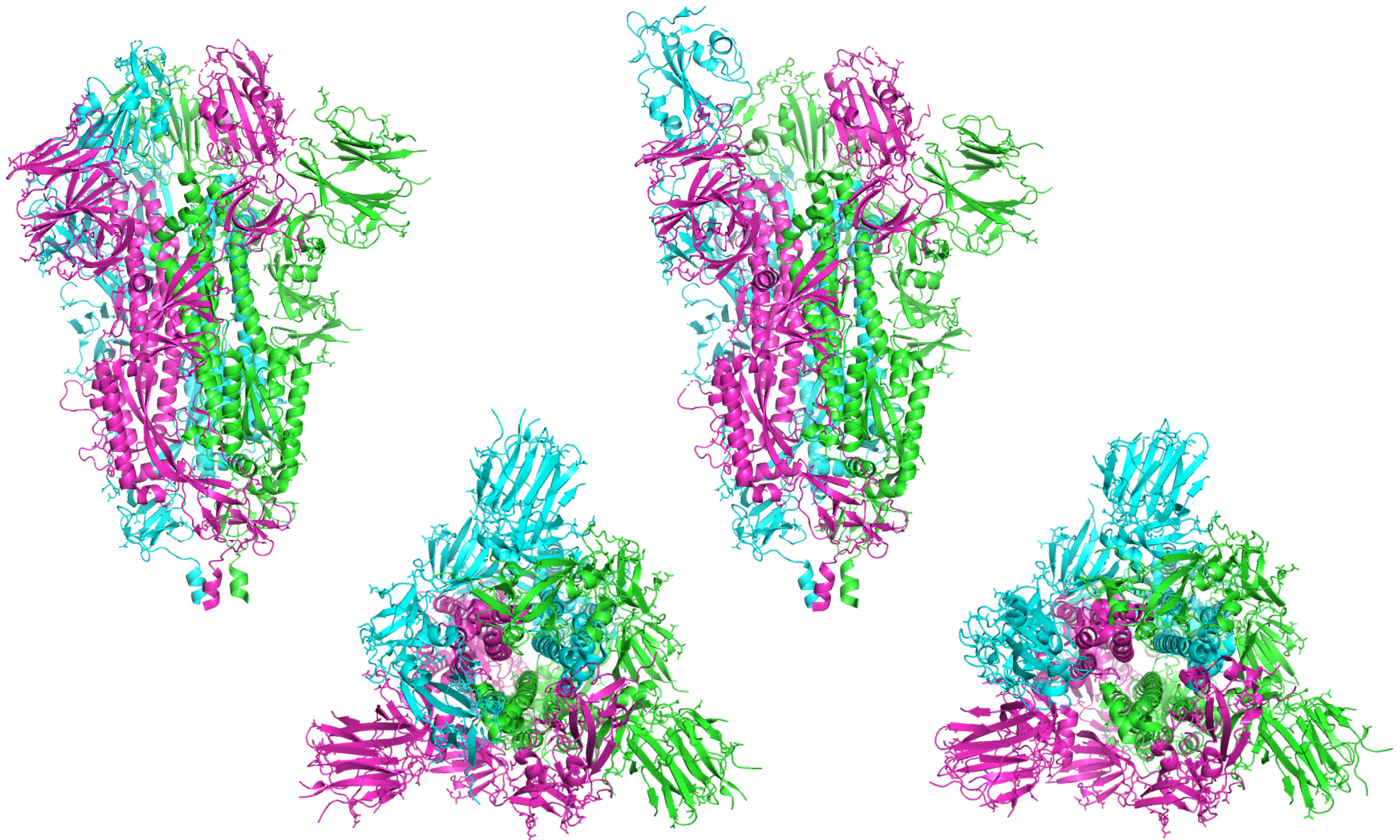
A „exit” jellemzése metadinamikával



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
- Számításos módszerek igen fontosak
- Fehérjék működésének és mutációk hatásának megismerése
- Gyógyszertervezés

www.hegelab.org
hegedus.tamas@hegelab.org