

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

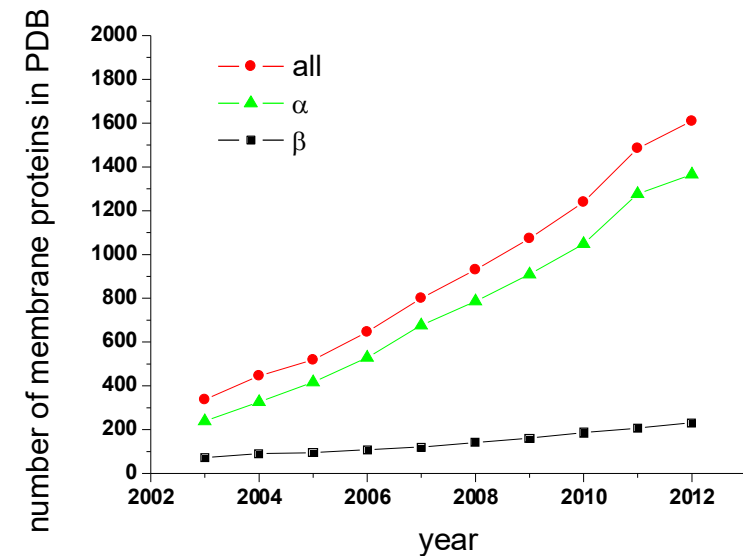
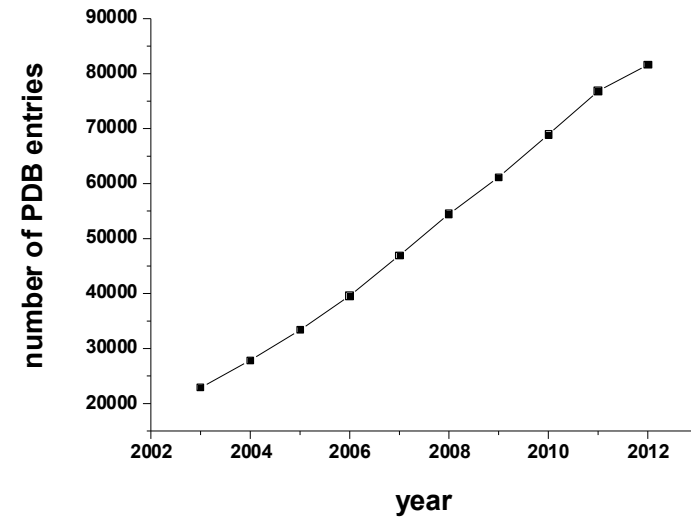
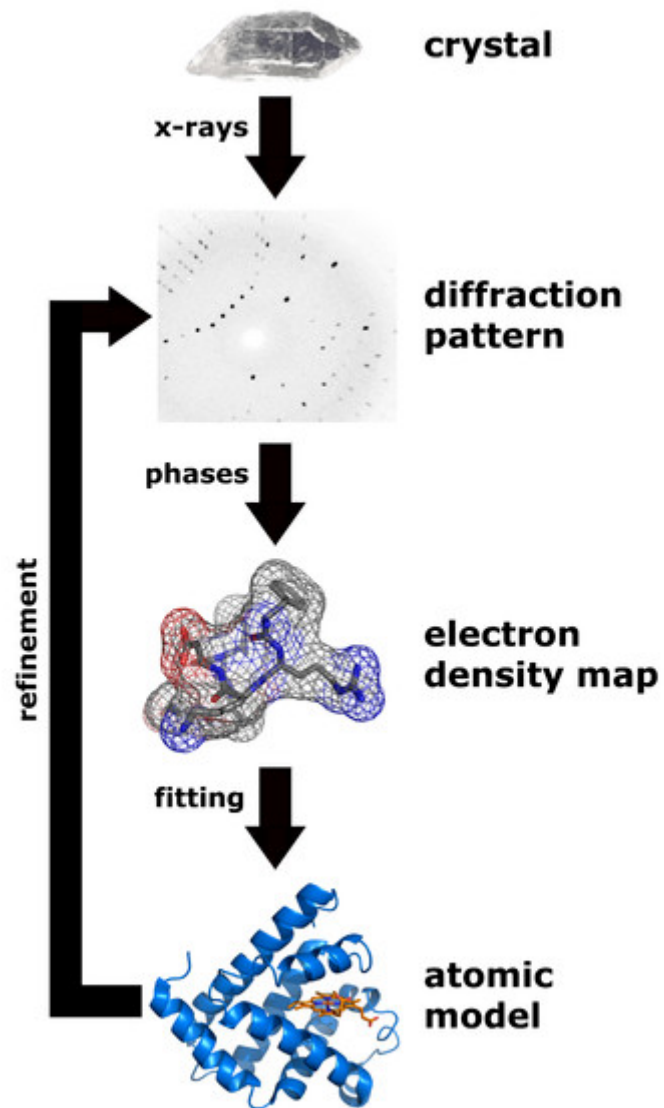
Atomi szintű információt ad mozgásokról.

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

Membránfehérjék szerkezeti modellezése

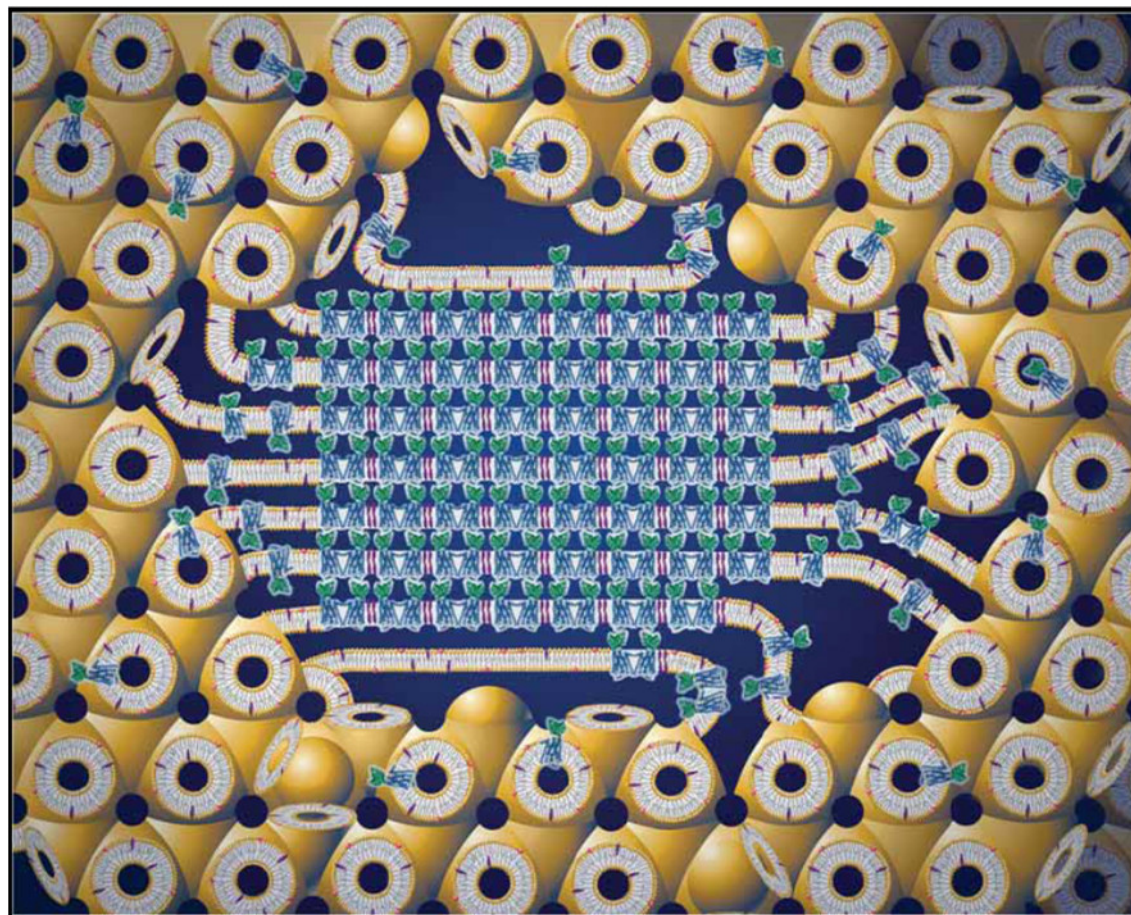
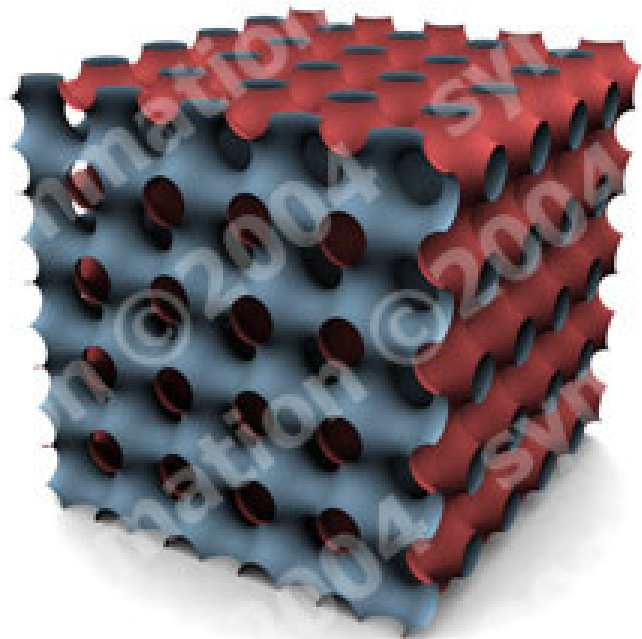
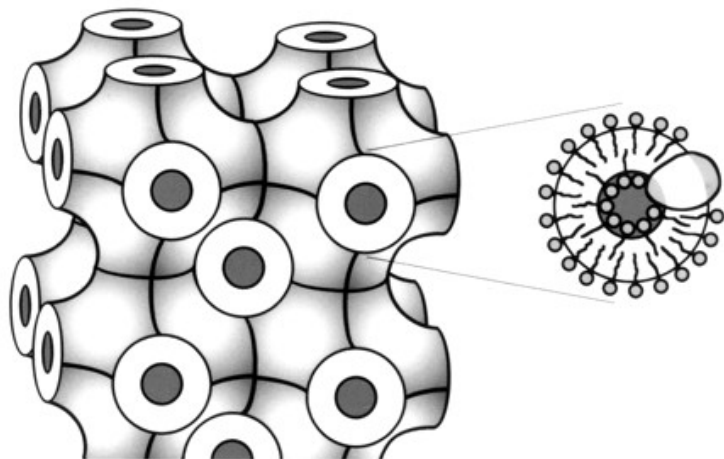
- Kísérleti adatok alapján
- Homológia modellezés
- „Threading” vagy ”fold recognition”

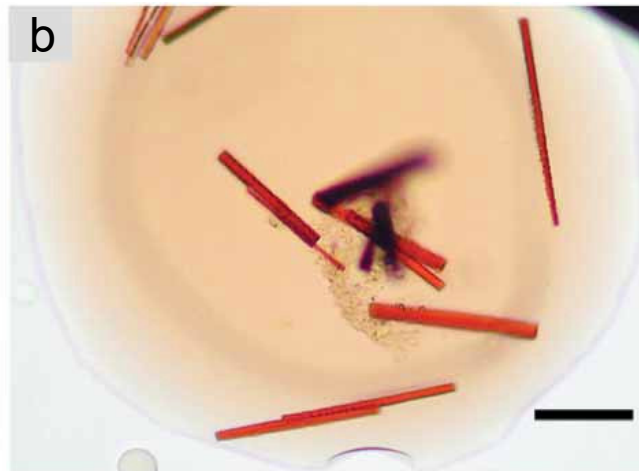
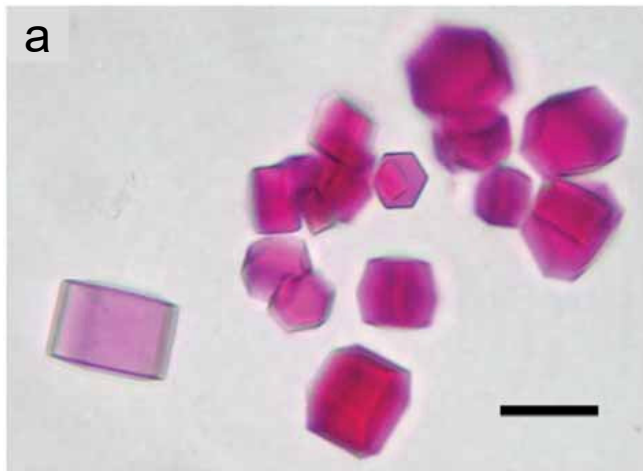
Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



Szerkezet meghatározás – cubic phase

monoolein/water





Crystals of membrane proteins growing in the lipidic mesophase.

(a) bacteriorhodopsin

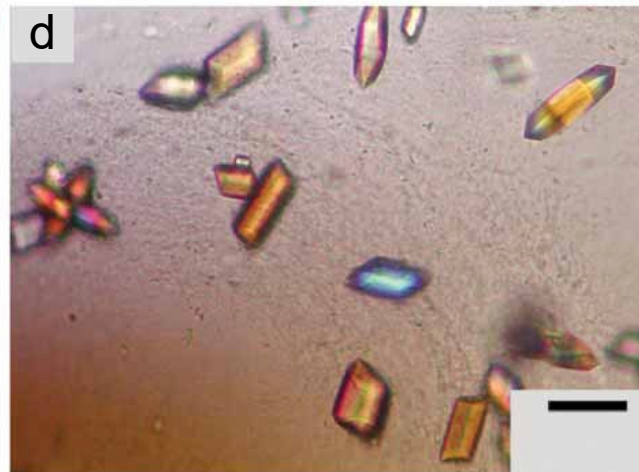
(b) light-harvesting complex II

(c) adhesin/invasin OpcA

(d) vitamin B12 transporter
BtuB

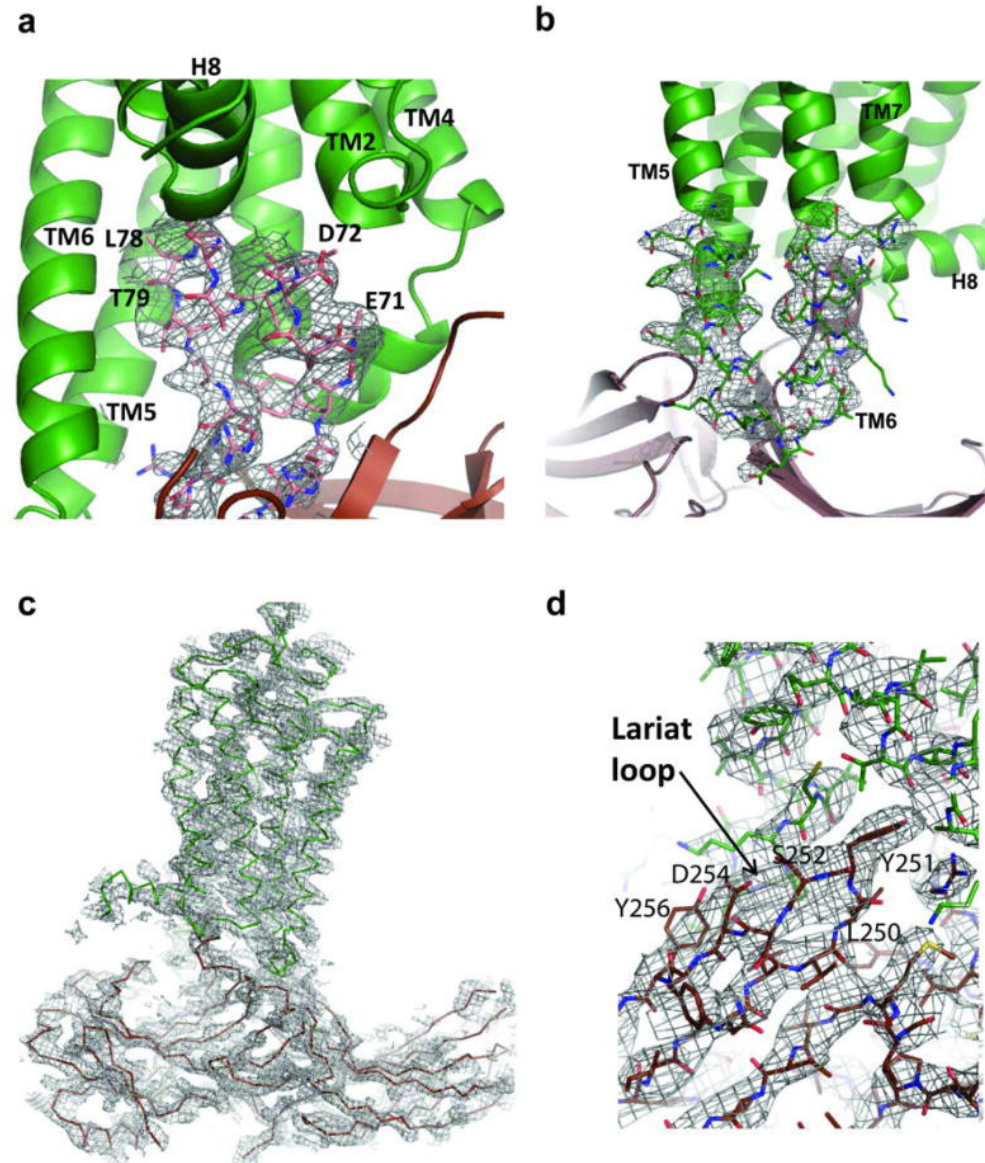
(e) human $\beta 2$ adrenergic
receptor-T4 lysozyme
chimera

(f) carbohydrate transporter
from *Pseudomonas*



Szerkezet meghatározás – „single particle”

Free Electron Laser (FEL)



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

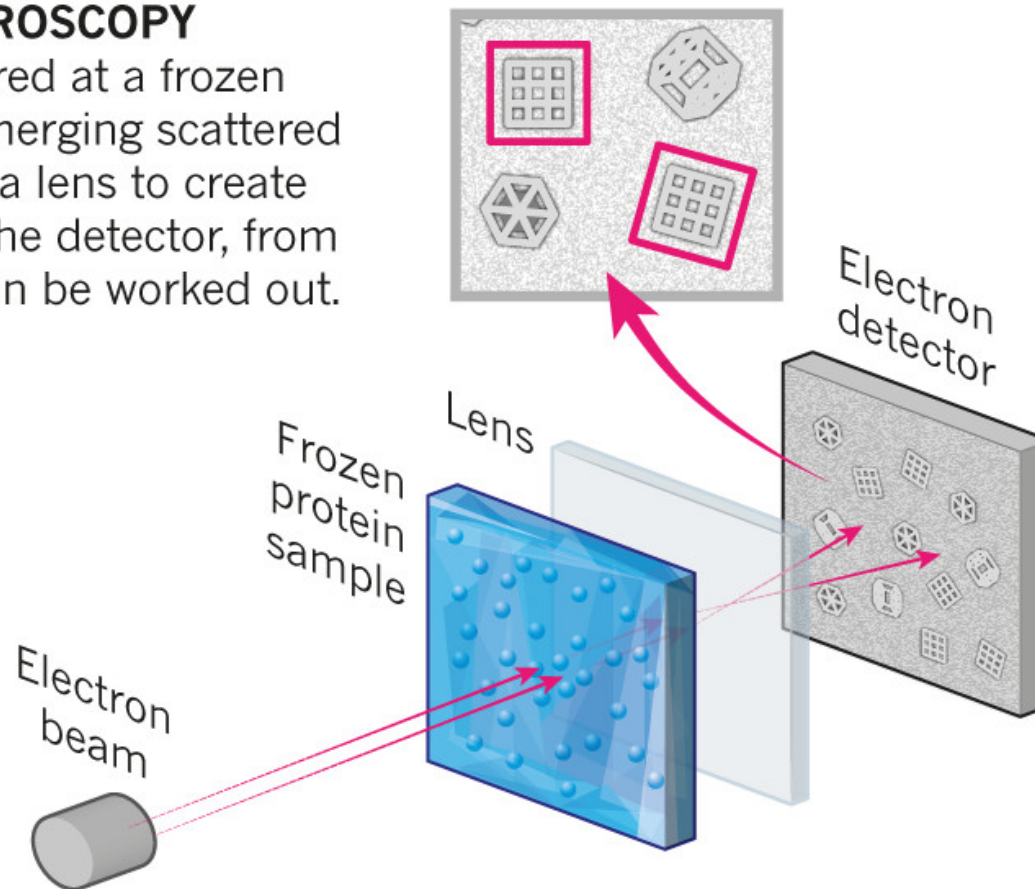
Crystal structure of
rhodopsin bound to
arrestin by
femtosecond X-ray
laser.

Szerkezet meghatározás – „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.



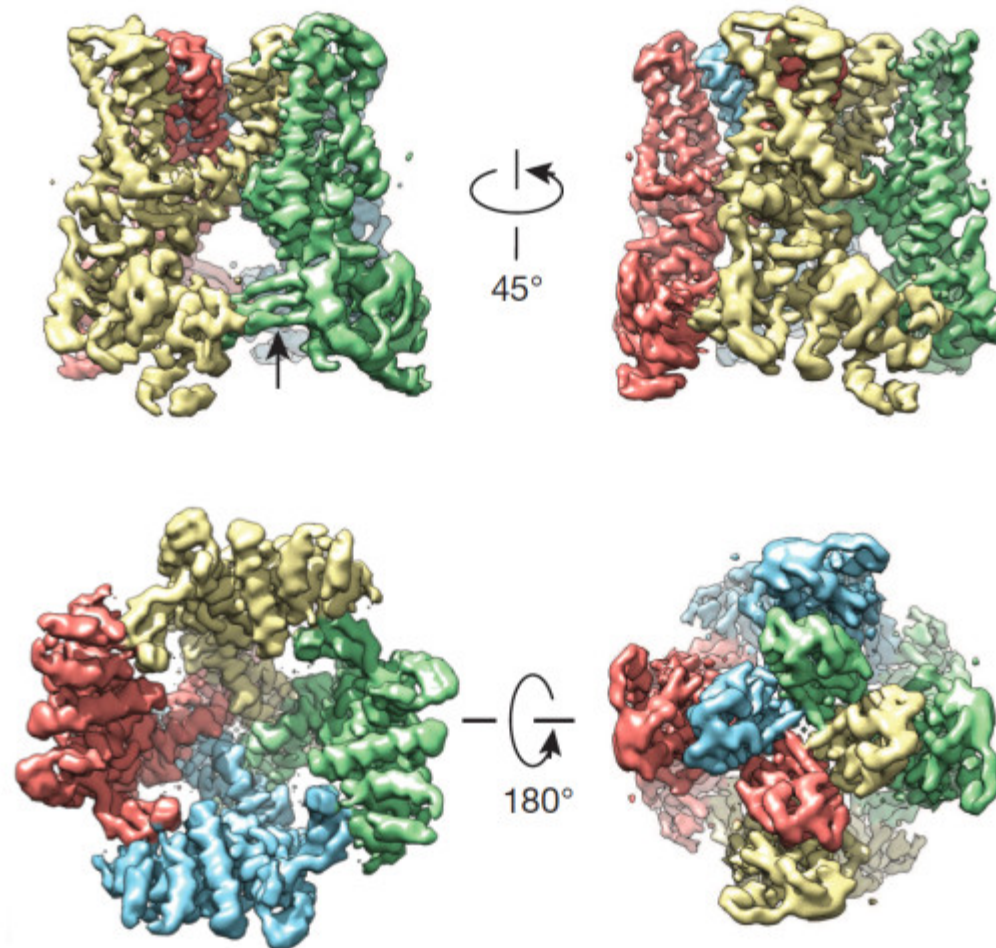
© nature

Ewen Callaway, Nature | News Feature

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

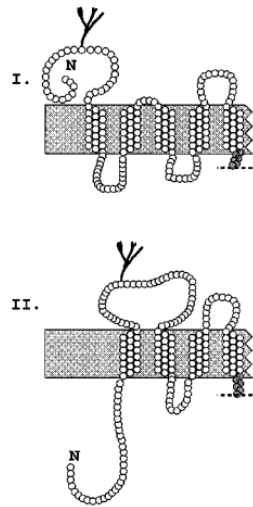
Szerkezet meghatározás – „single particle”

The TRPV1 channel detects the burn of chilli peppers, and this 3.4-Å structure is considered super-hot in the structural-biology world.

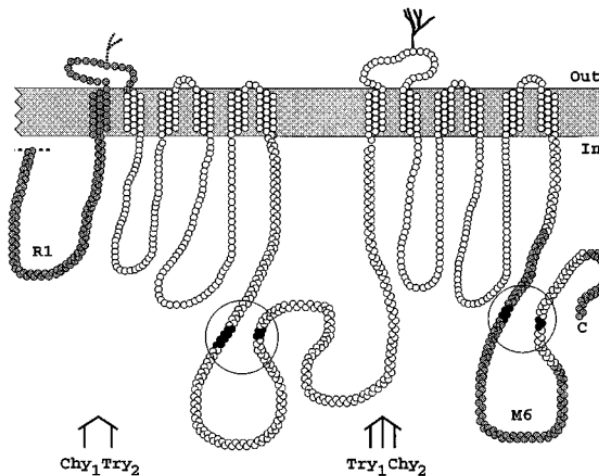


Membránfehérjék topológiája

MRP



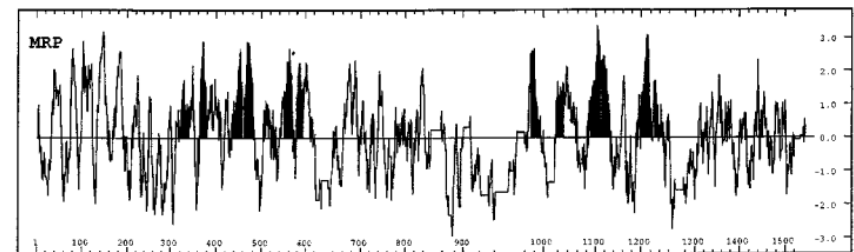
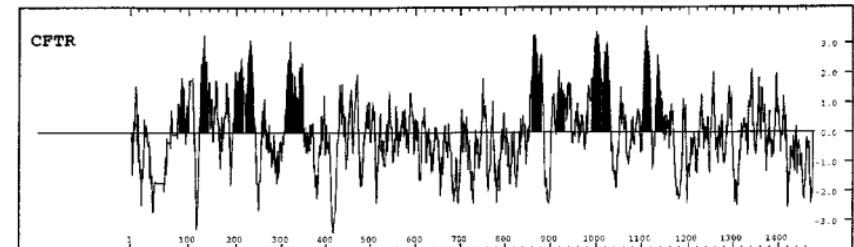
Bakos *et al.* JBC 1996



CFTR

MRP

Hidrofóbicitási görbék:



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

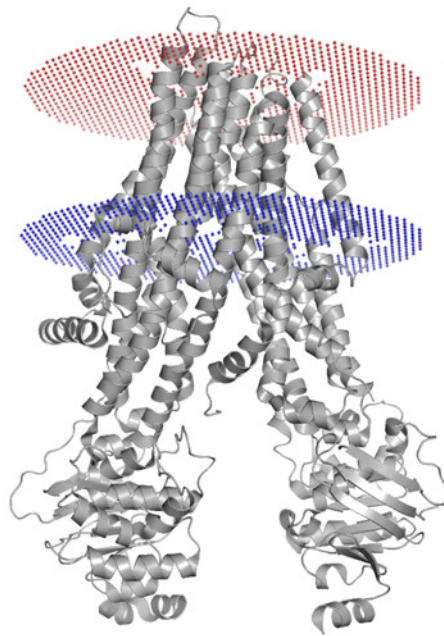
TM hélixek predikciója szerkezet alapján

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

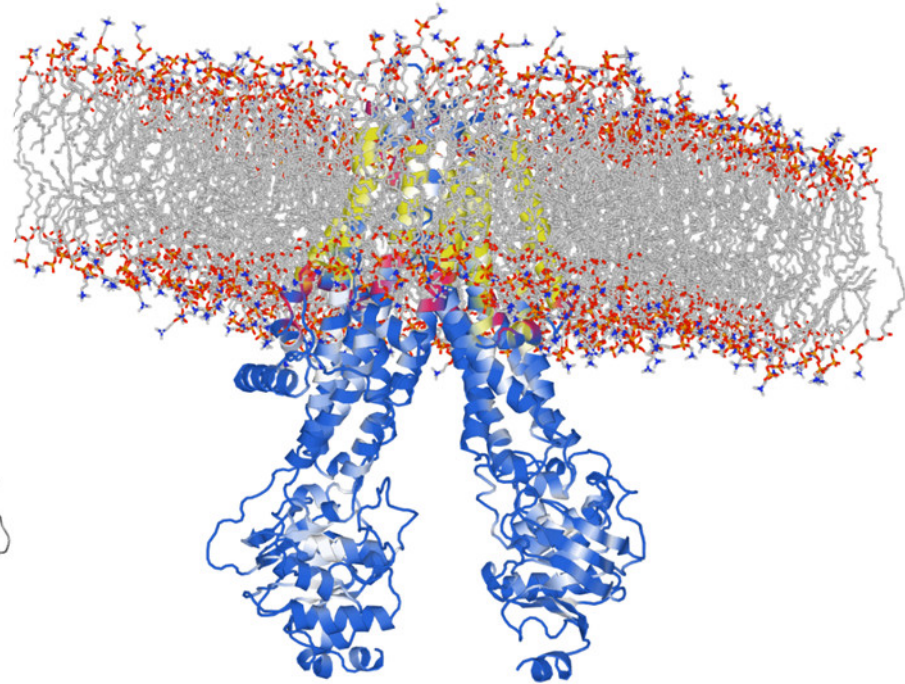
TMDet
PDBTM



PPM
OPM

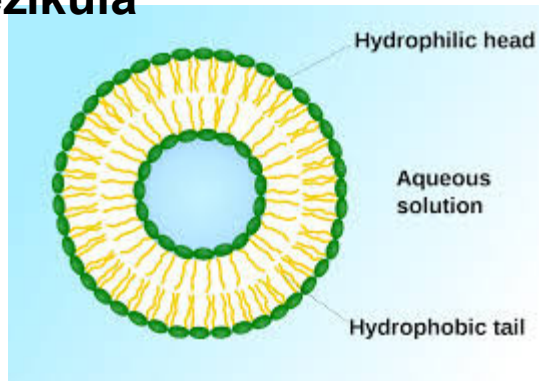


MemProtMD

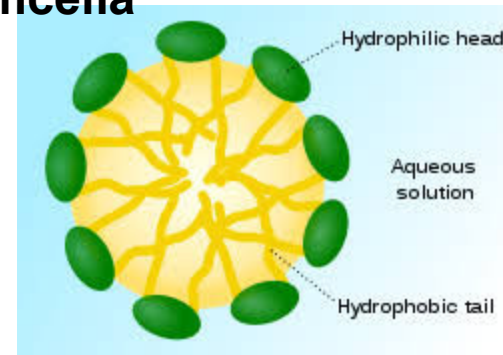


Membrán mimetikumok / membrane mimetics

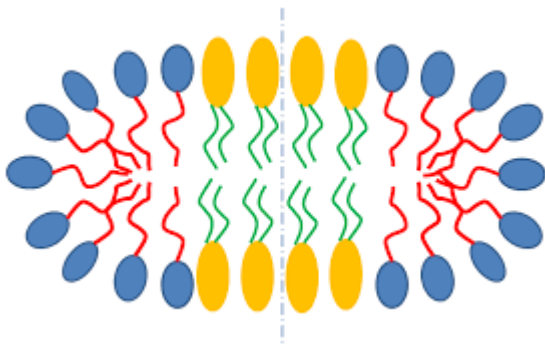
Vezikula



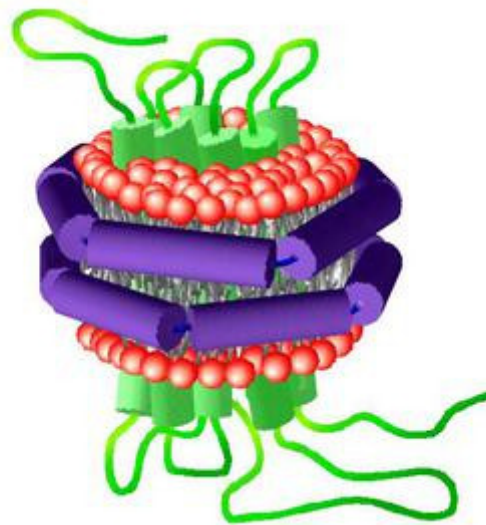
Micella



Bicella



Nanodisc

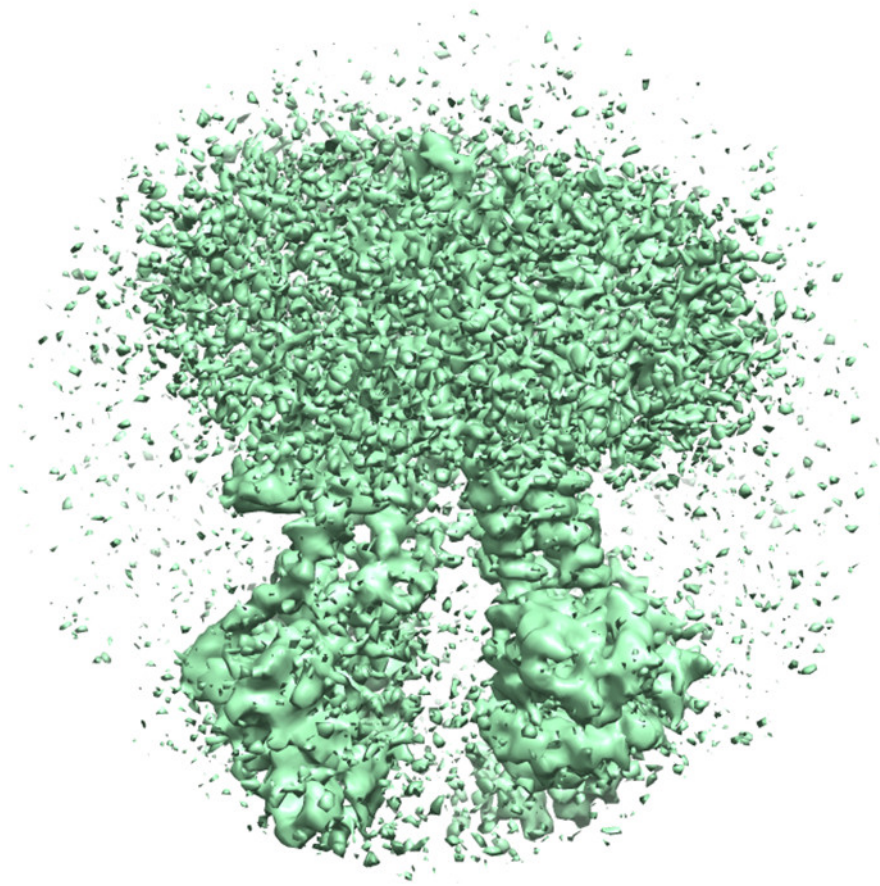


Amphipol

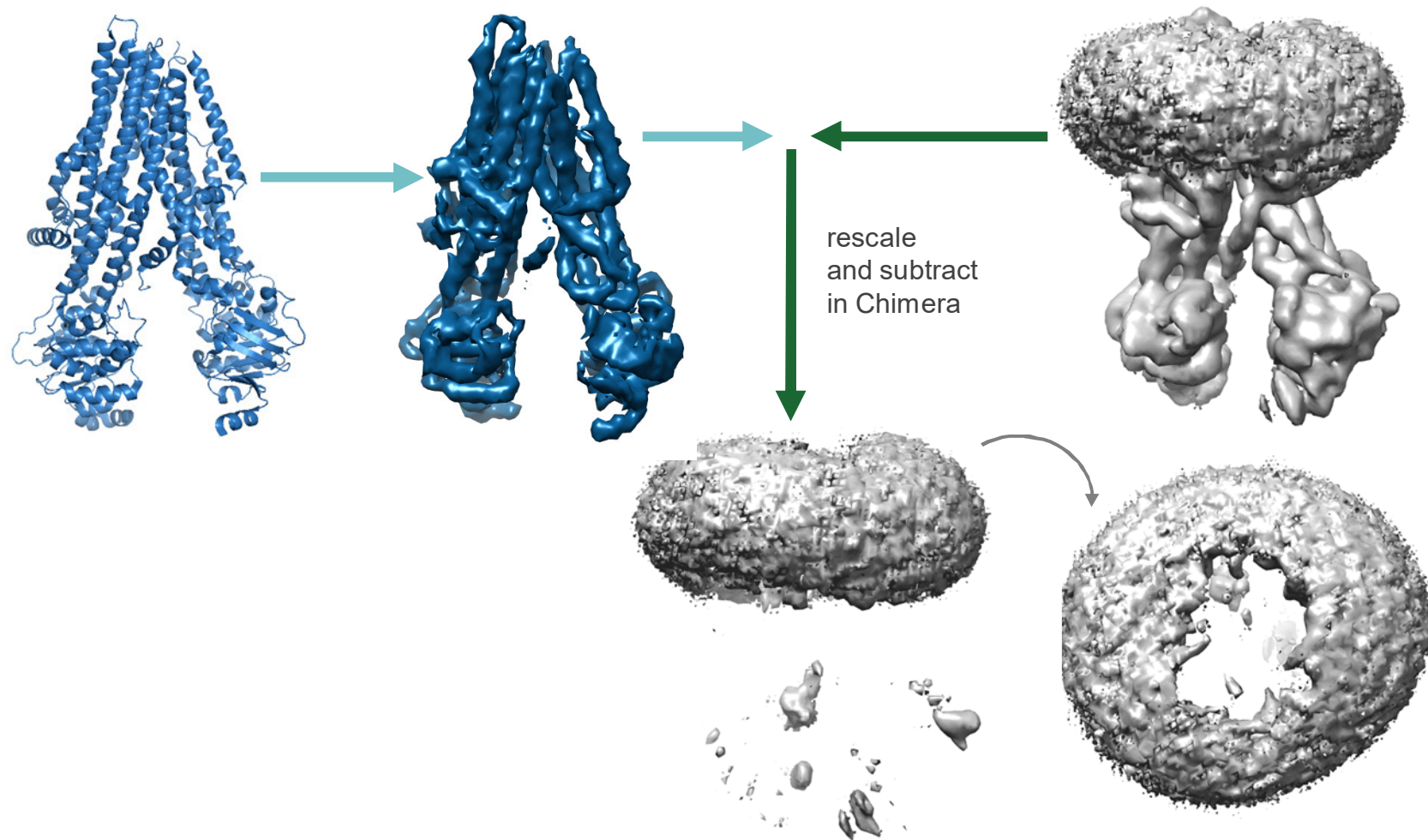


Membrane embedding data is in the electron density maps

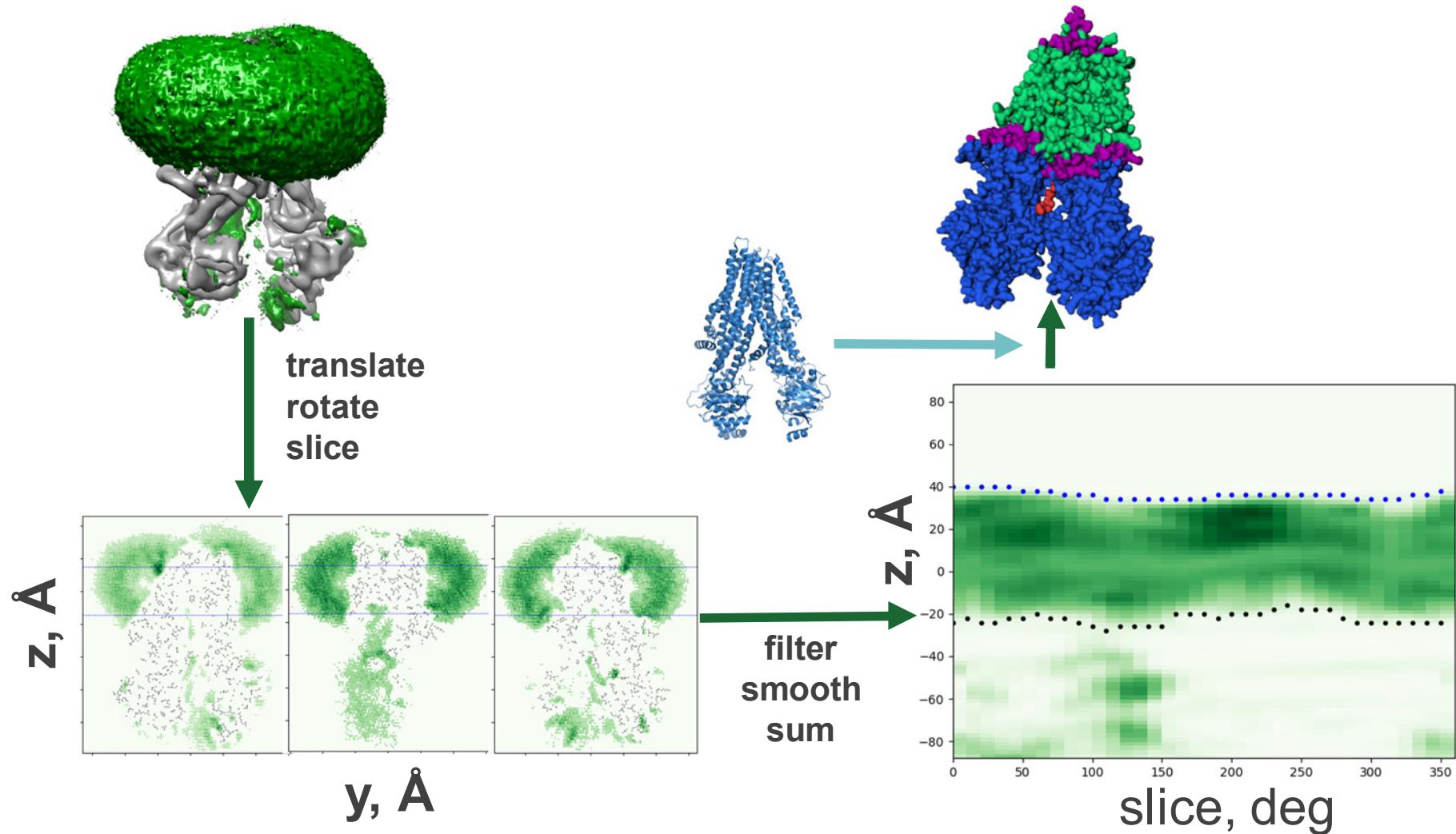
CFTR (PDBID: 5UAK) EMD



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	-4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
-----	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

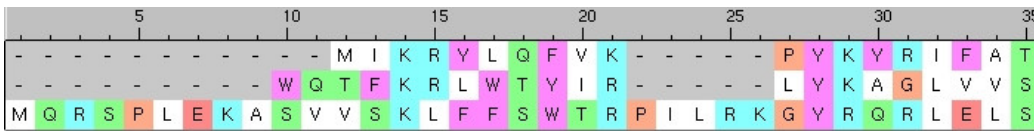
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Alignement – pl. ClustalW

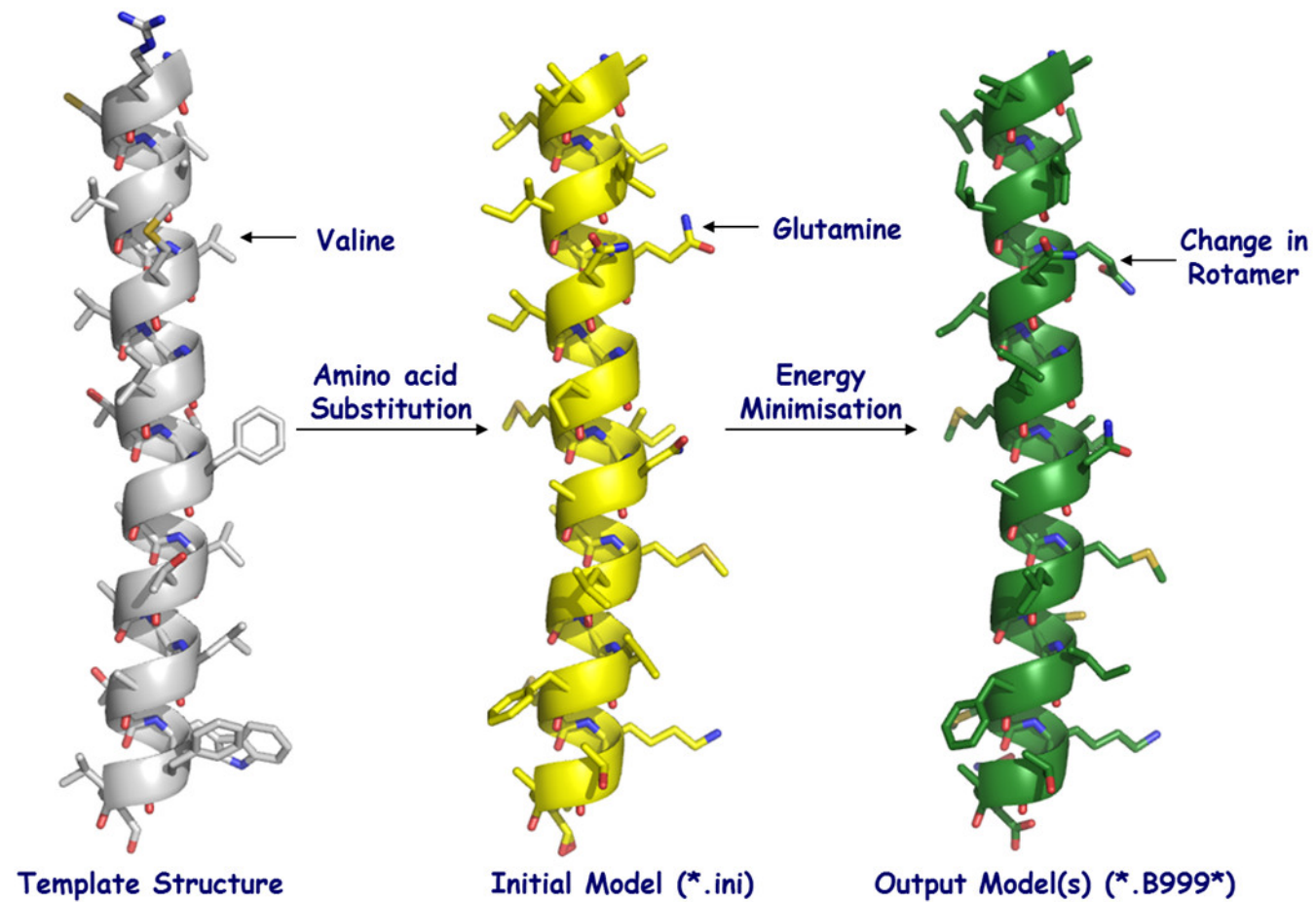
```

2HYD      -----MIKRYLQFVK-----PYKYRIFATIIVGIKFGIPMLIP
3B5X      -----WQTFKRLWTYIR-----LYKAGLVVSTIALVINAAADTYMI
CFTR_HUMAN MQRSPLEKASVVS KLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDSADNLS
              *      :      :      *      :      :      *      :      :

```



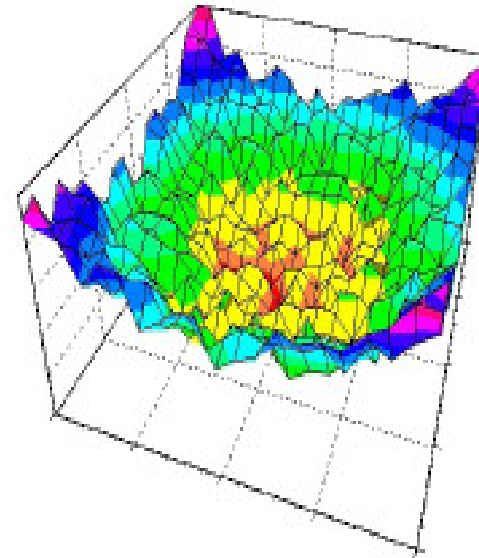
Homológia modellezés II.



Van szerkezet, mozgassuk meg!

Molekula dinamika/Molecular dynamics

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



A „force field”

Baker (2007)

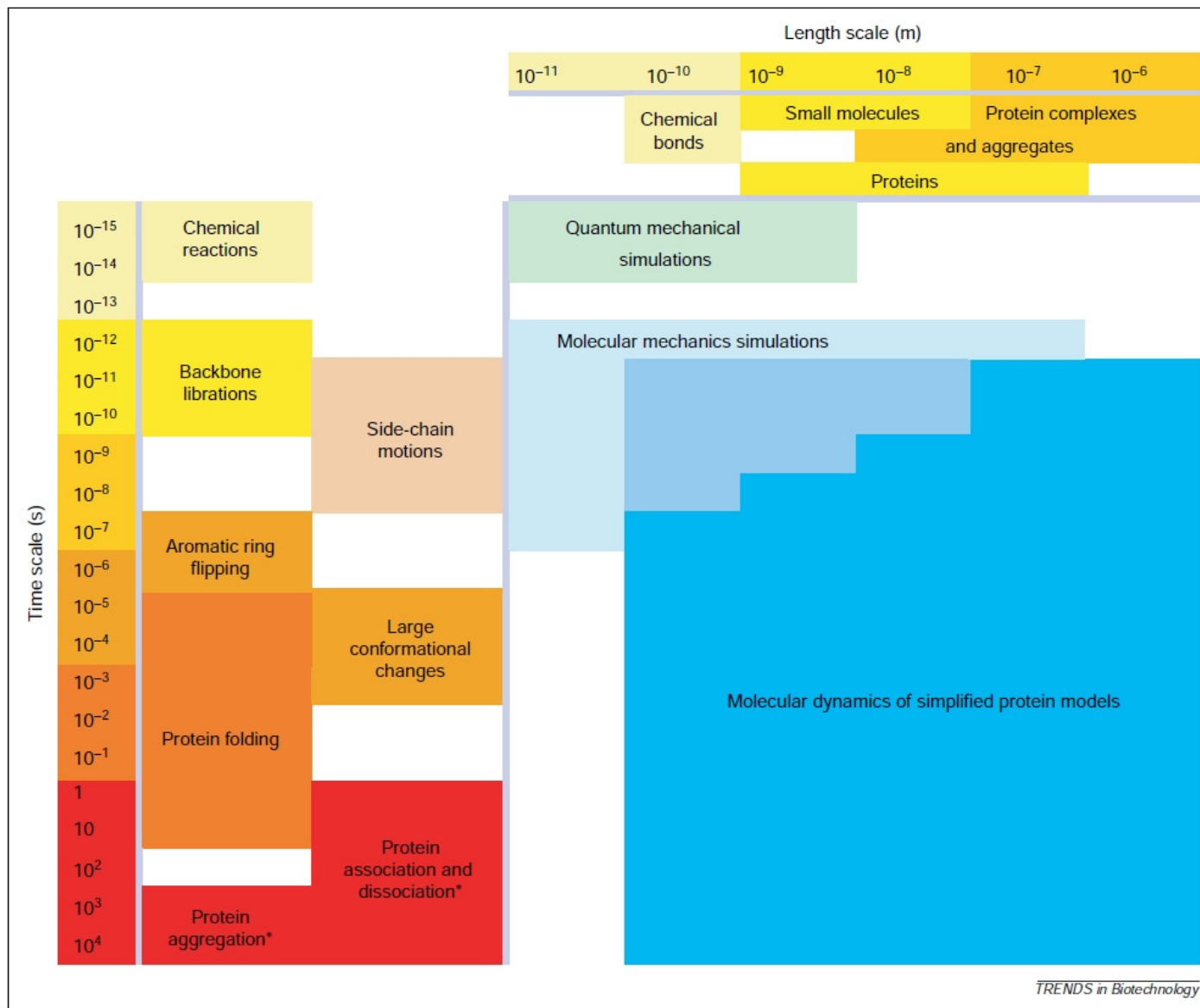
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} \\ + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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

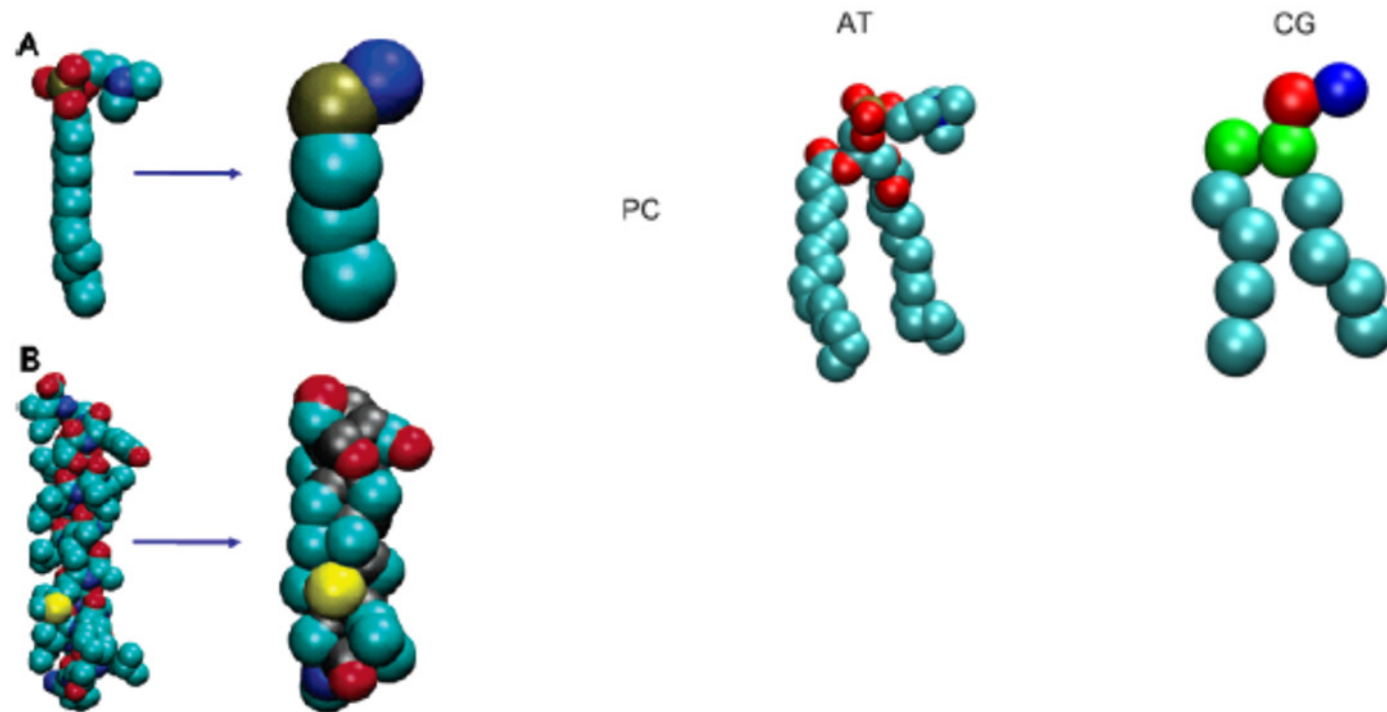
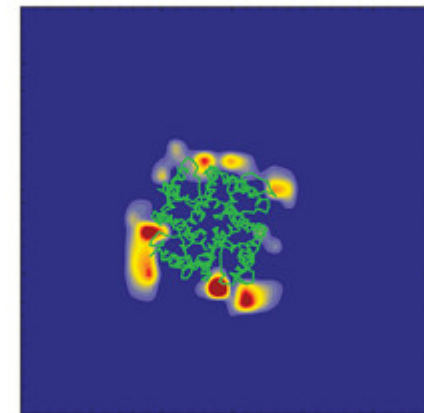
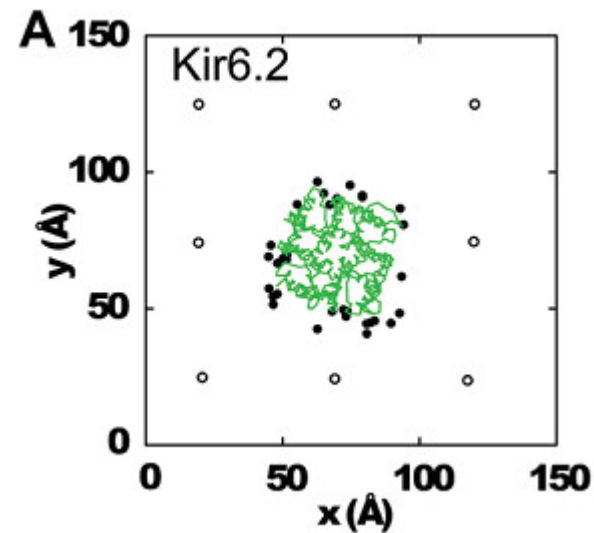
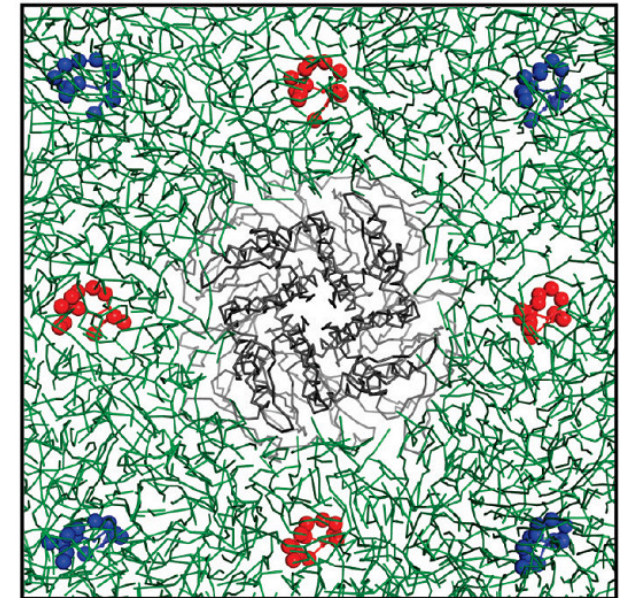
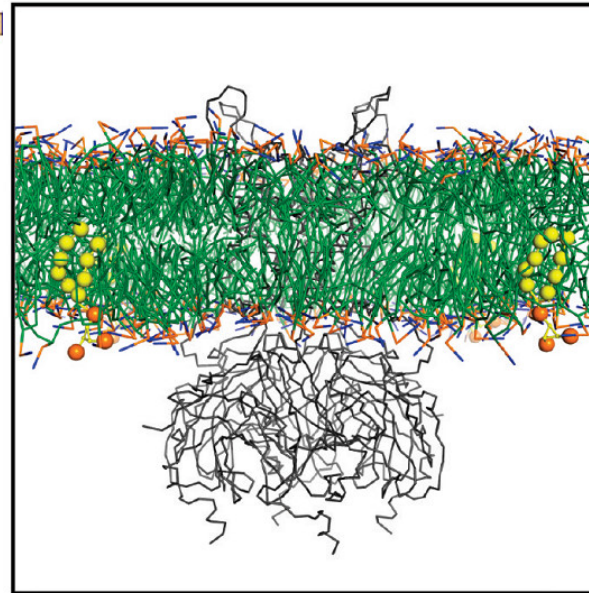
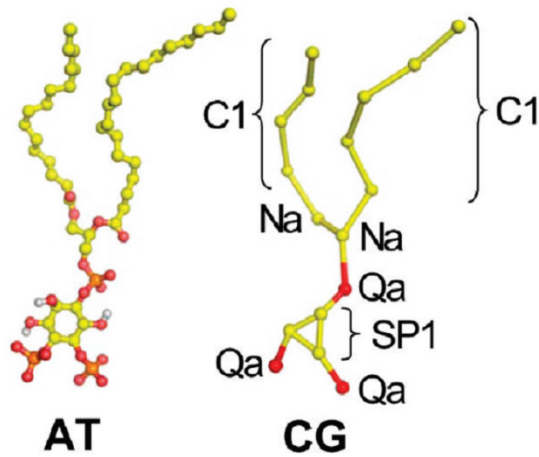


Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

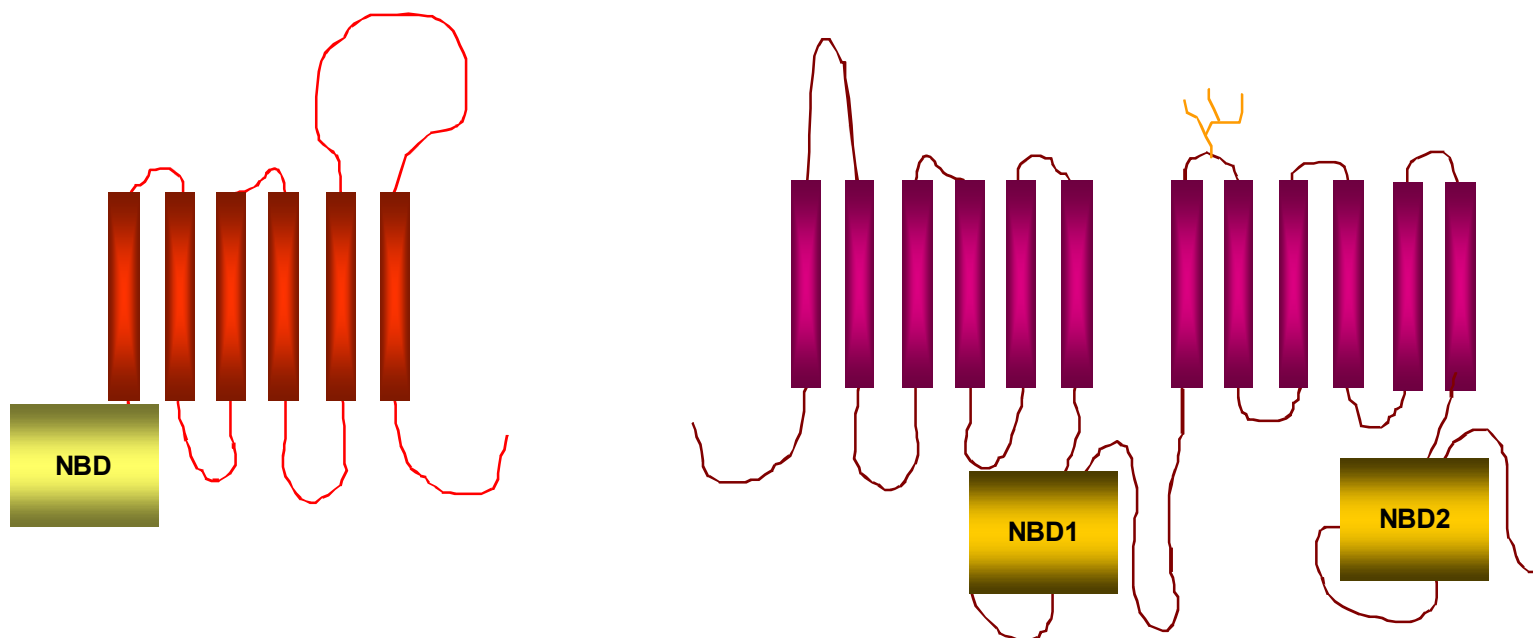
Sansom, Oxford University
Marrink, Groningen, MARTINI force field

PIP2 kötődése Kir kálium csatornához

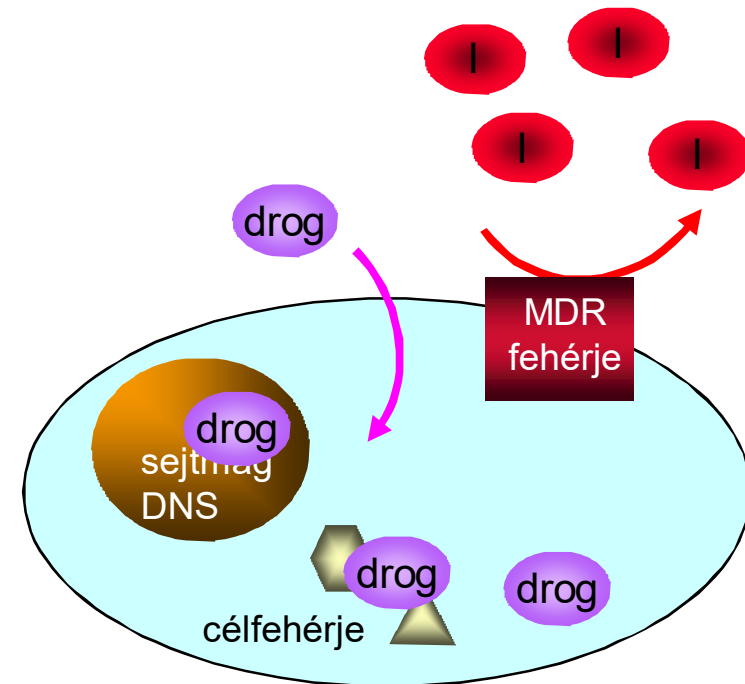
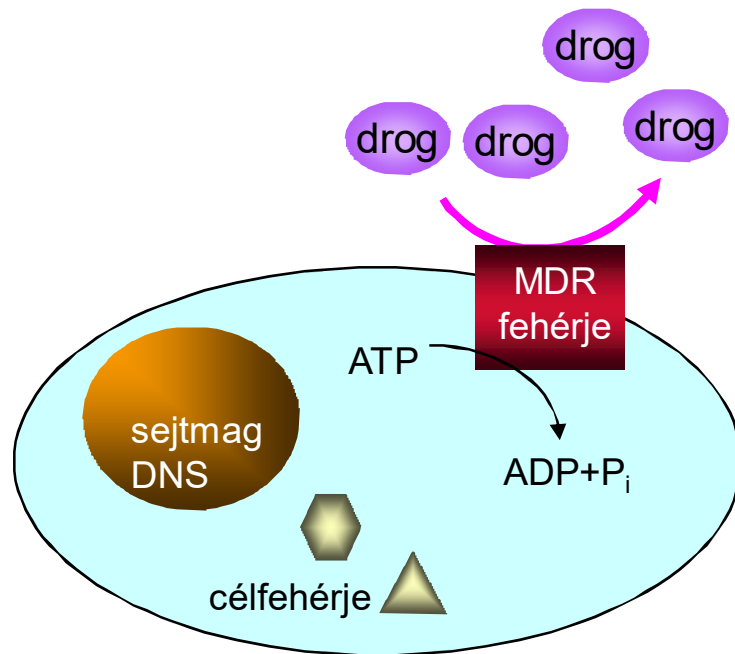
Biochemistry, Vol. 48, No. 46, 2009 1



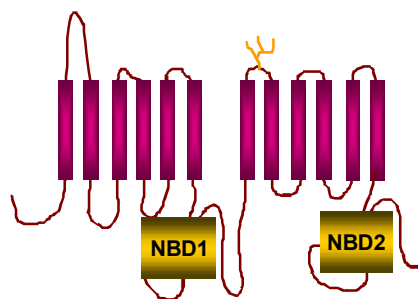
ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék



A multidrog-rezisztencia és felfüggesztése

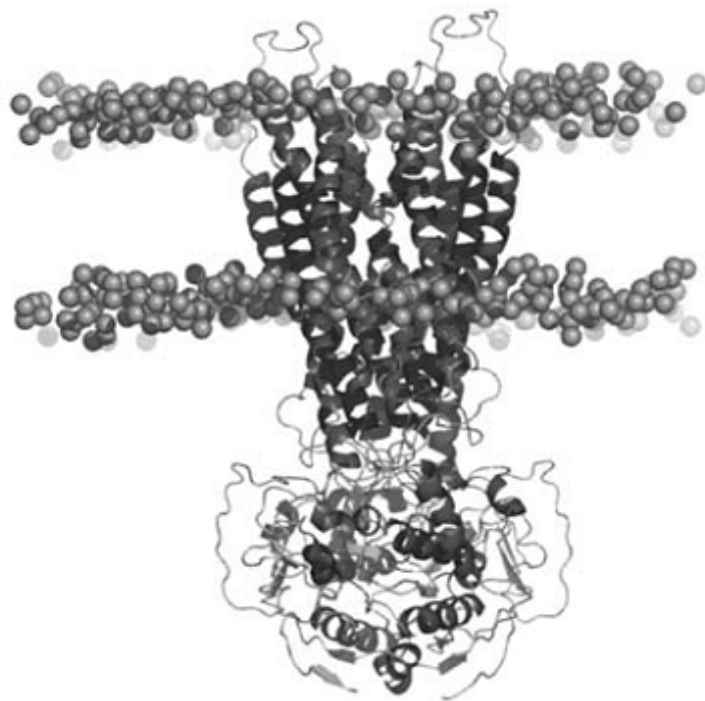


Fehérjék konformációinak stabilitása



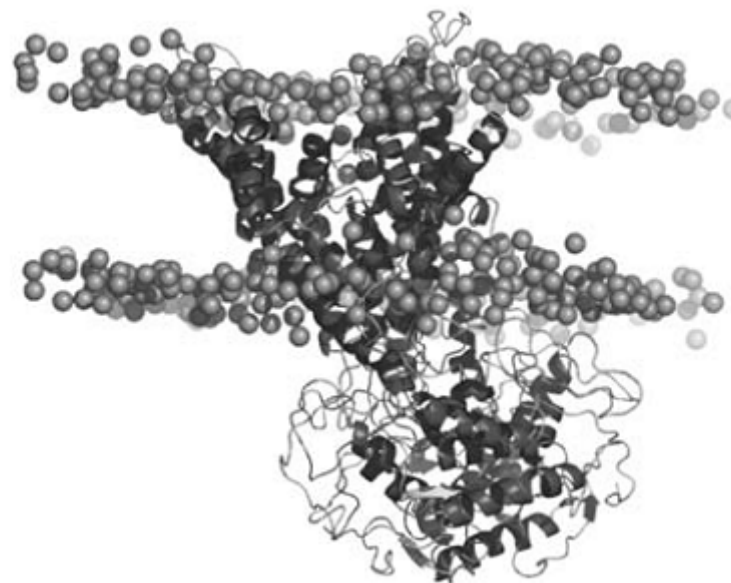
Eur Biophys J (2008) 37:403–409

B



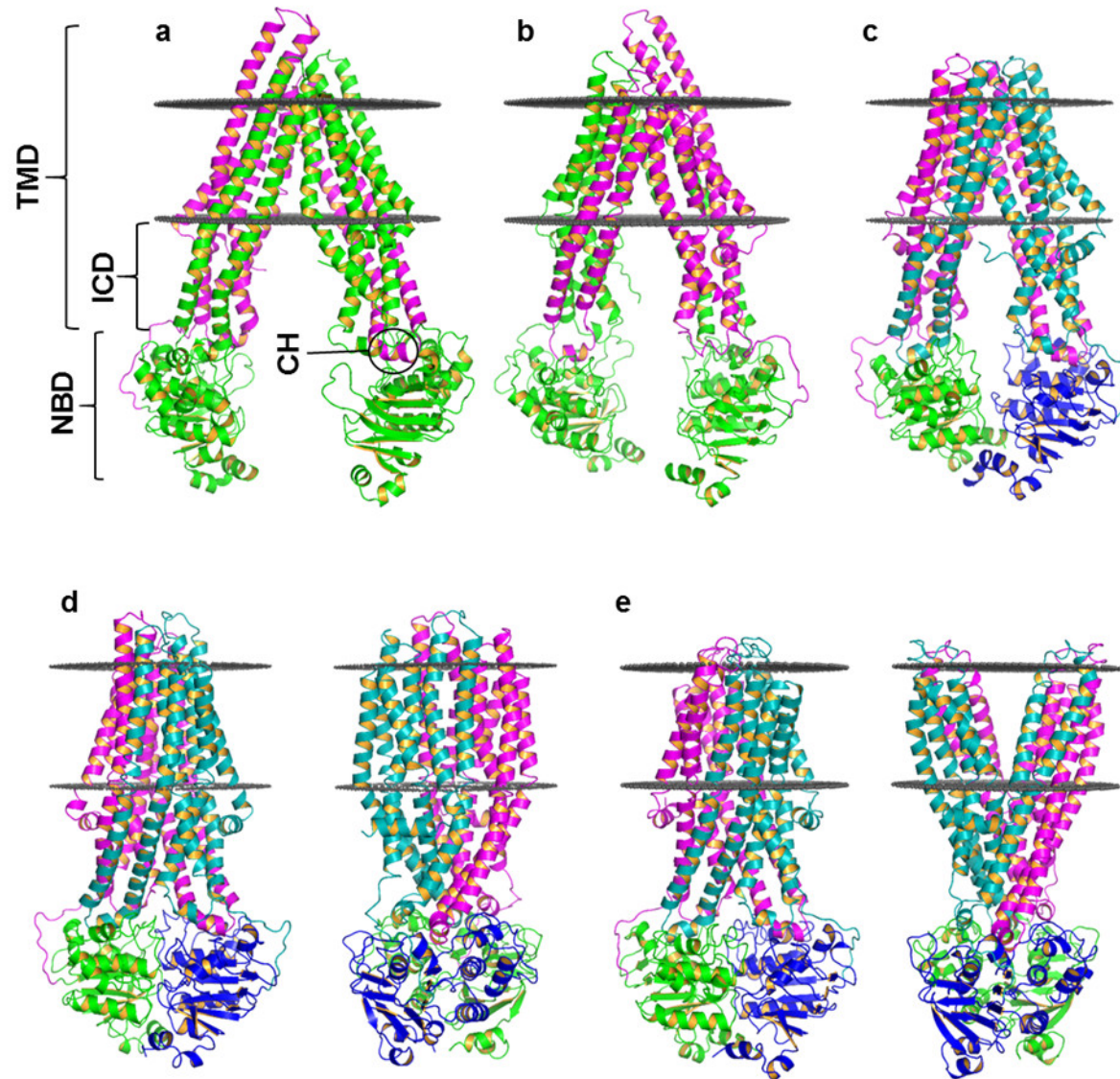
0 ns

C

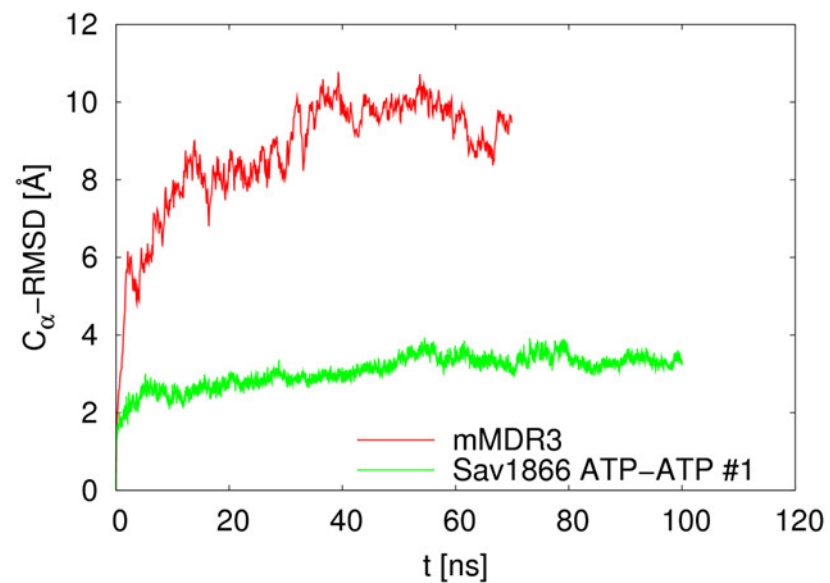
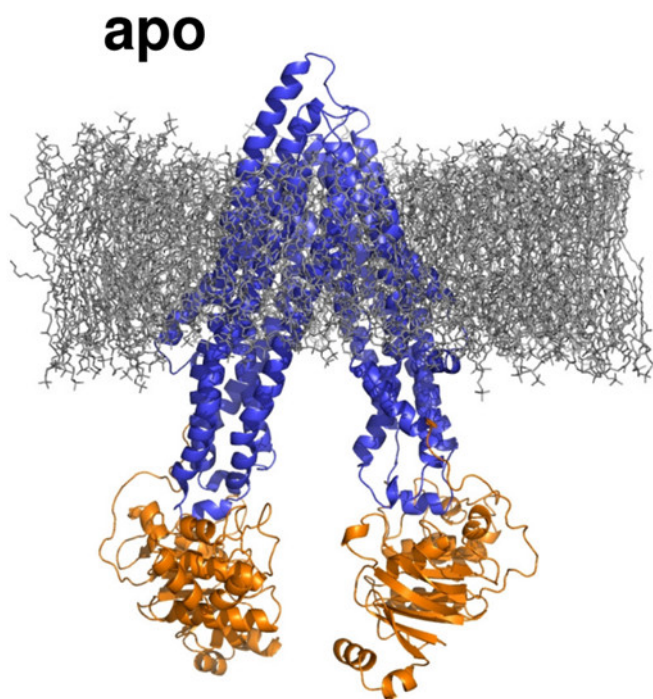


20 ns

ABC fehérjék konformációi (Type I)

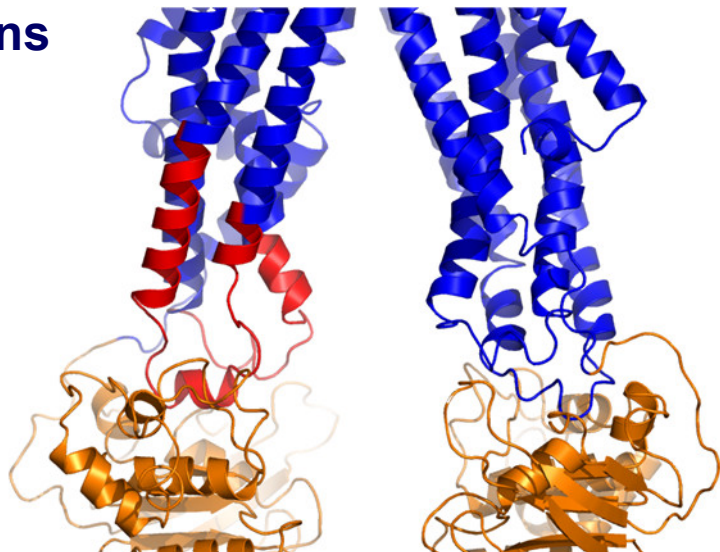


Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil

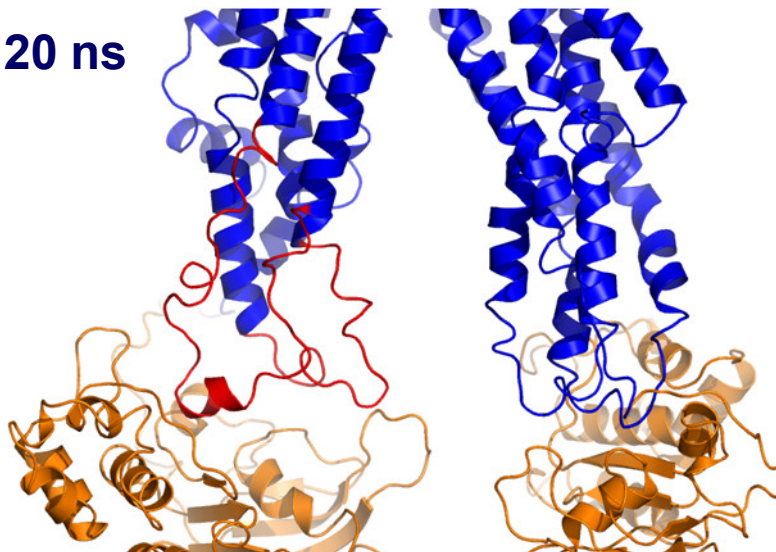


Az alul nyitott apo szerkezet nem stabil

t = 0 ns

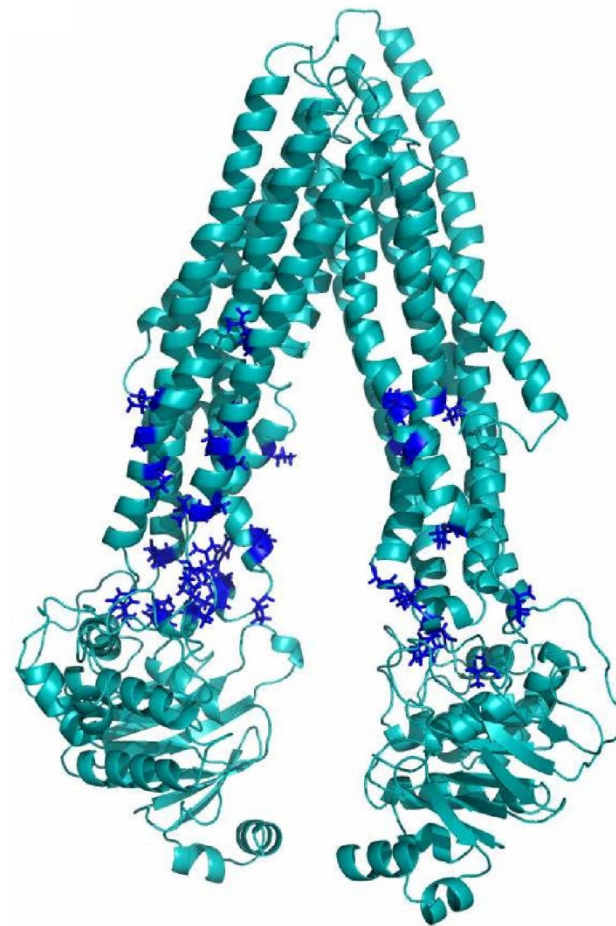
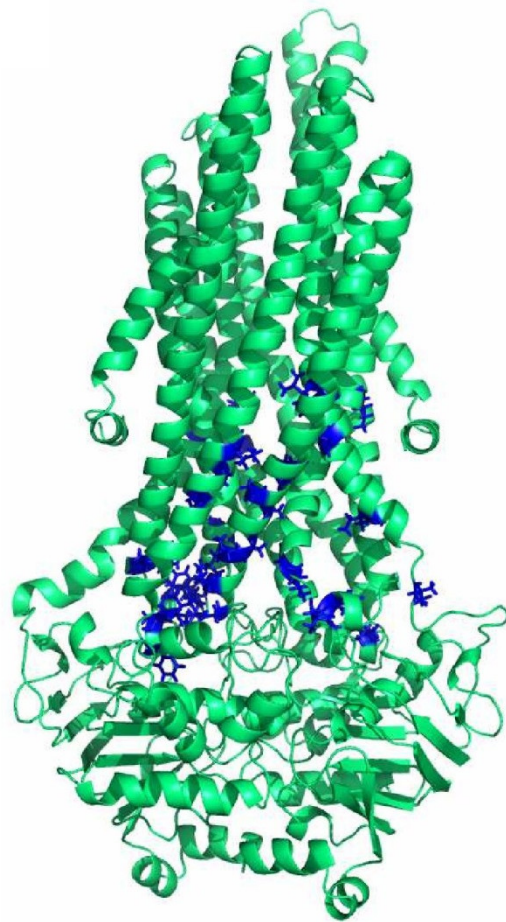


t = 20 ns



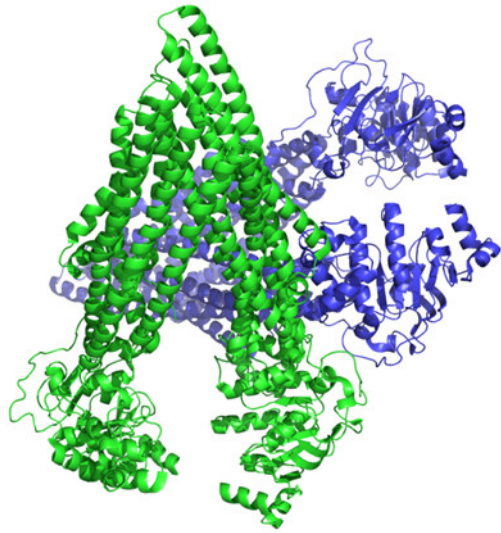
rendszer	megtartott hélixtartalom
Sav1866 ATP/ATP #1	90.04%
hMDR1 holo	91.84%
hMDR1 apo	64.30%
mMDR3	63.13%

Hidrofób aminosavak kerülnek felszínre

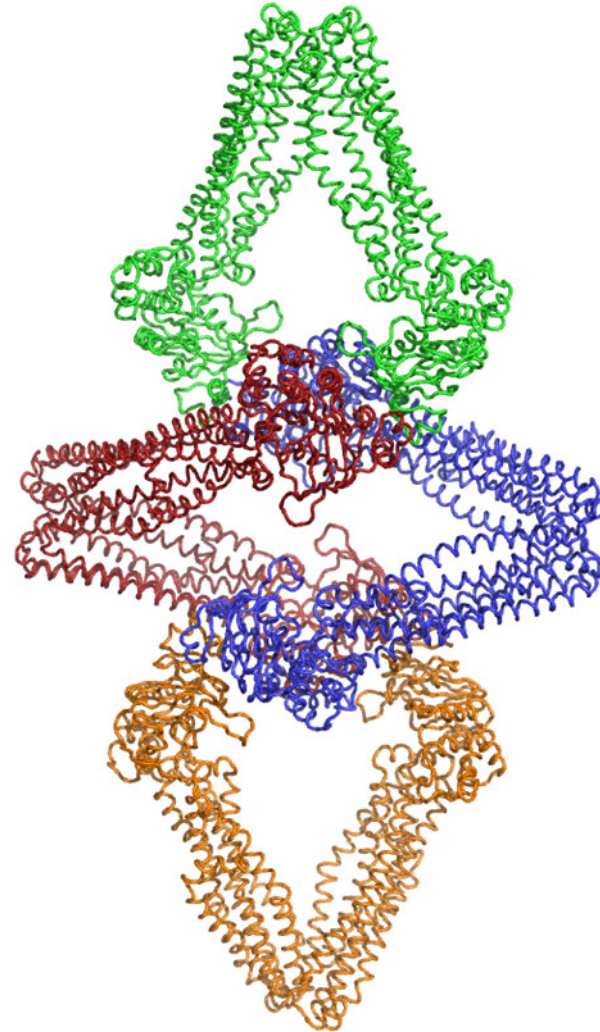


Alul nyitott apo szerkezet elemi cellája

mMDR3, PDBID:3G5U

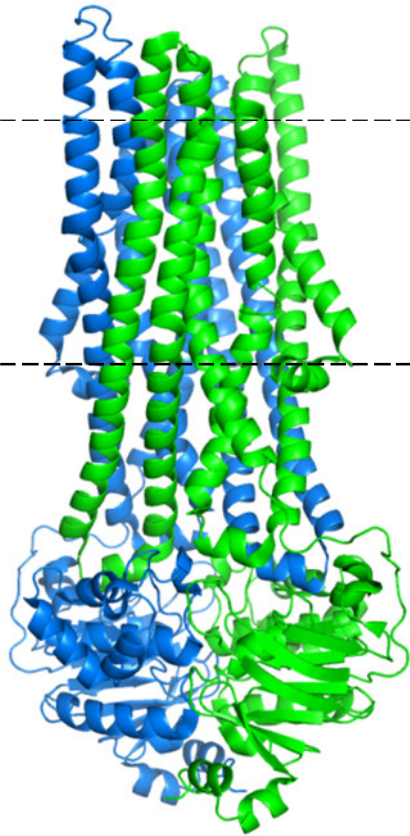


MsbA, PDBID:3B5W

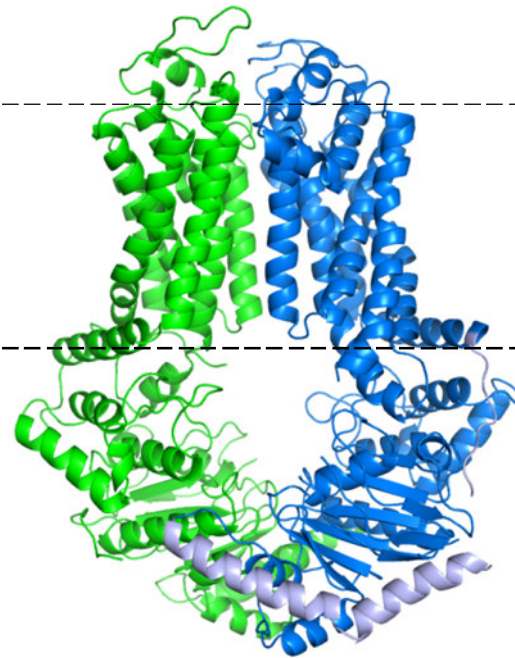


ABCG alcsalád - Type II

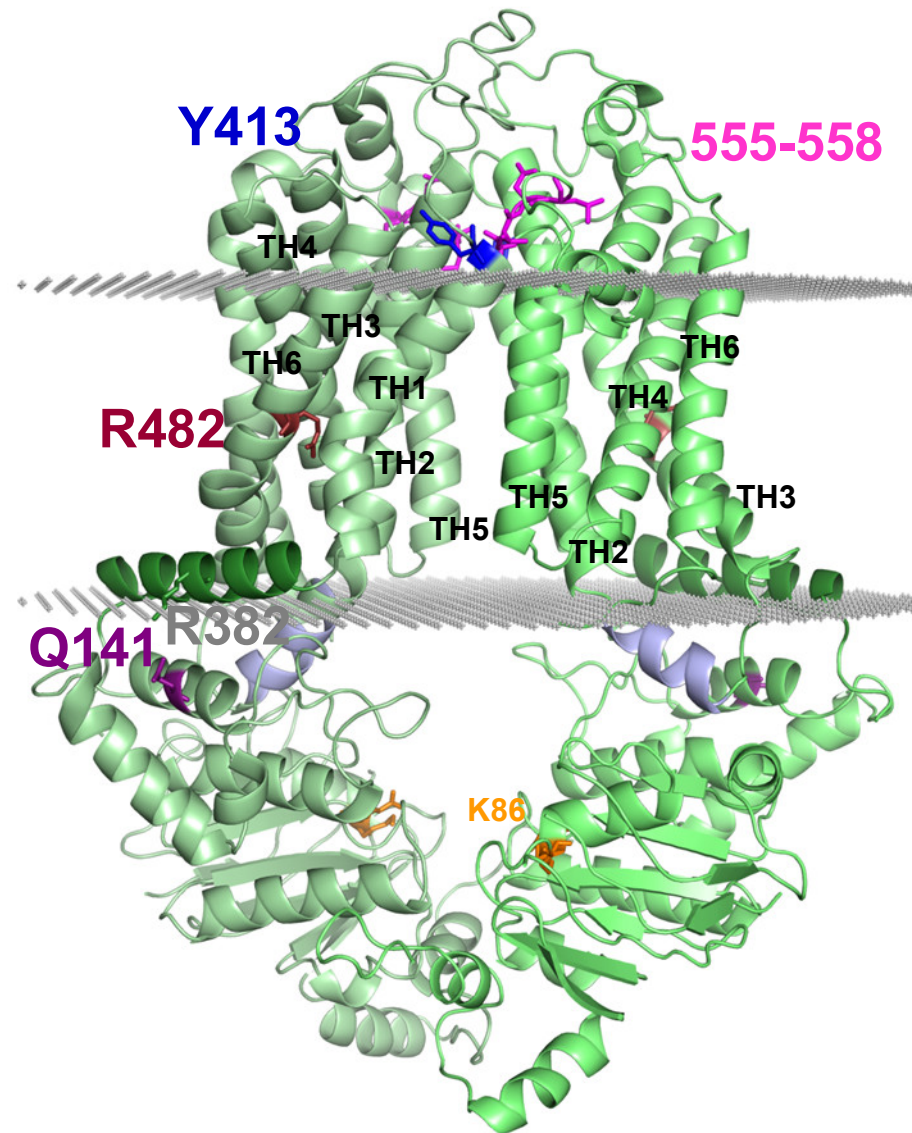
Type I +ATP



ABCG5-ABCG8

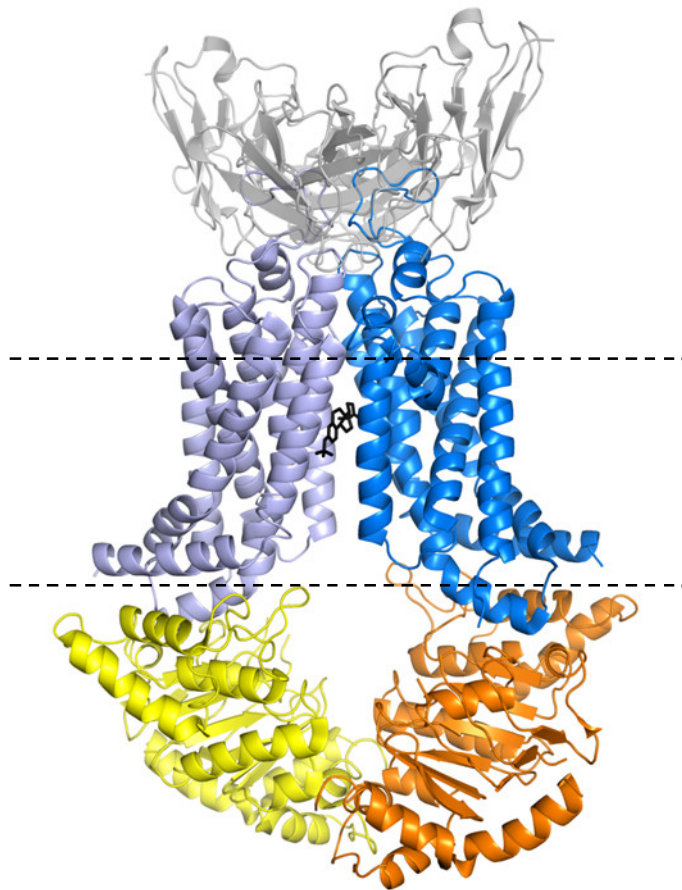


Az ABCG2 modell

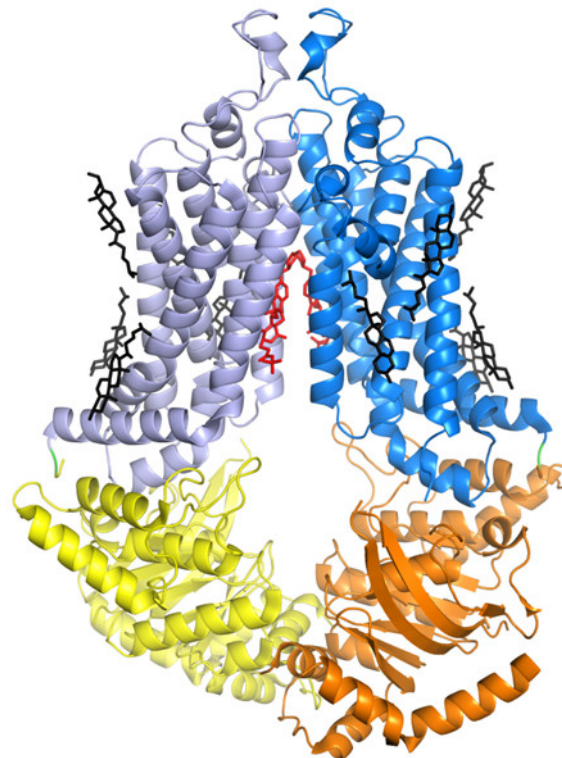


ABCG2 structures

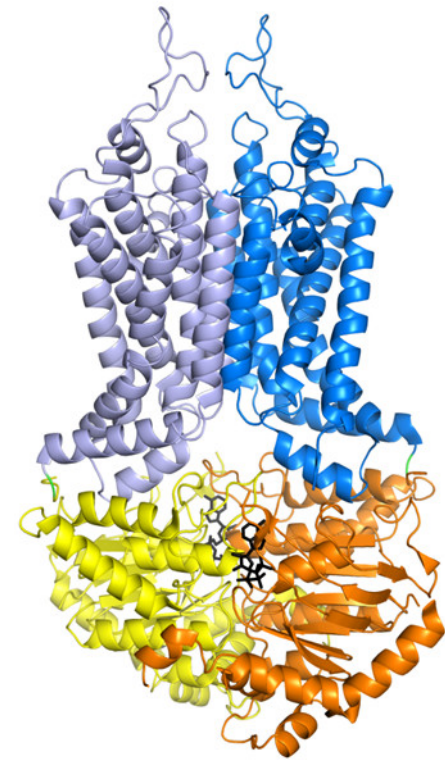
K. Locher, ETH, Zurich



6HCO

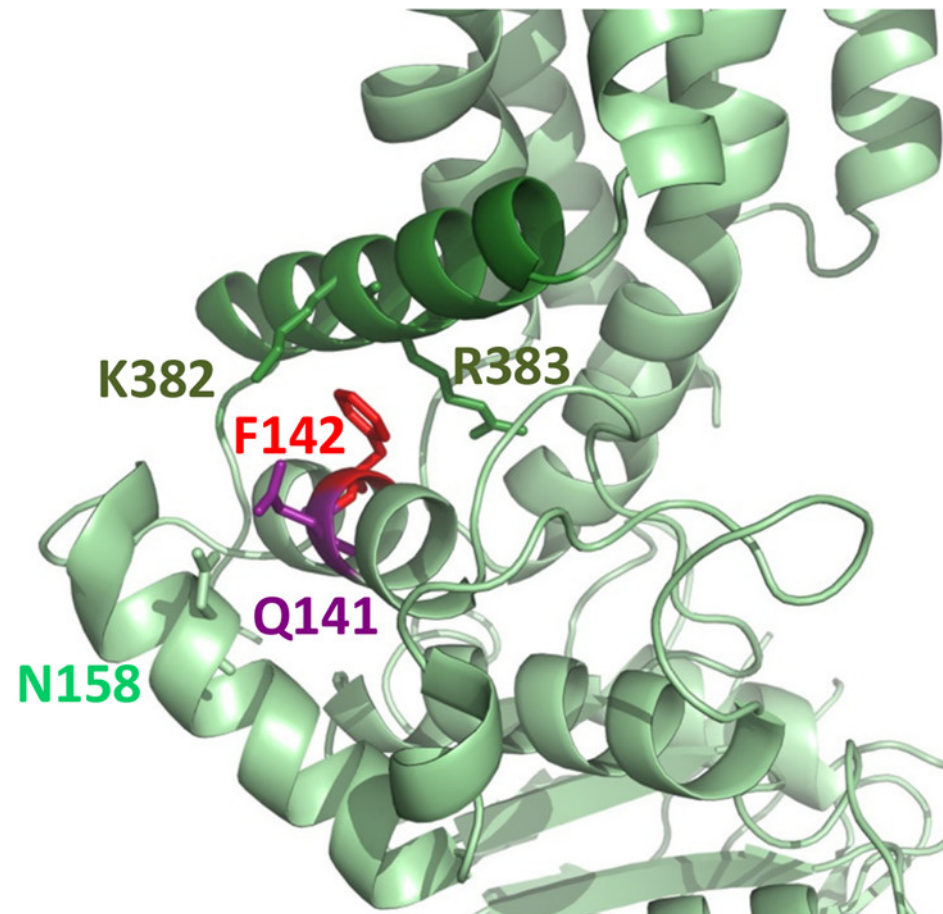


6HIJ



6HZM

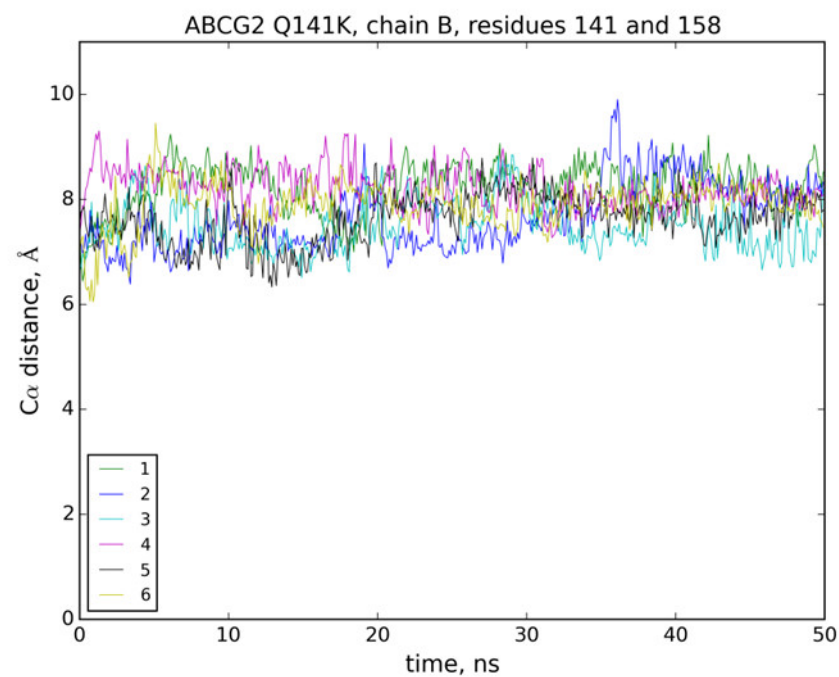
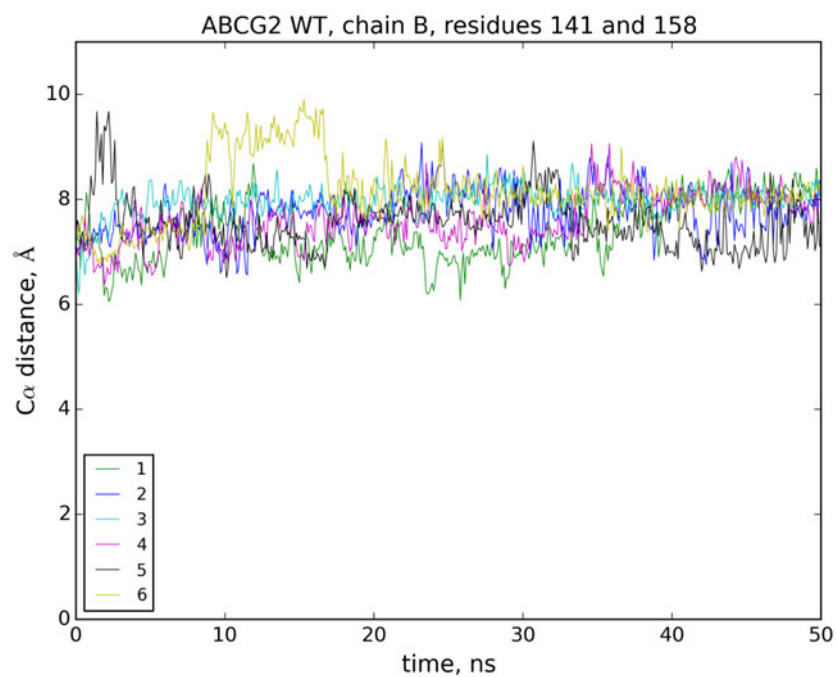
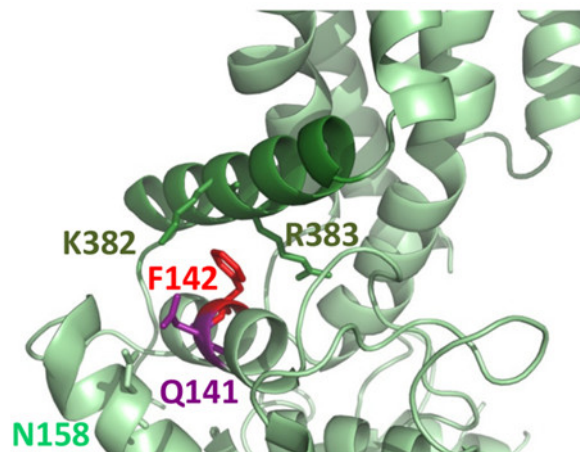
A Q141 helyzete



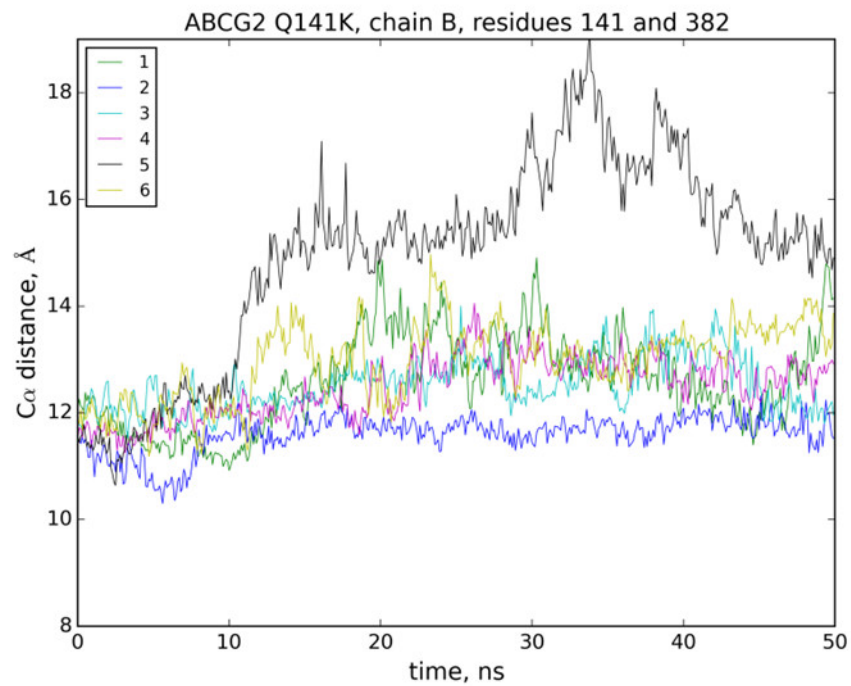
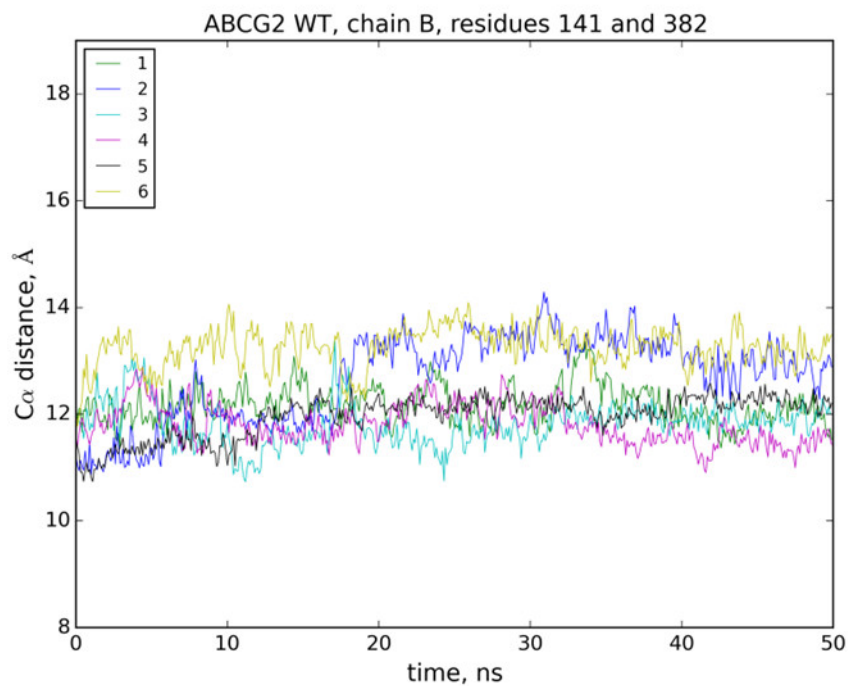
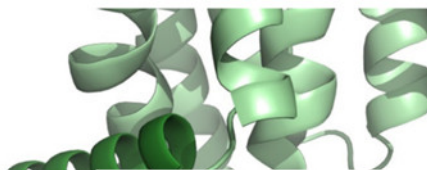
Molekula Dinamika (MD) szimulációk

- 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



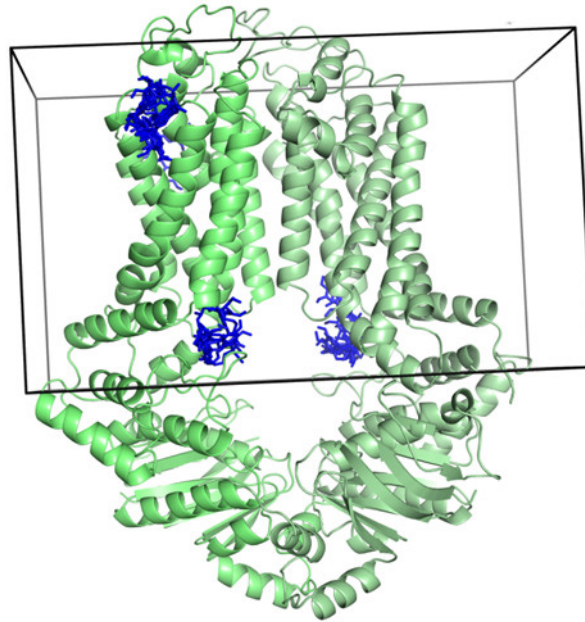
A Q141K hatása a 141/382 (NBD/TMD) kapcsolatra



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)

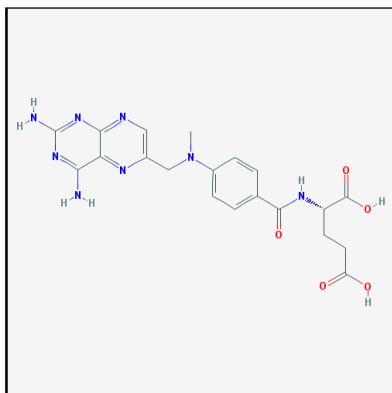


Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

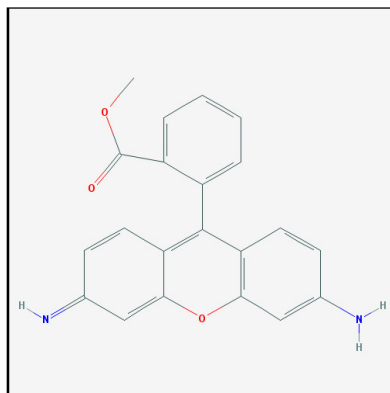
AutoDock Vina

- 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

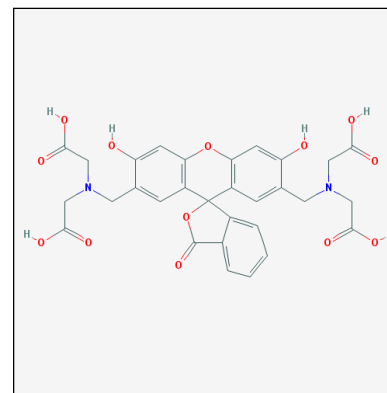
methotrexate



rhodamine123

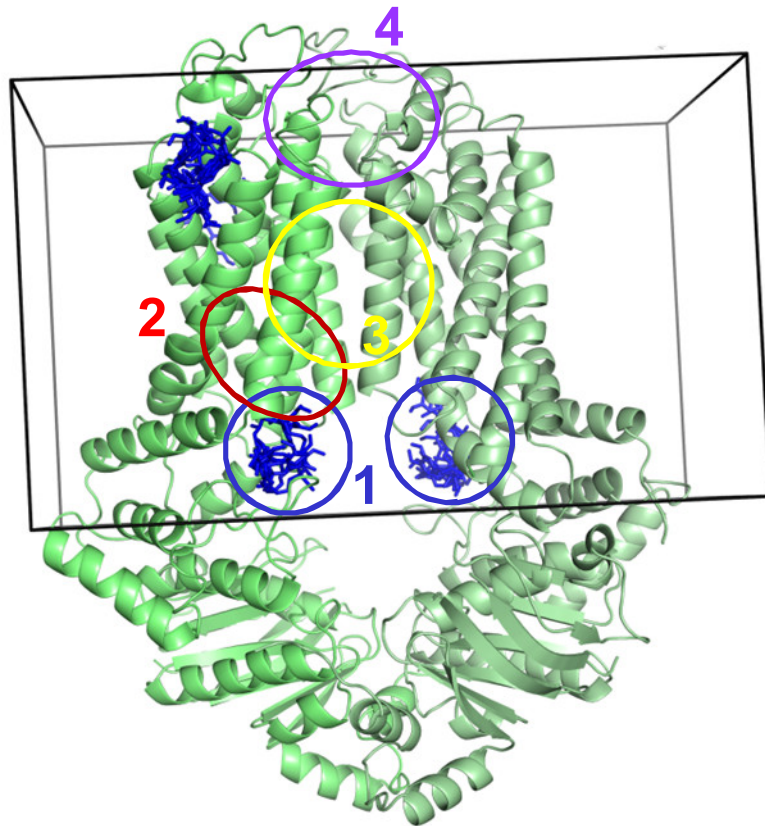


calcein

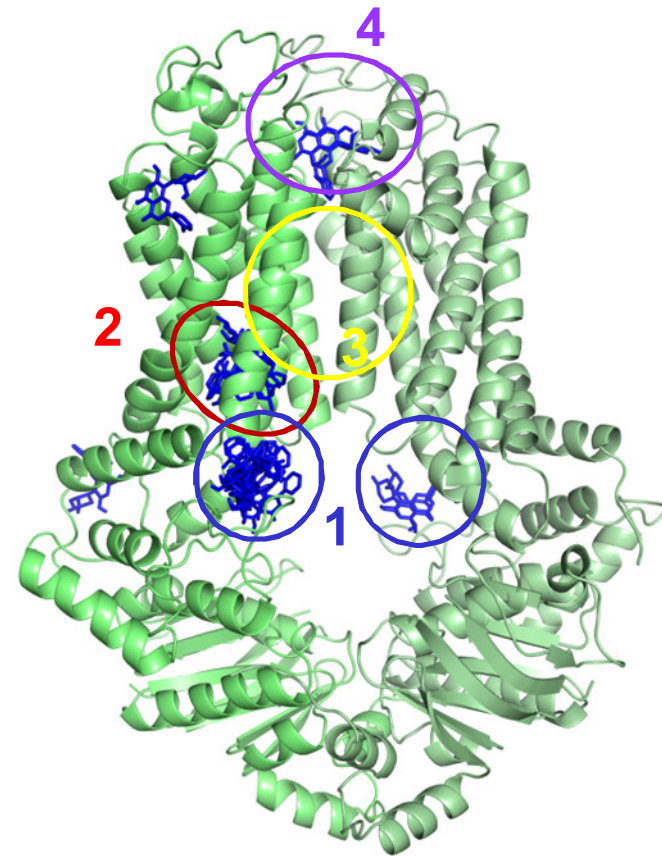


Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

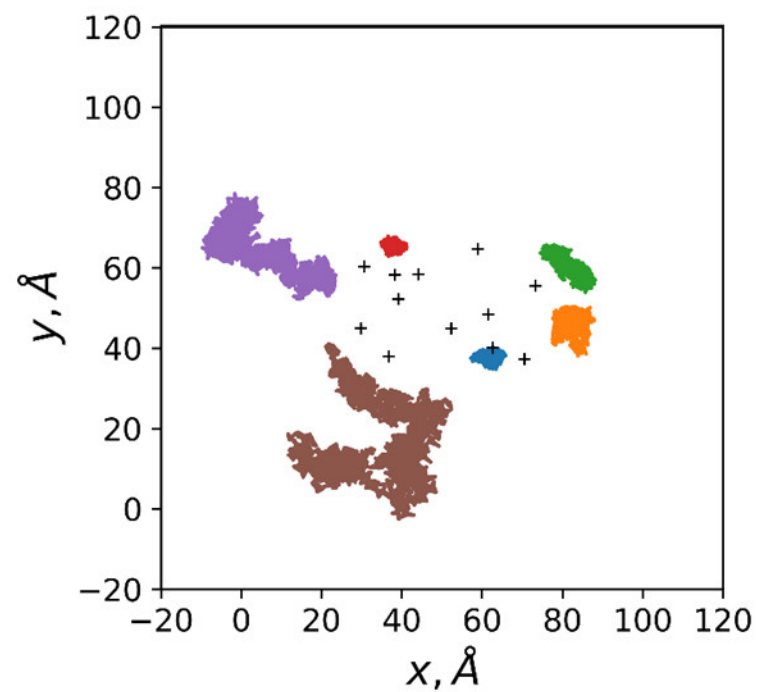
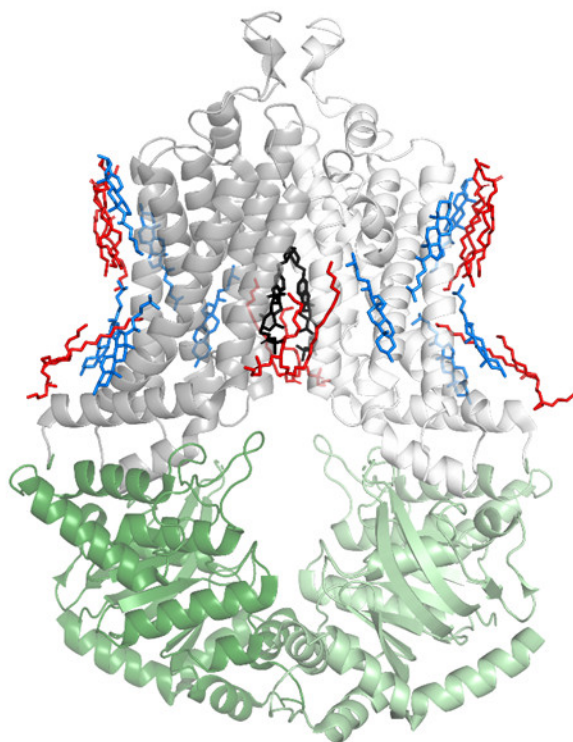
verapamil



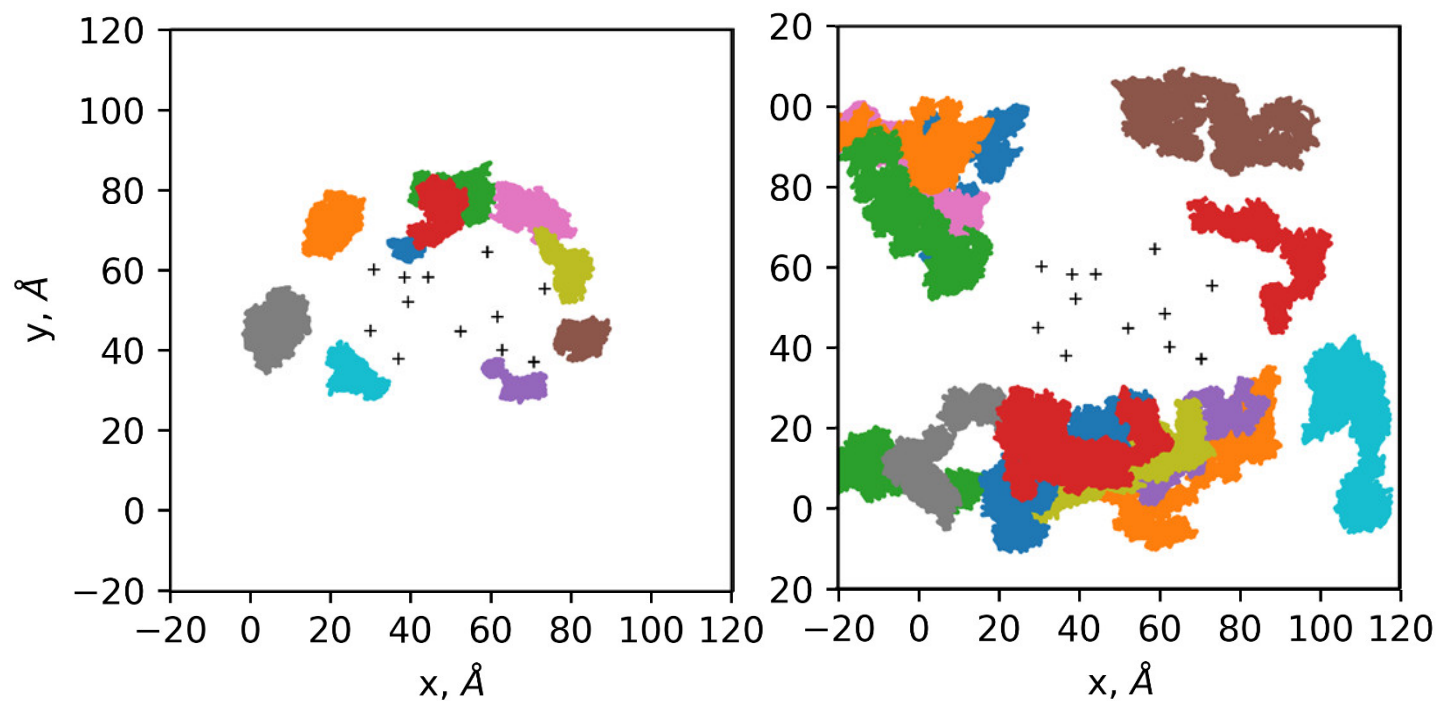
flavopiridol



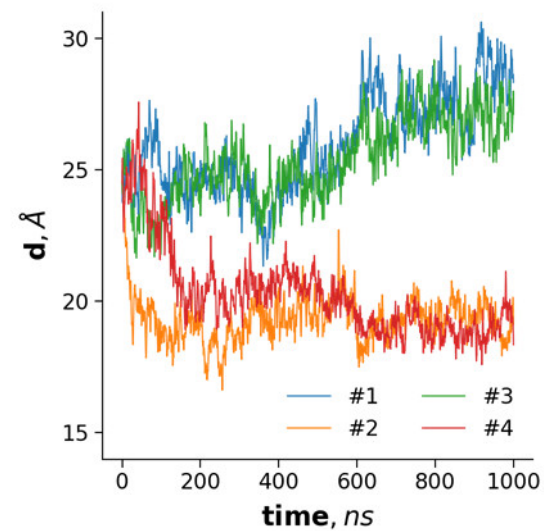
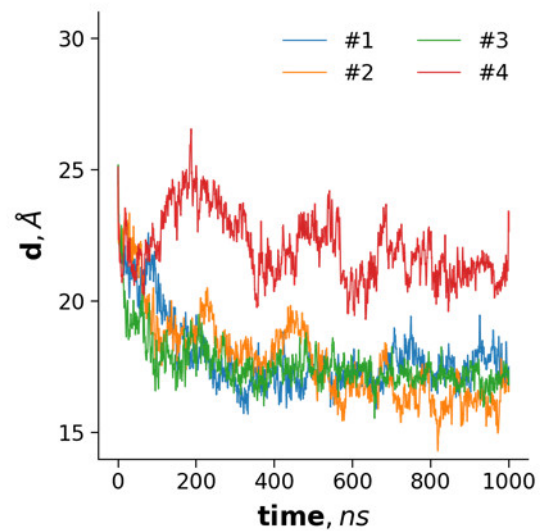
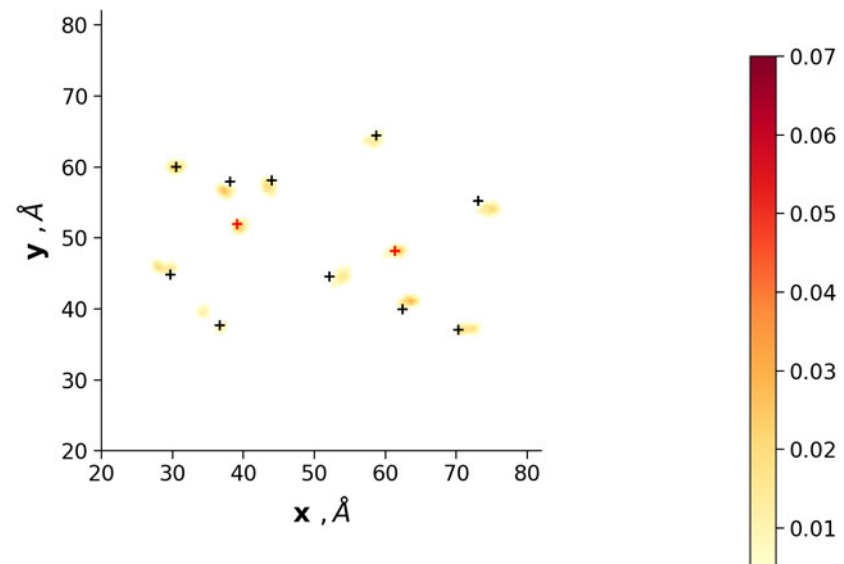
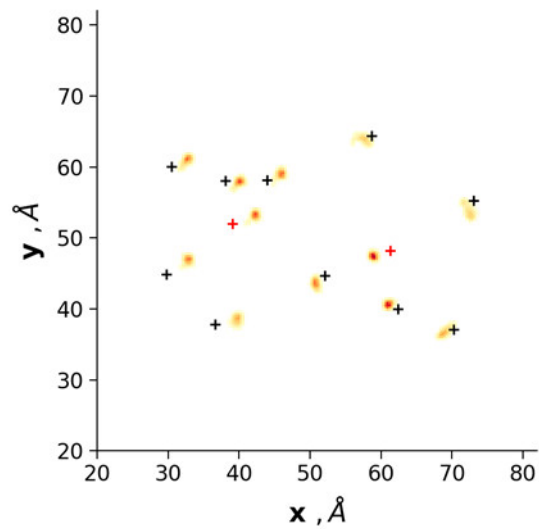
A koleszterin-hatás



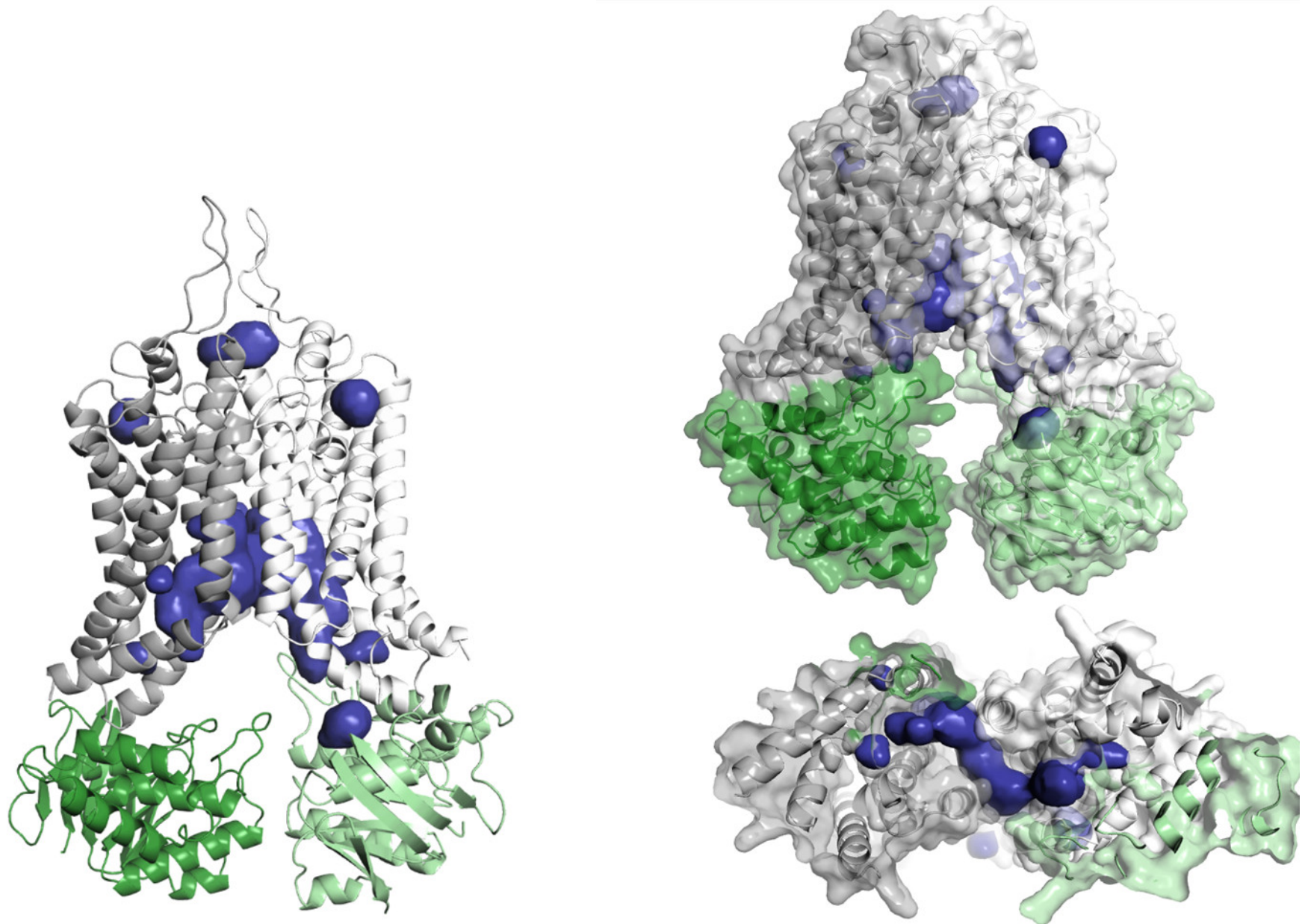
MD szimulációk POPC:CHOL membránban



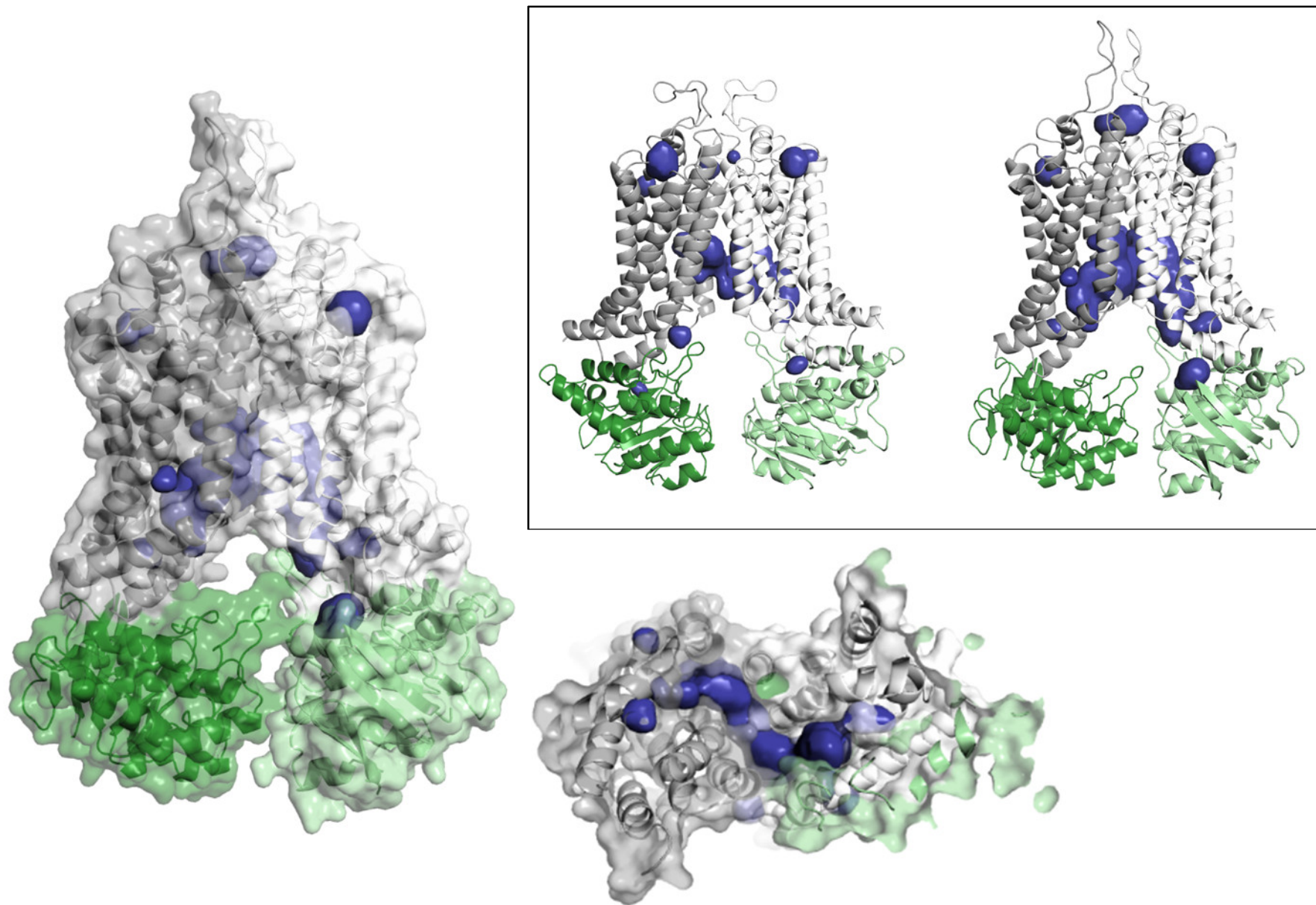
A koleszterin elősegíti a transzportot megelőző záródást



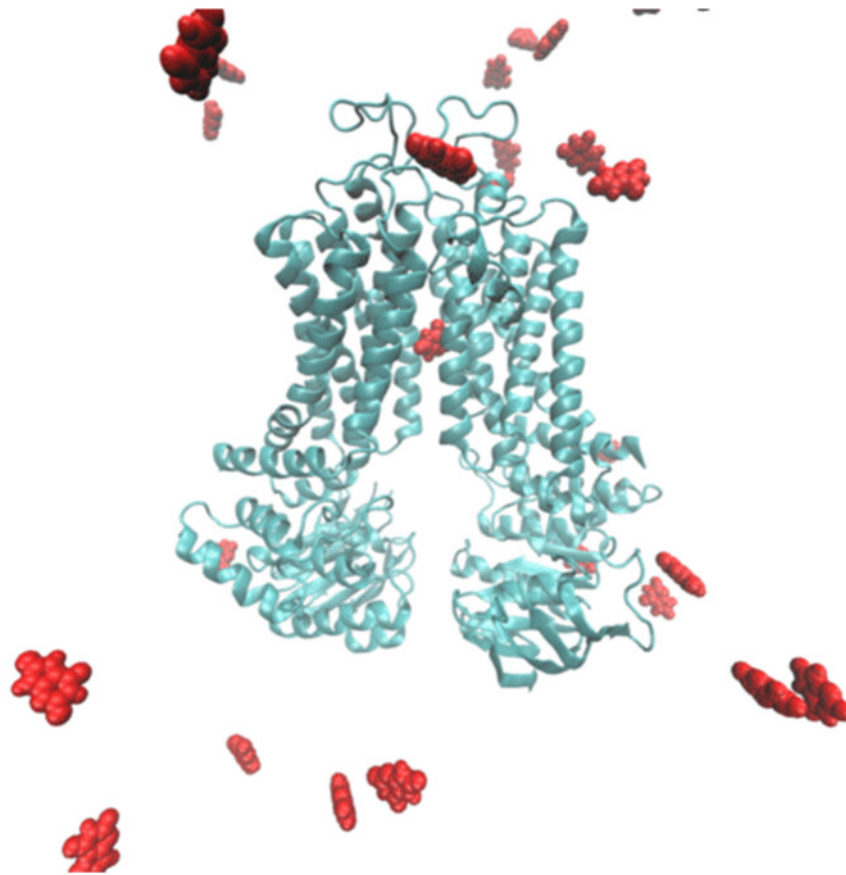
A drog-kötő zsebek dinamikus változása



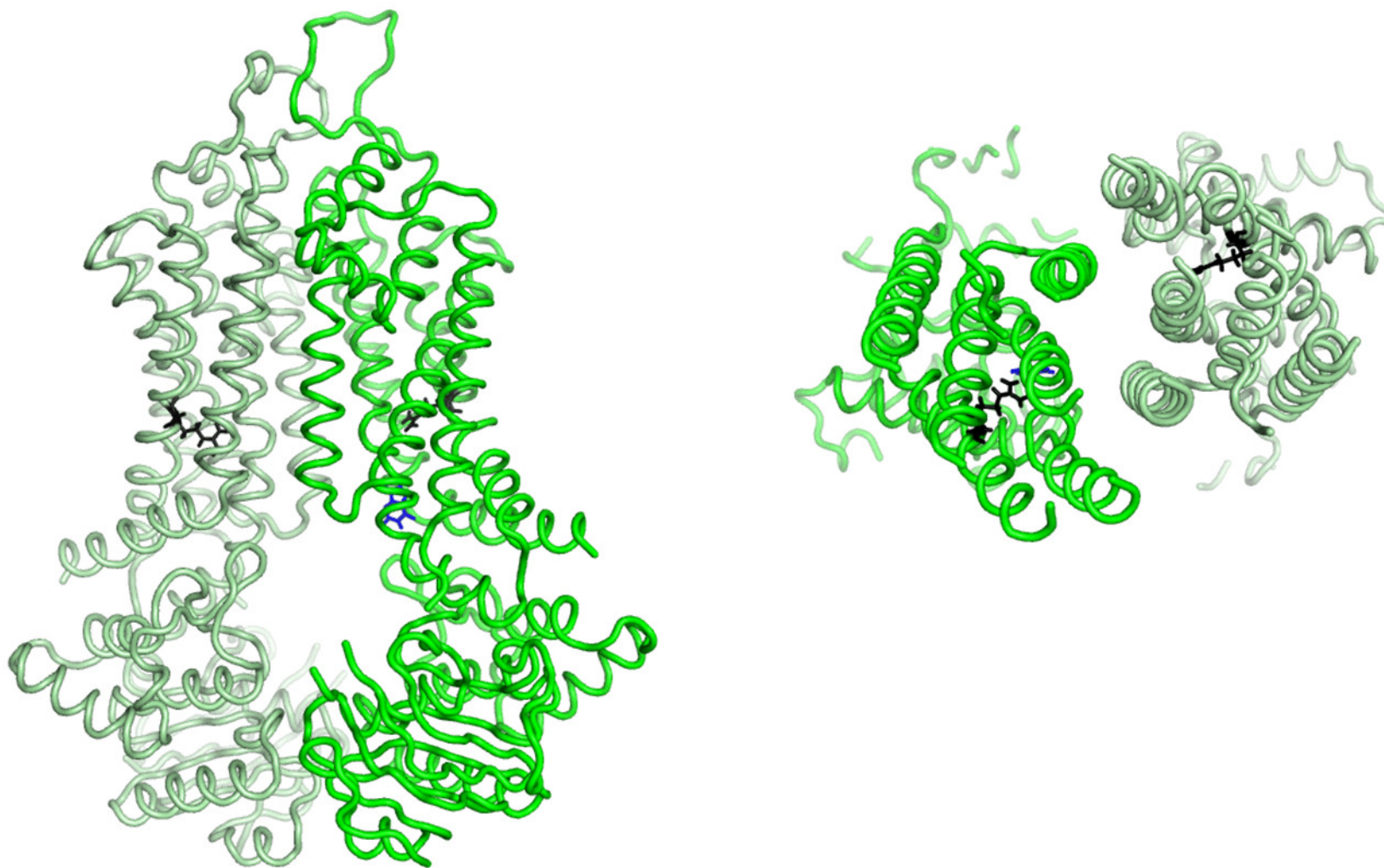
A drog-kötő zsebek dinamikus változása



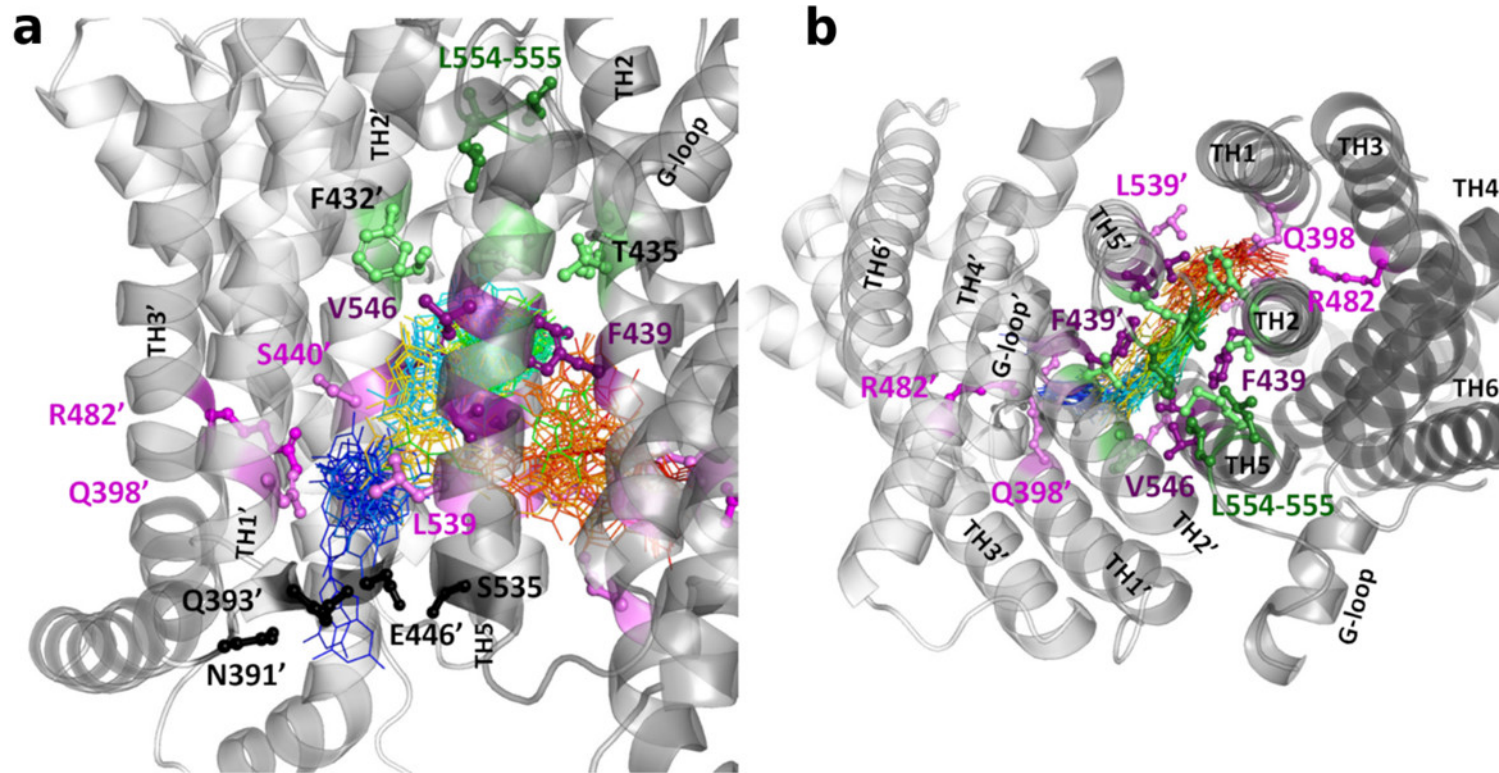
A transzport leírása egyensúlyi szimulációkkal



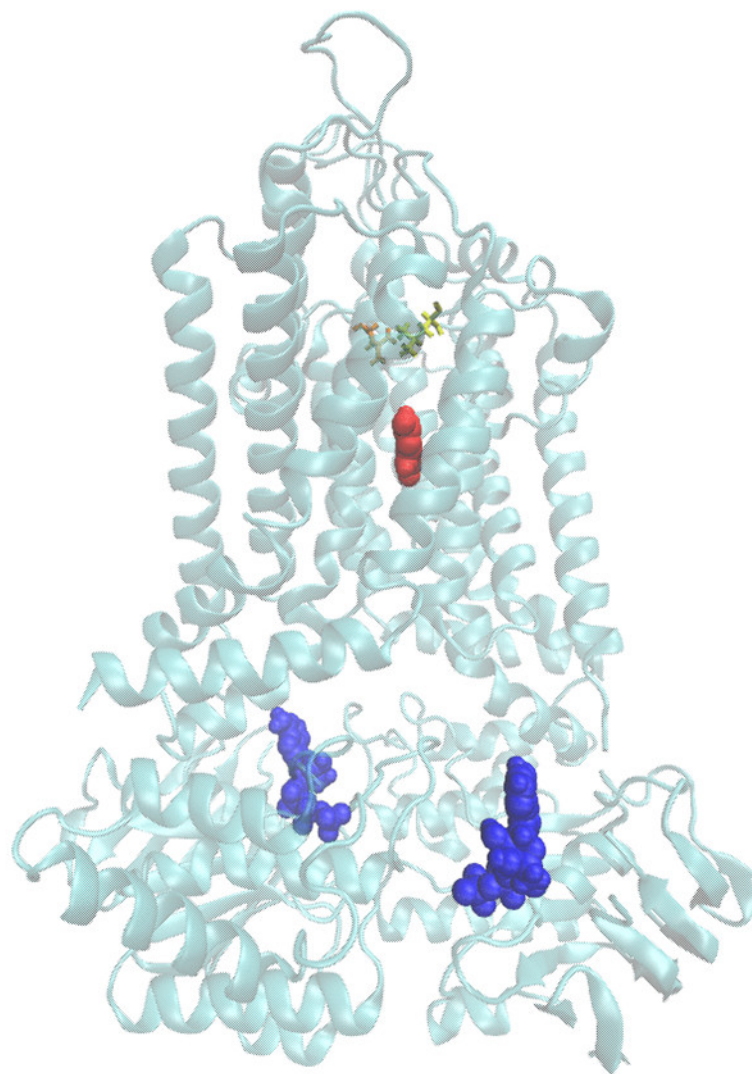
A transzport leírása egyensúlyi szimulációkkal



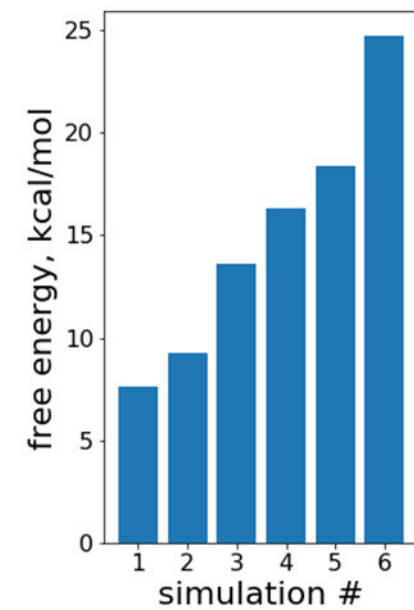
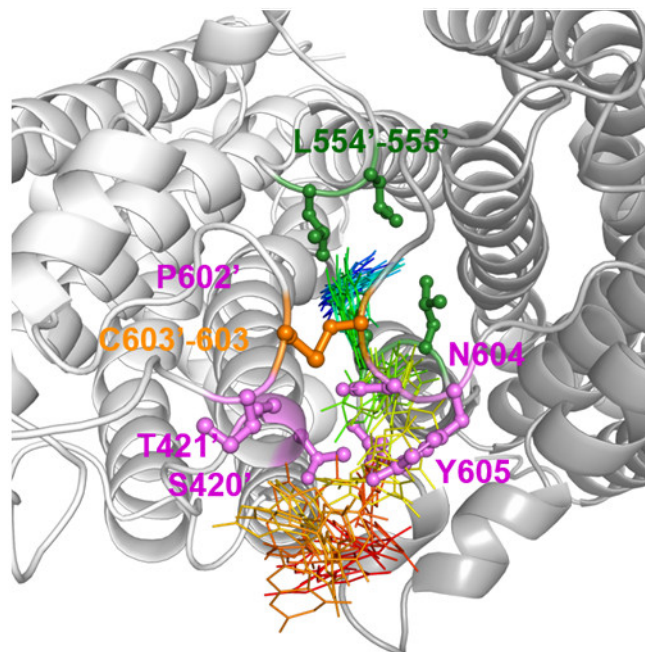
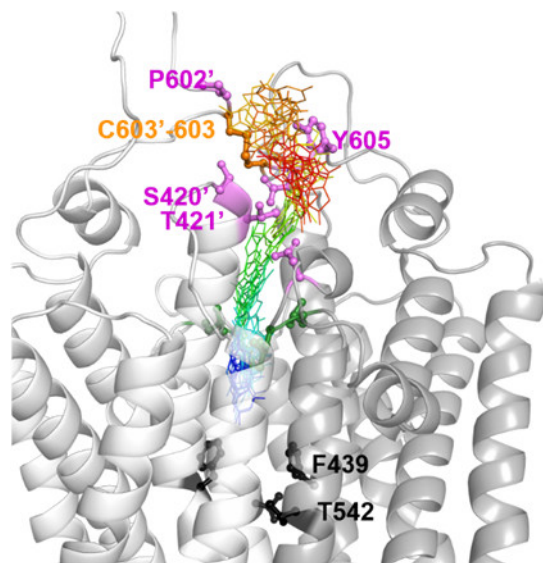
A transzport leírása egyensúlyi szimulációkkal



A „exit” jellemzése metadinamikával



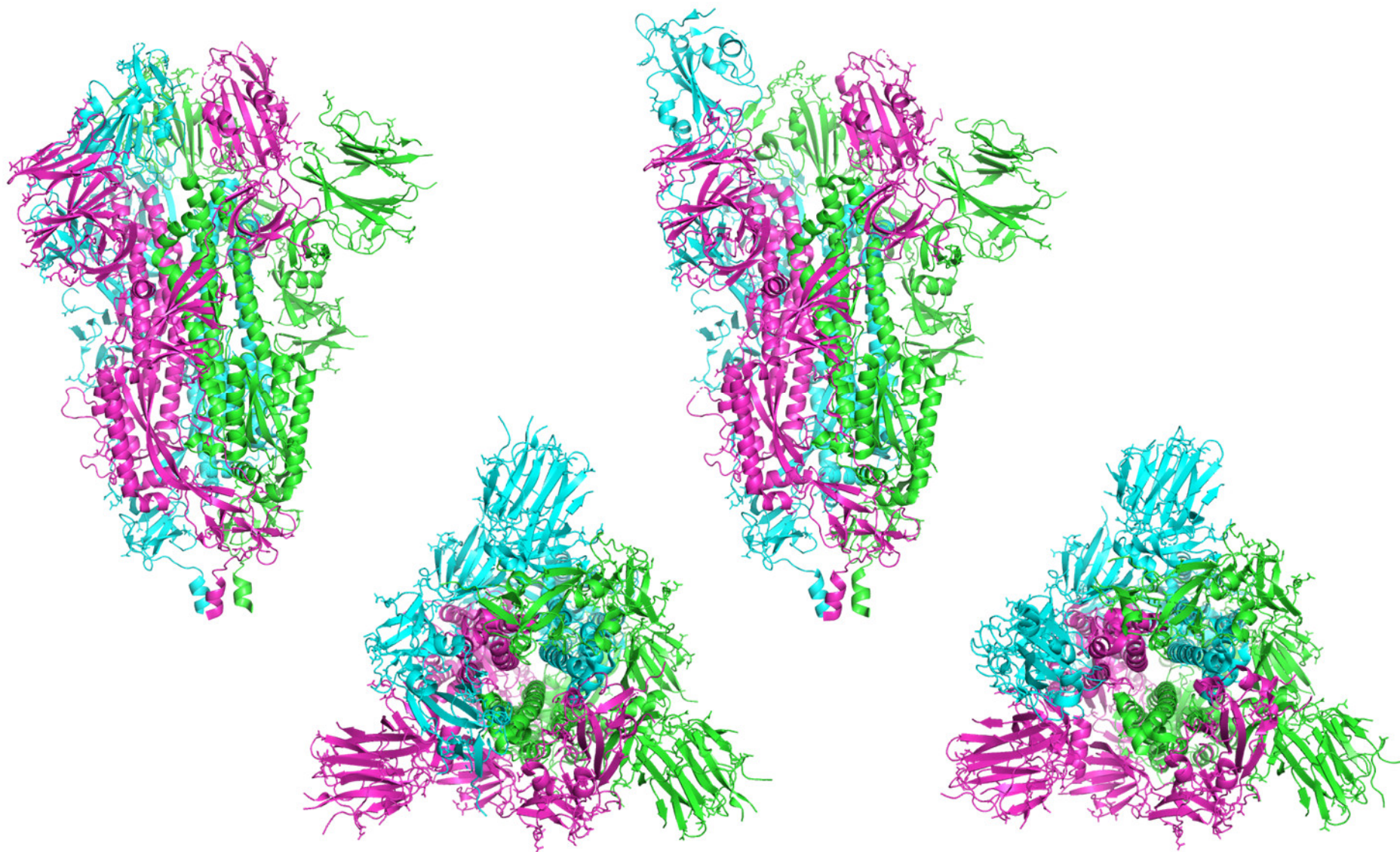
A „exit” jellemzése metadinamikával



SARS-CoV-2

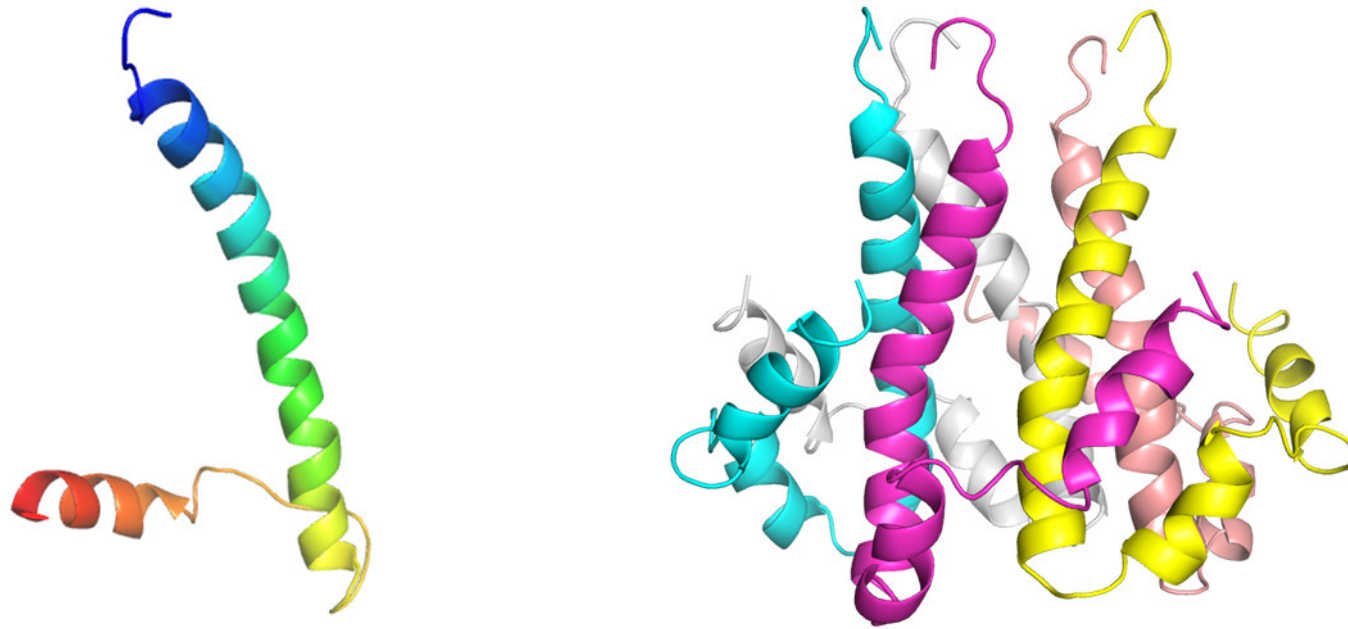
- **SARS-Cov** sok adat, szekvenciális és szerkezeti hasonlóság, homológia (modellezés)
- **Nagy erőforrás ráfordítás** már most rengeteg (szerkezeti) adat
- **Kezelési megközelítések:**
 - passzív immunizálás
 - immunizálás
(állatok immunizálása tesztrendszerek fejlesztéséhez)
 - gyógyszerfejlesztés

SARS-CoV-2, Spike fehérje



SARS CoV-2, E protein

E protein



Összefoglalás

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

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