

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

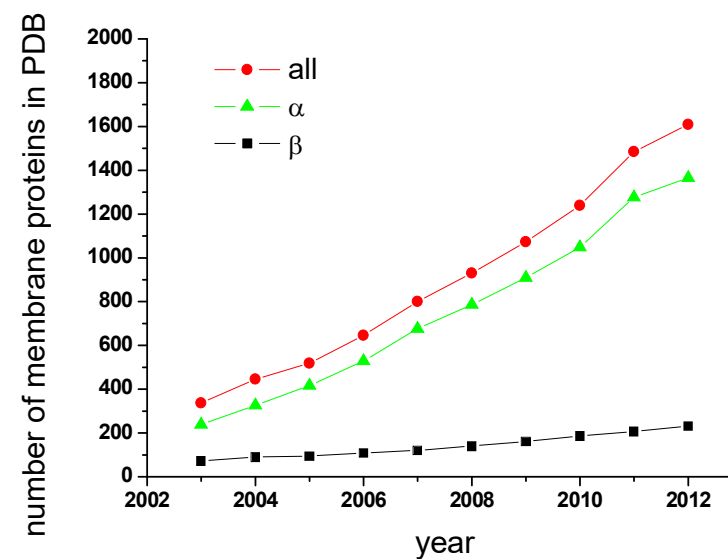
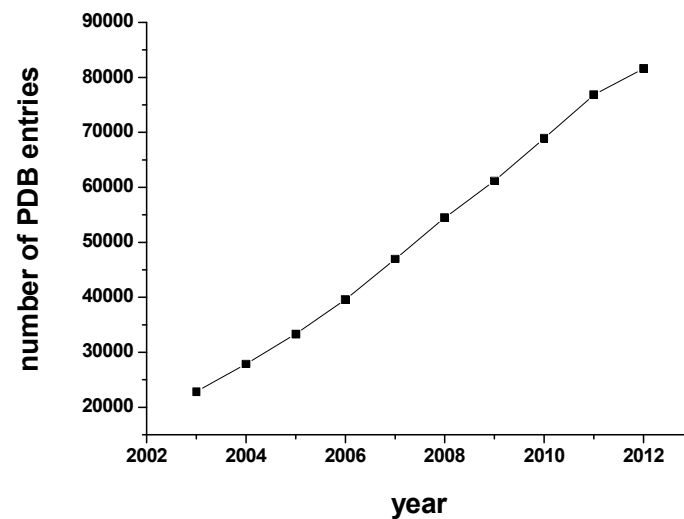
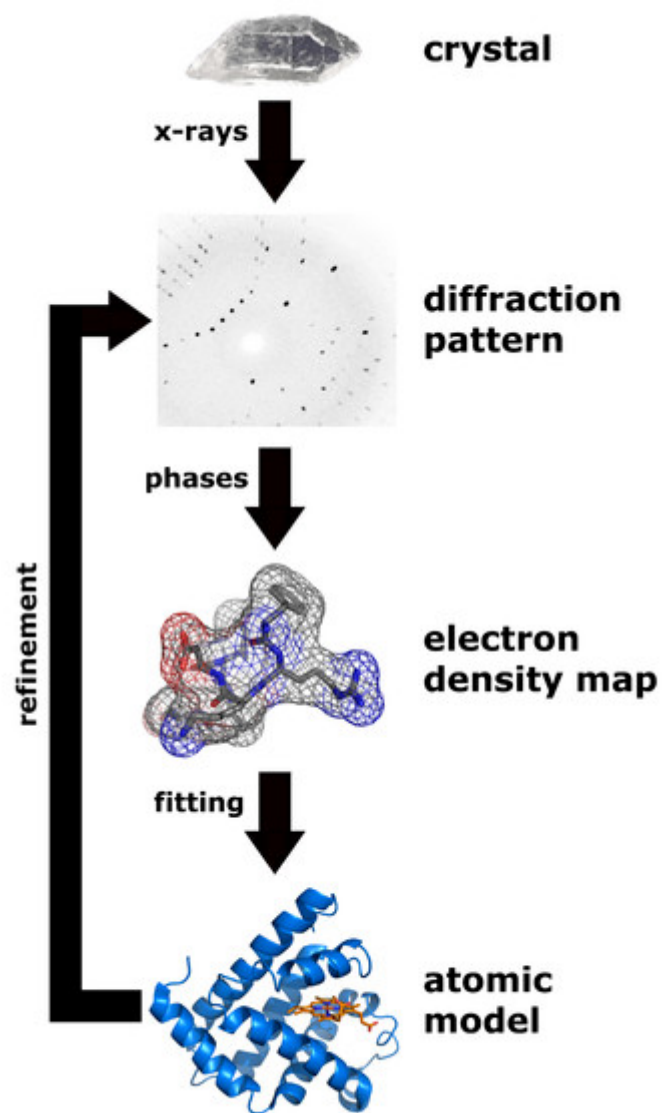
Atomi szintű információt ad mozgásokról.

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

Membránfehérjék szerkezeti modellezése

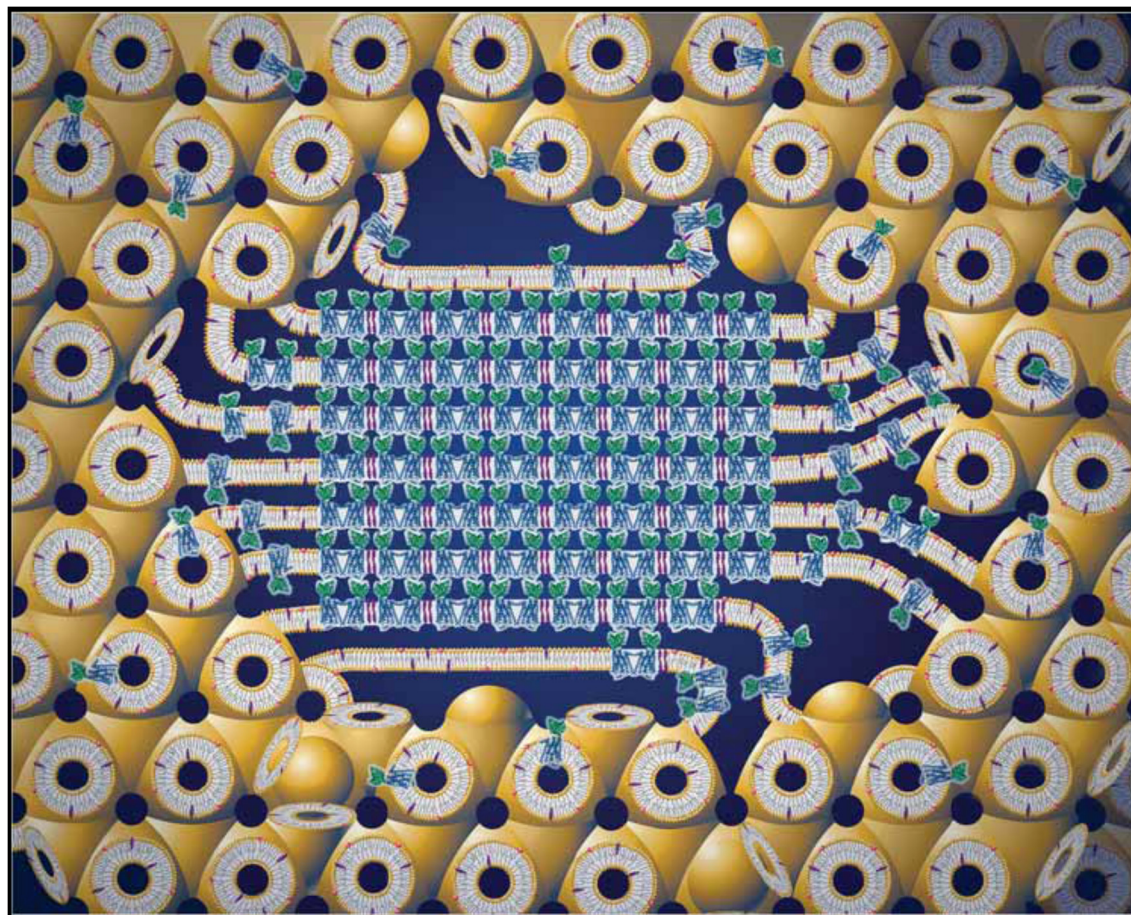
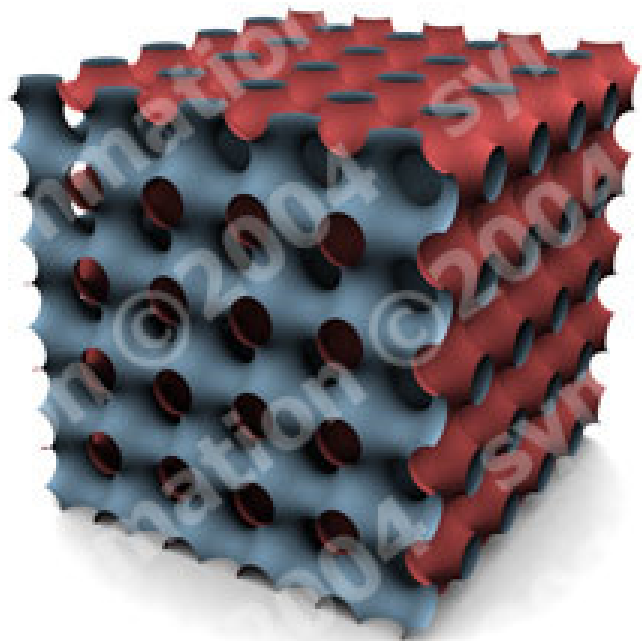
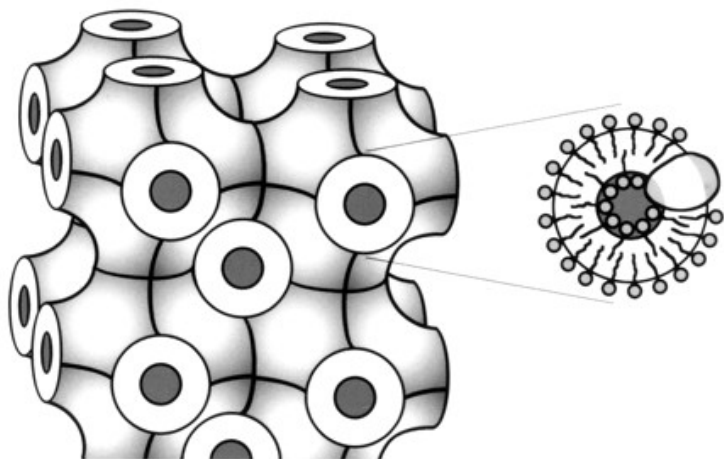
- Kísérleti adatok alapján
- Homológia modellezés
- „Threading” vagy ”fold recognition”

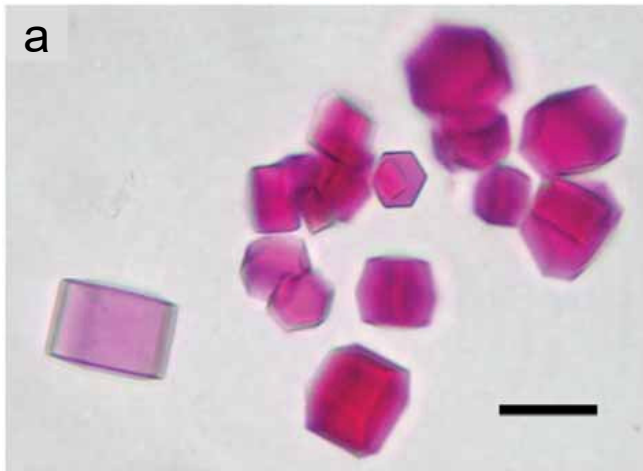
Szerkezet meghatározás – Röntgen kristallográfia



Szerkezet meghatározás – cubic phase

monoolein/water





Crystals of membrane proteins growing in the lipidic mesophase.

(a) bacteriorhodopsin

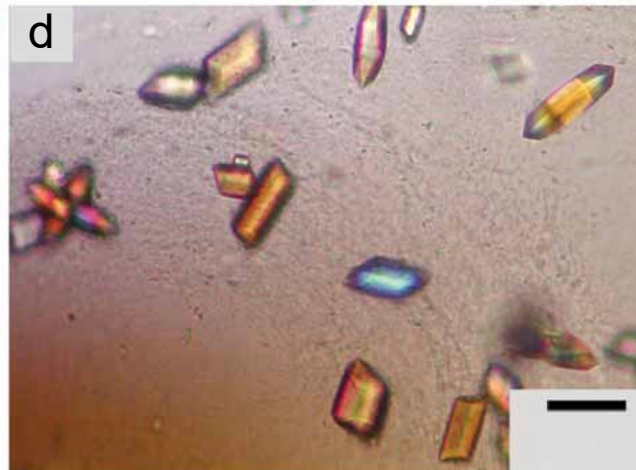
(b) light-harvesting complex II

(c) adhesin/invasin OpcA

(d) vitamin B12 transporter BtuB

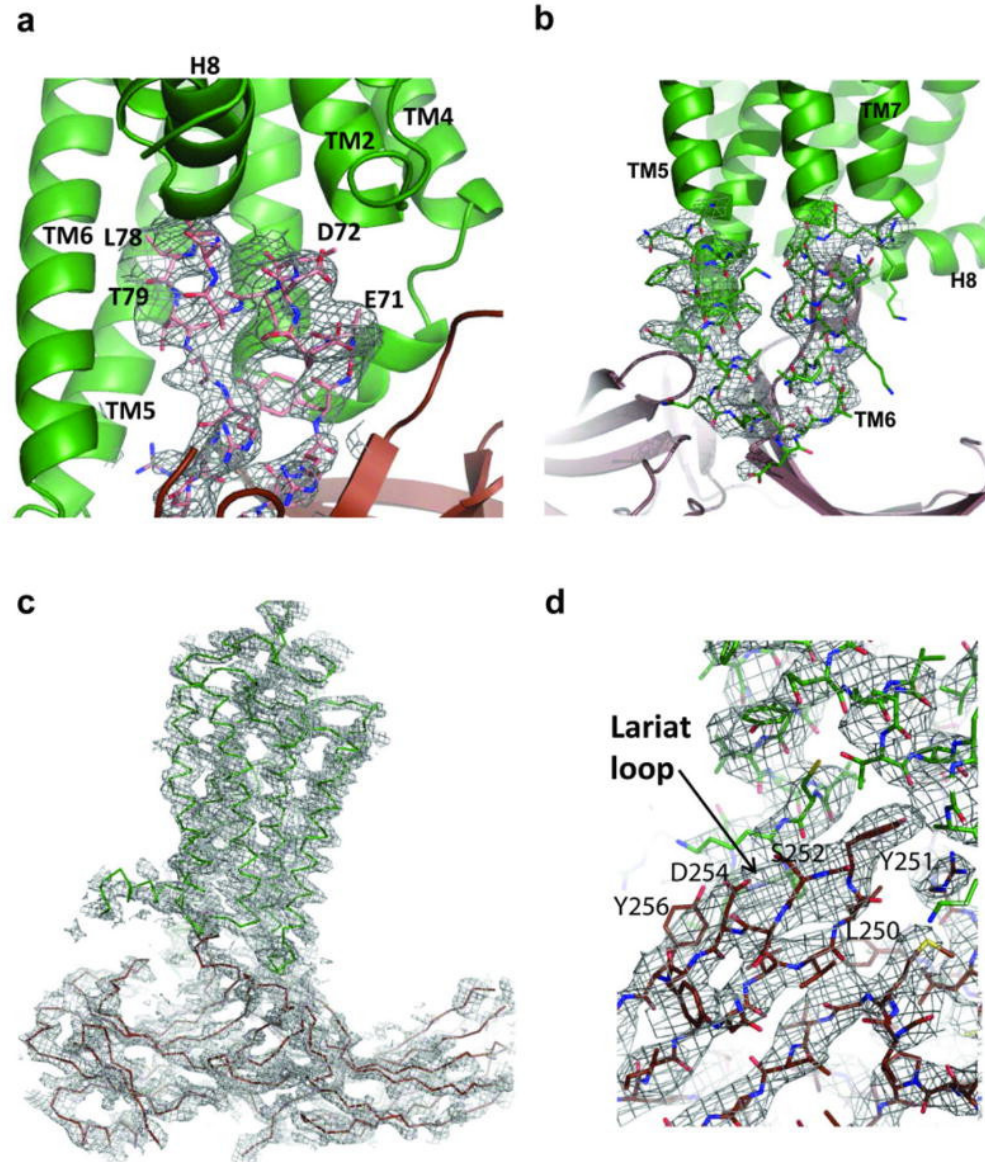
(e) human $\beta 2$ adrenergic receptor-T4 lysozyme chimera

(f) carbohydrate transporter from *Pseudomonas*



Szerkezet meghatározás – „single particle”

Free Electron Laser (FEL)



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

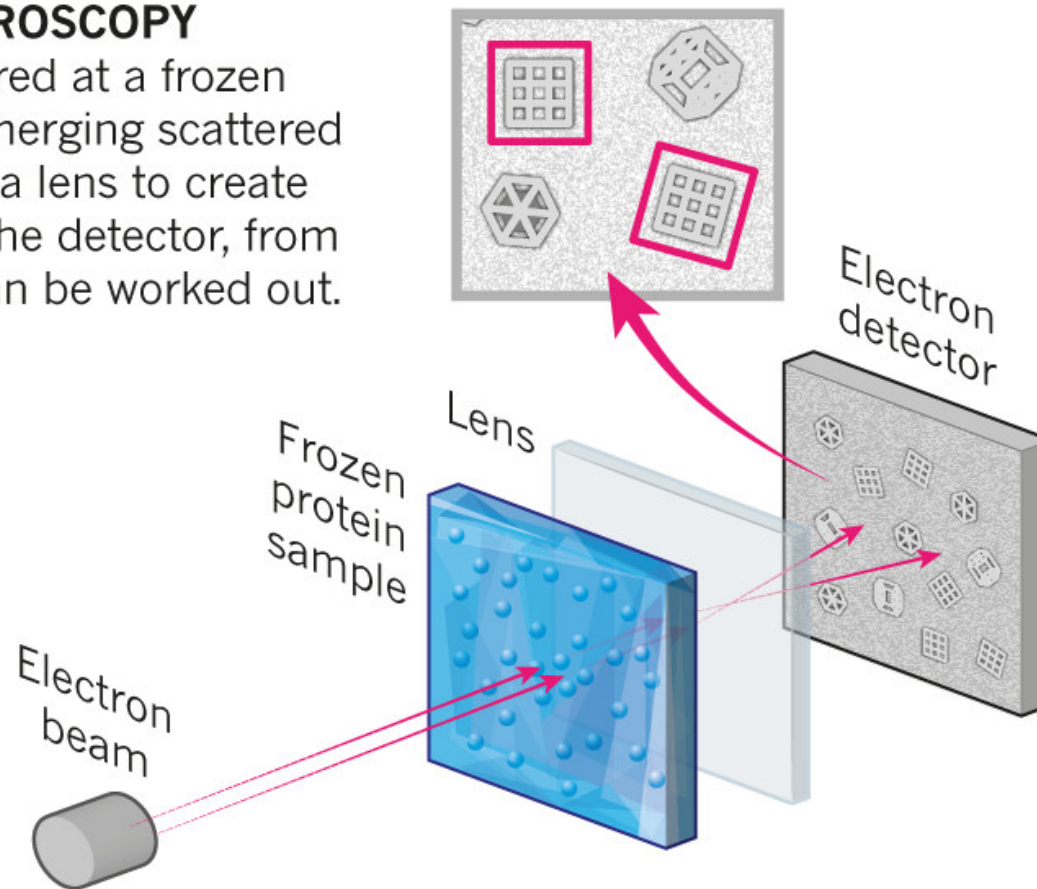
Crystal structure of
rhodopsin bound to
arrestin by
femtosecond X-ray
laser.

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.



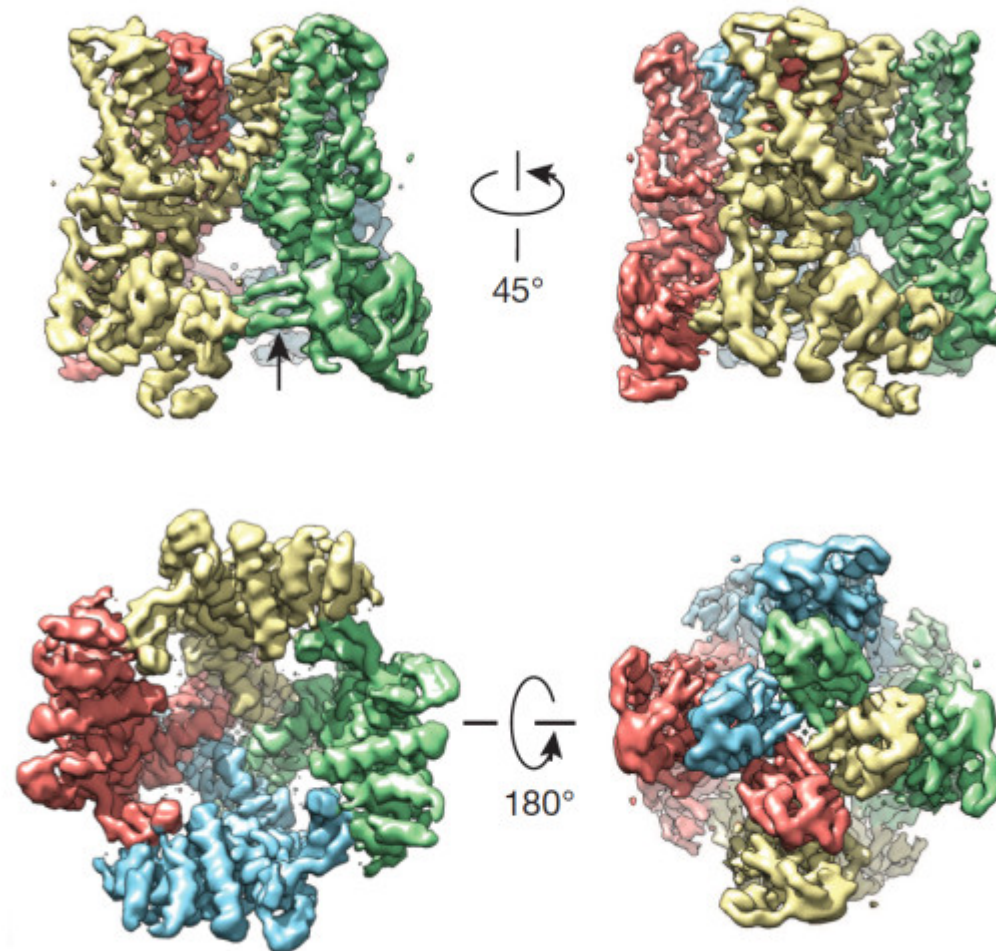
© nature

Ewen Callaway, Nature | News Feature

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

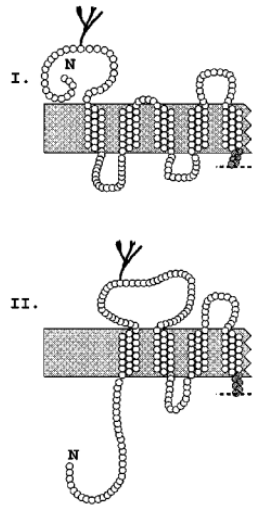
Szerkezet meghatározás – „single particle”

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

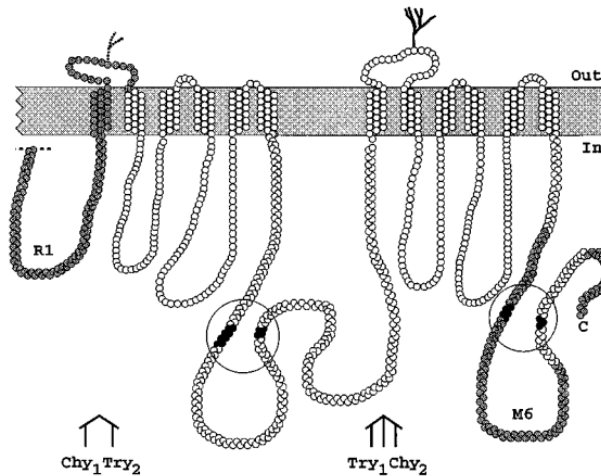


Membránfehérjék topológiája

MRP



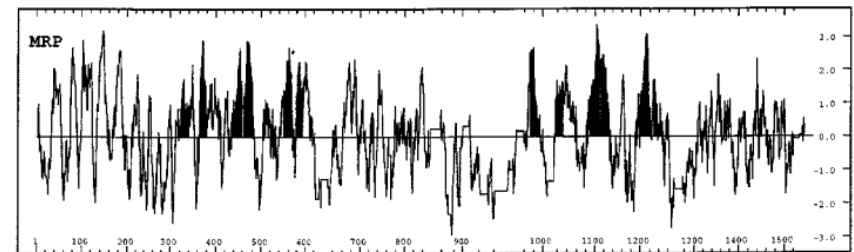
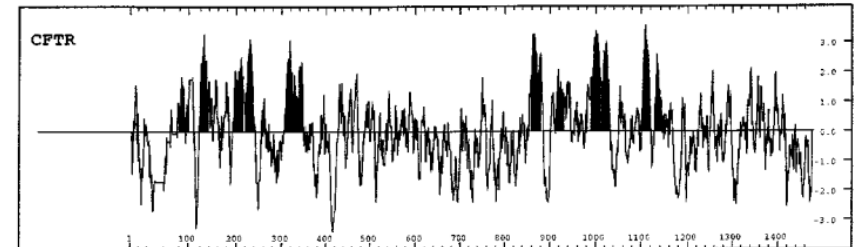
Bakos *et al.* JBC 1996



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

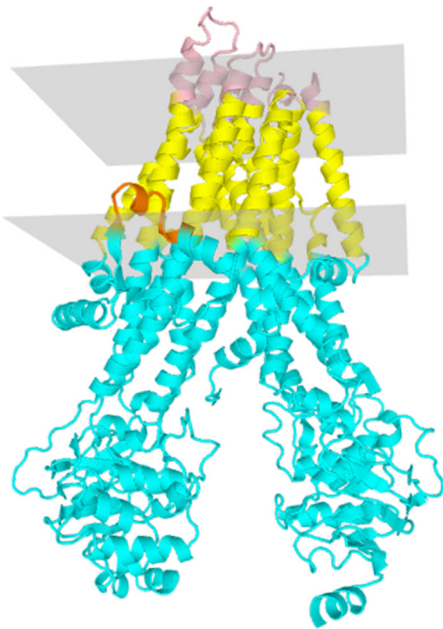
- Szekvencia alapján
 - *positive-inside rule*
 - TM hélixek és nem-TM részek aminosav eloszlása más
- Biológiai tudás figyelembevételének lehetősége
- Több prediktor integrálása

pl. CCTOP.enzim.hu

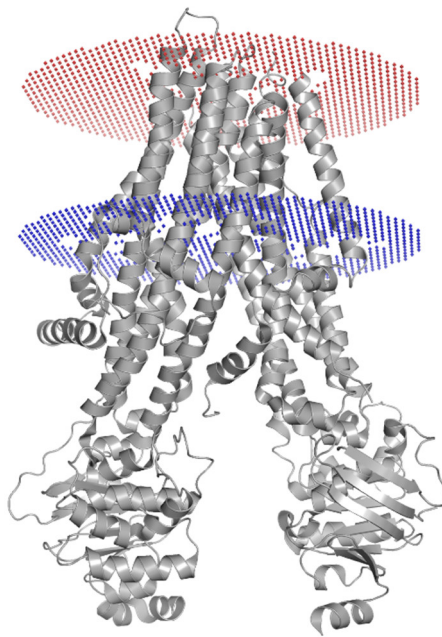
TM hélixek predikciója szerkezet alapján

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

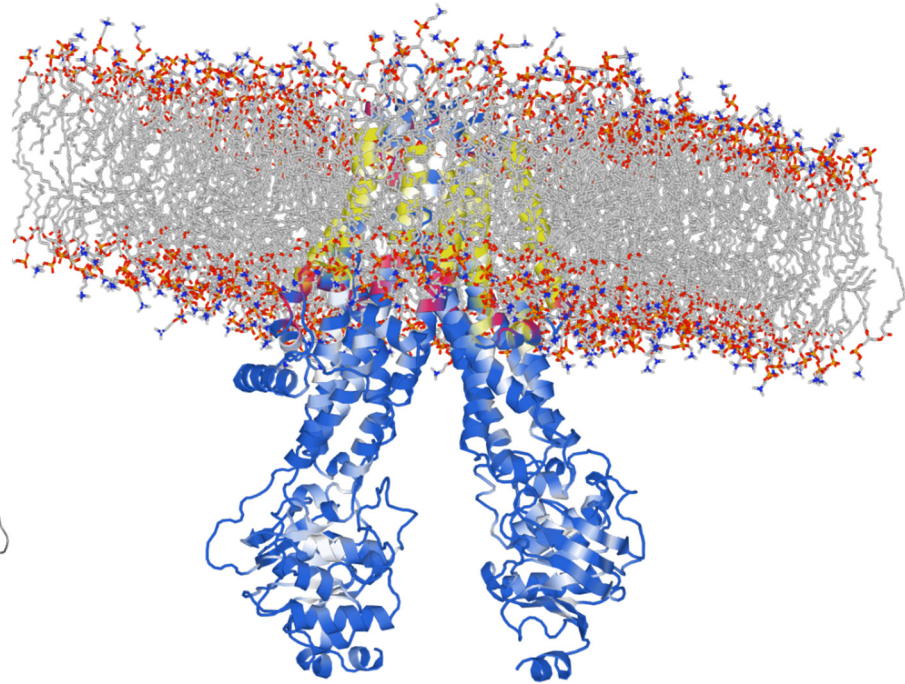
TMDet
PDBTM



PPM
OPM

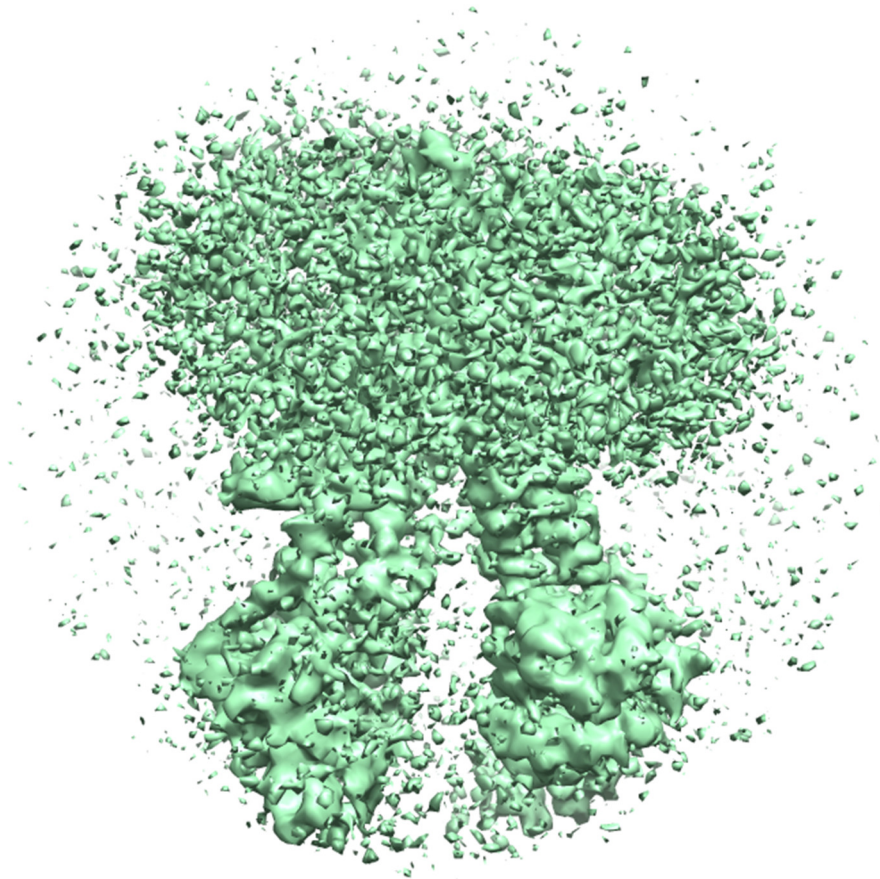


MemProtMD

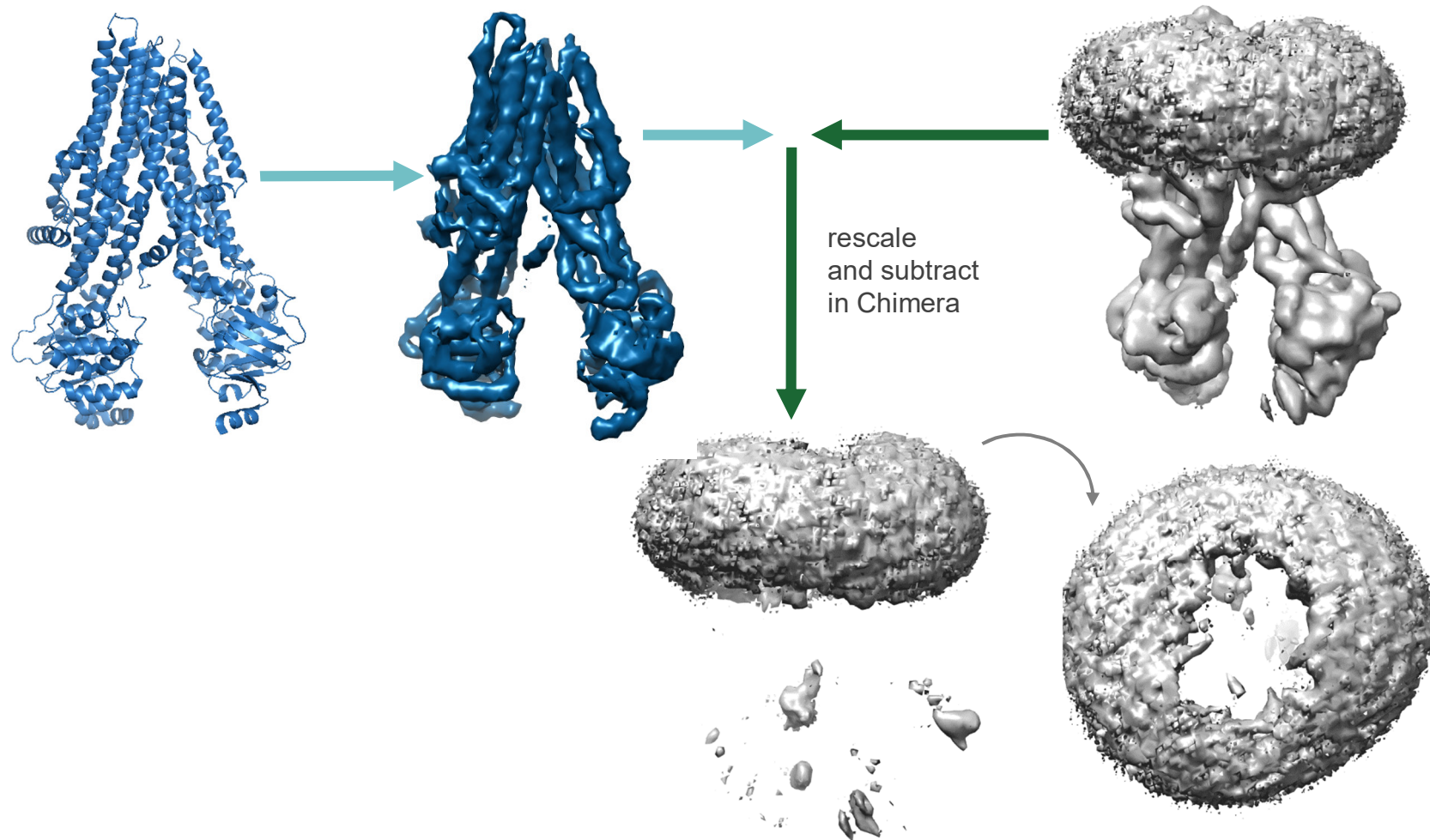


Membrane embedding data is in the
electron density maps

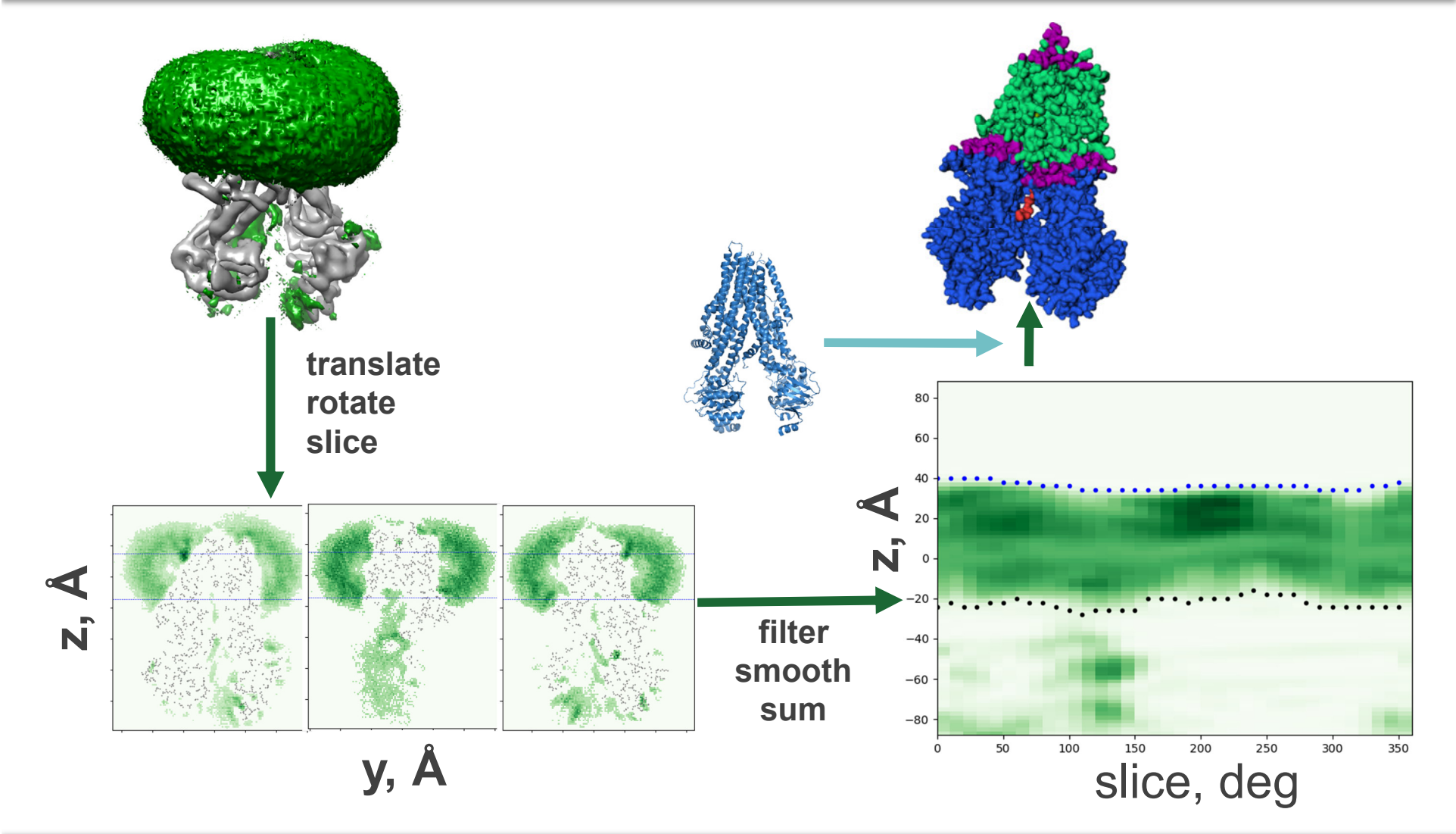
CFTR (PDBID: 5UAK) EMD



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**

	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	-2	0	-3	-1	4

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

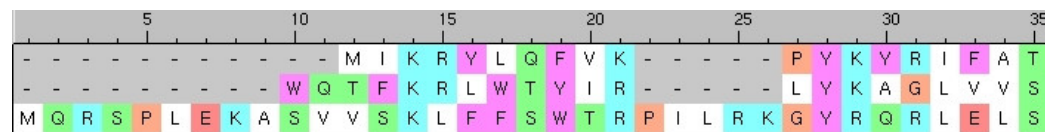
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Alignement – pl. ClustalW

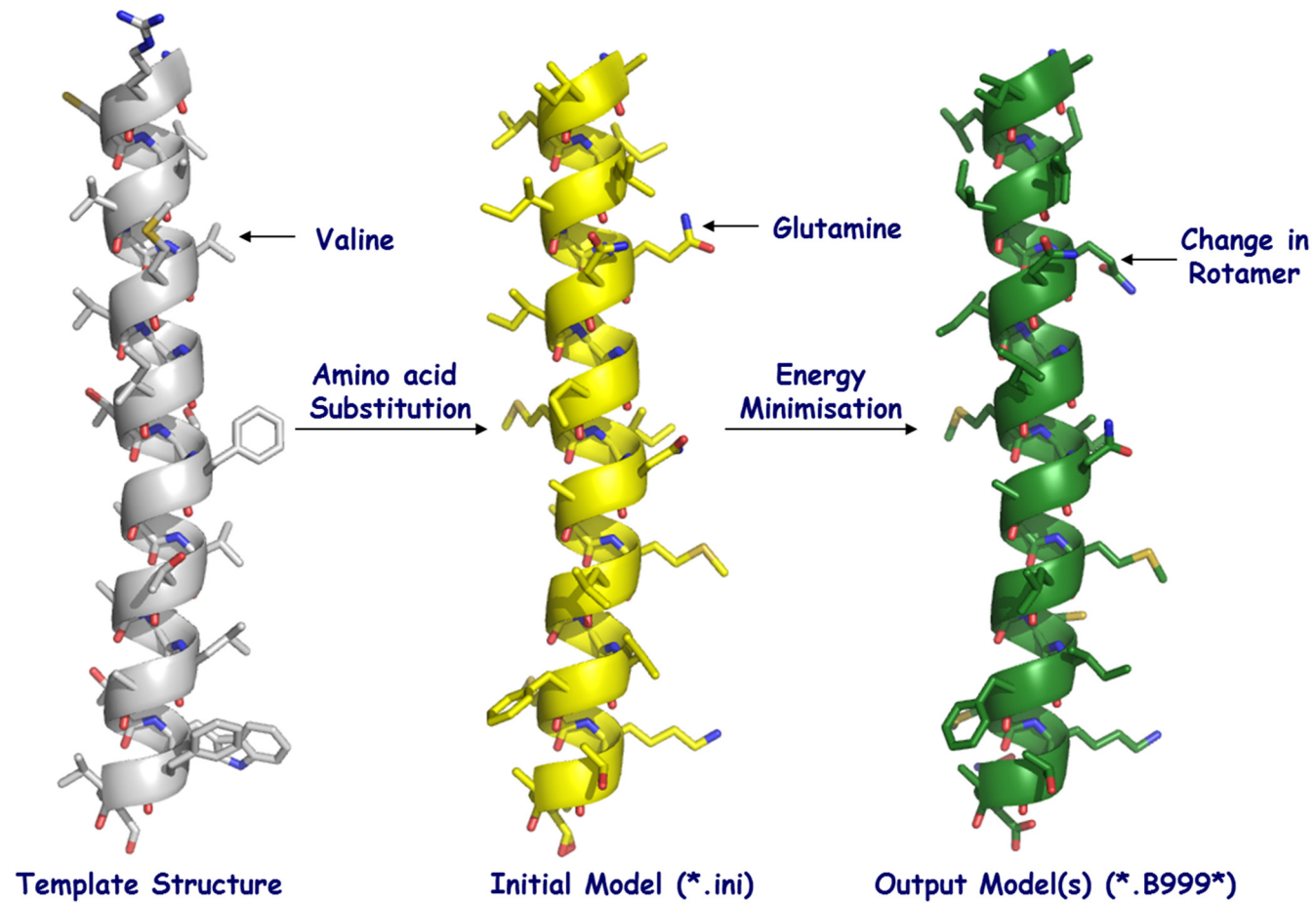
```

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

```



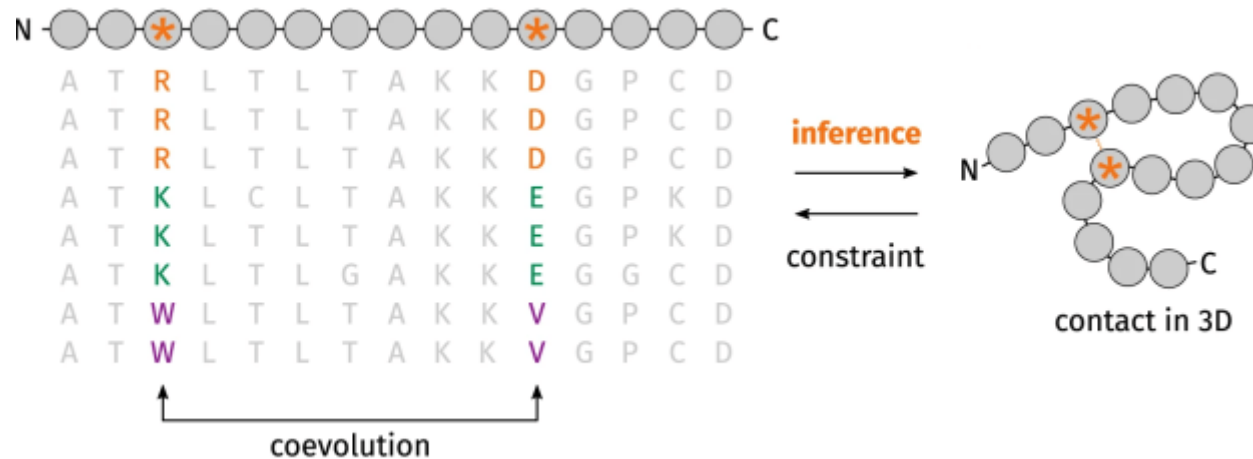
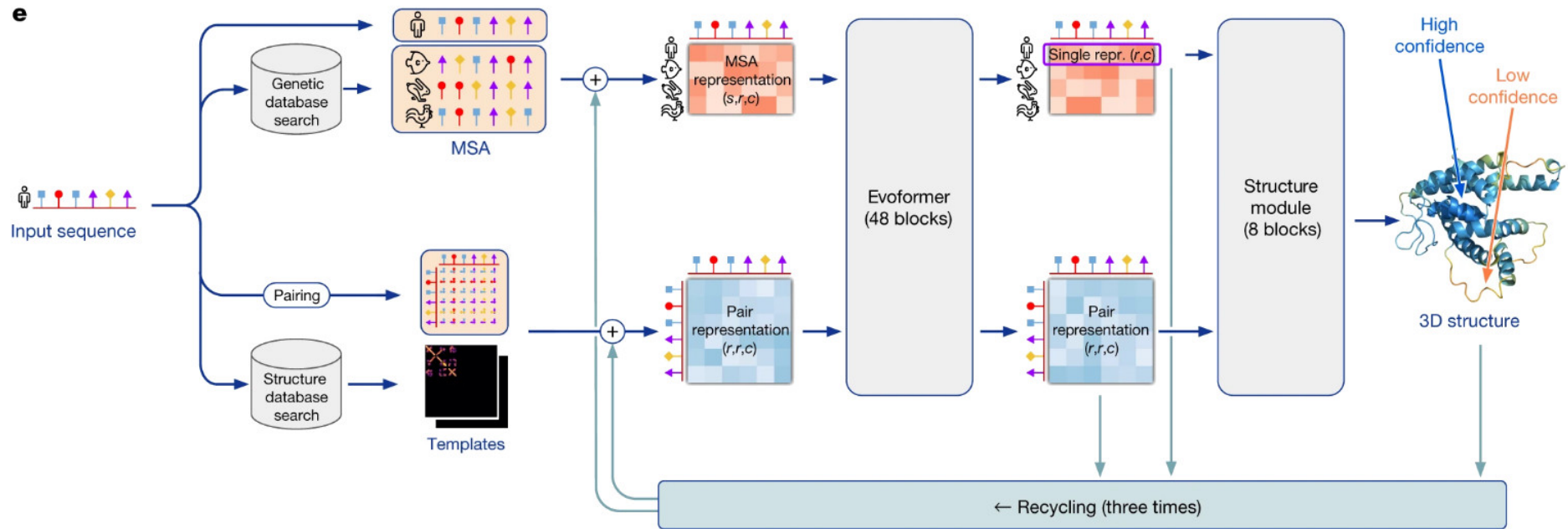
Homológia modellezés II.



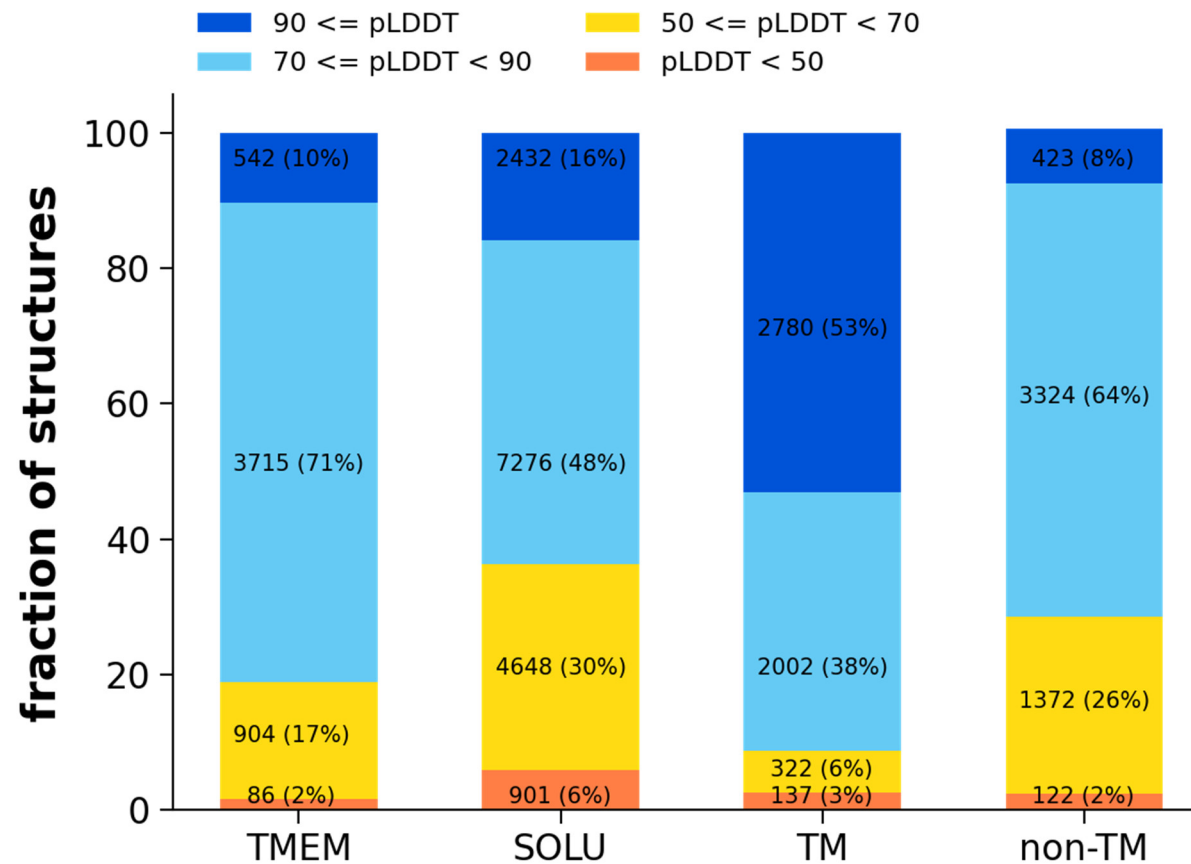
AlphaFold2

machine learning, deep learning, AI

Jumper et al. Nat 2021

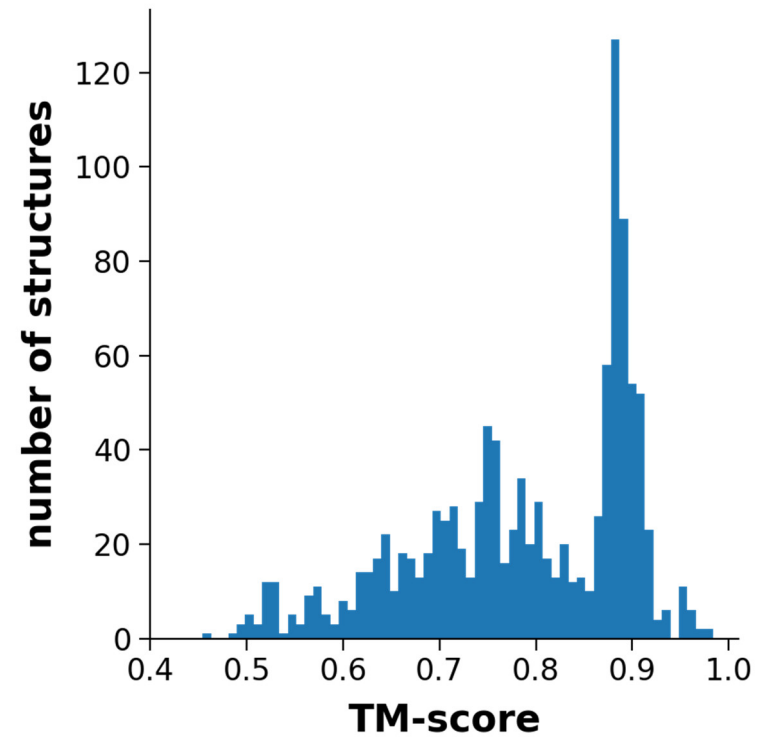
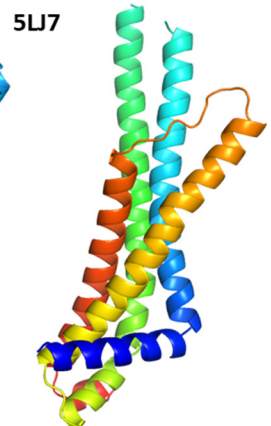
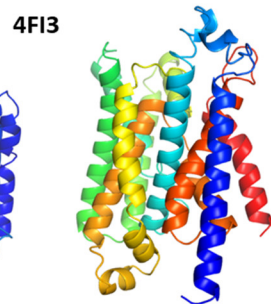
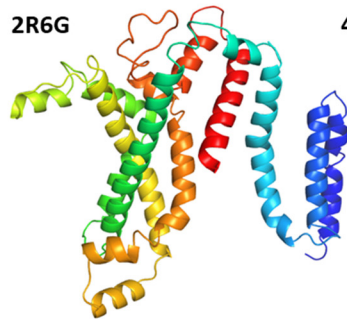
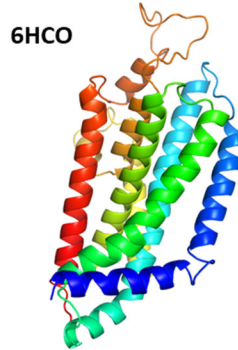
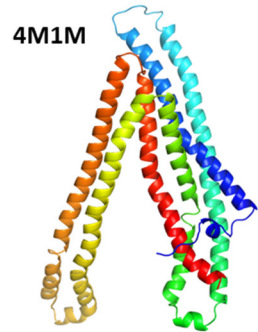


TM protein structure prediction by AF2

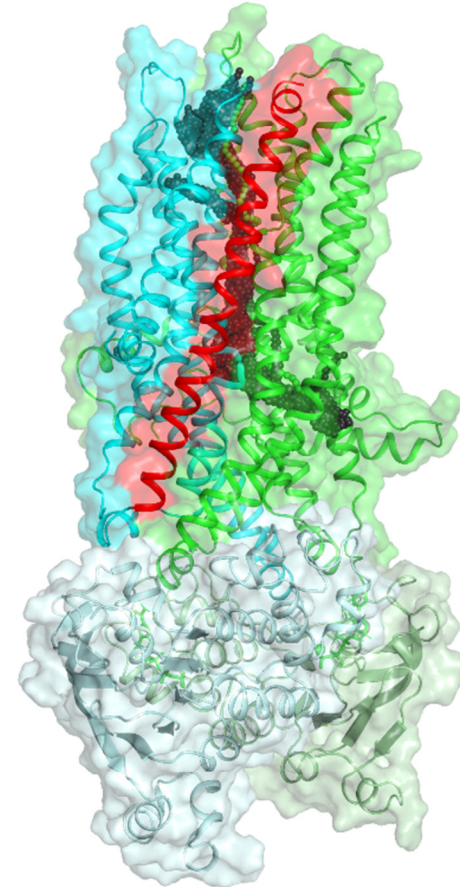
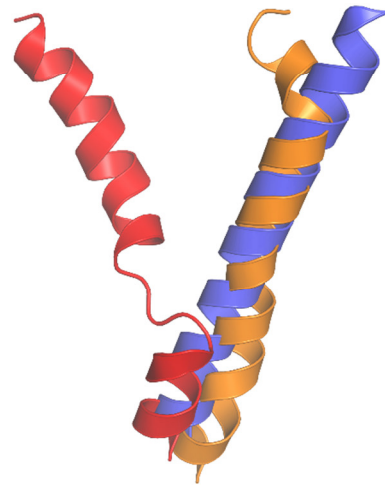
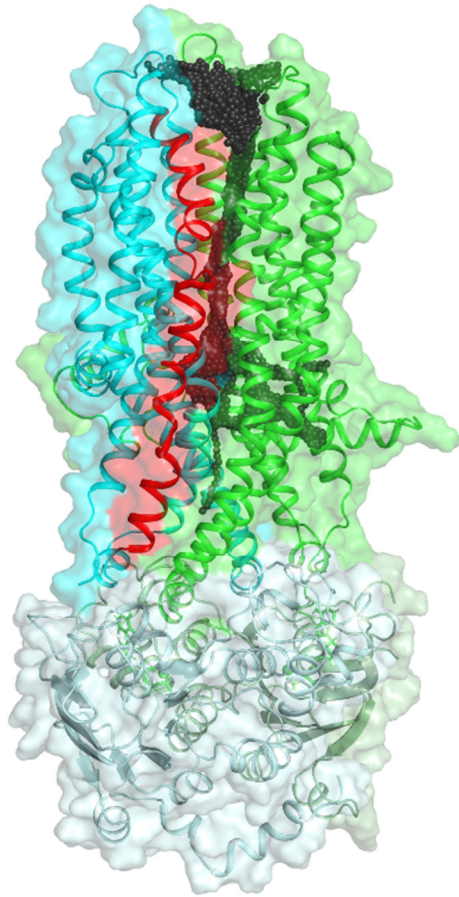


ABC protein folds

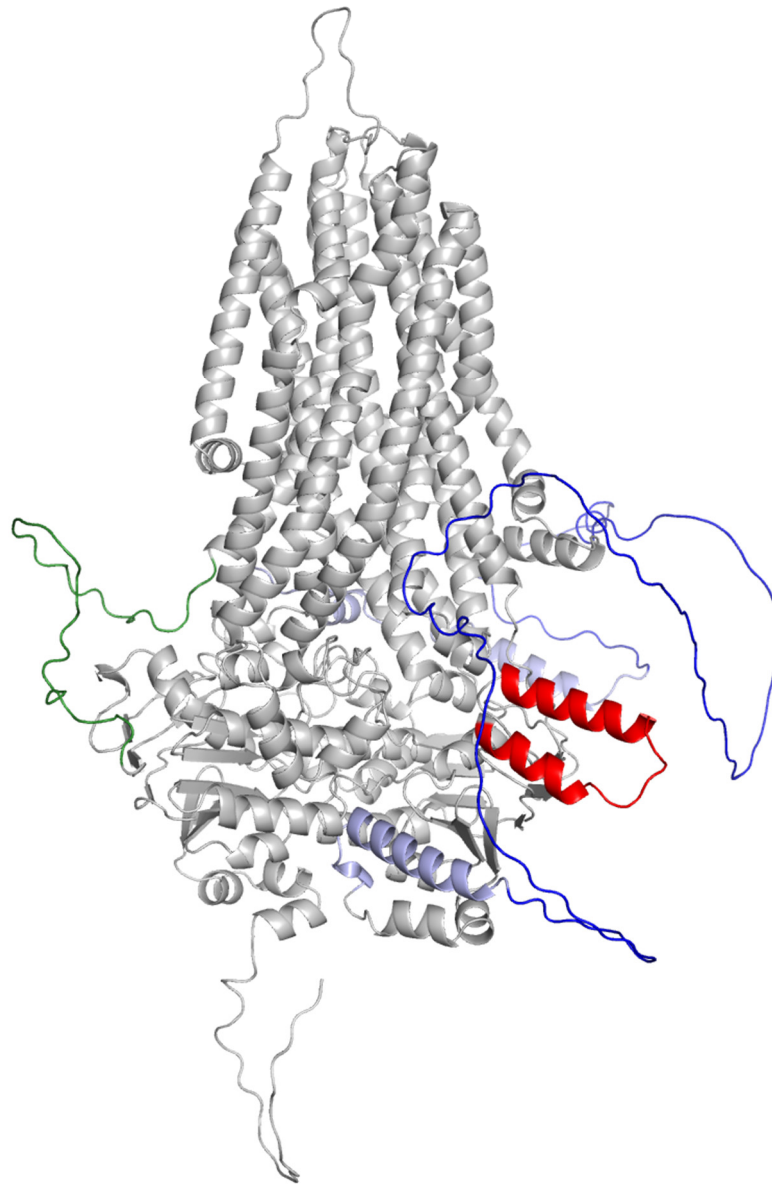
fold class	reference PDB
Pgp-like	4M1M
ABCG2-like	6HCO
MalFG-like	2R6G
BtuC-like	4FI3
EcT-like	4HUQ
LptFG-like	5X5Y
MacB-like	5LJ7
MlaE-like	7CH0



CFTR TM8



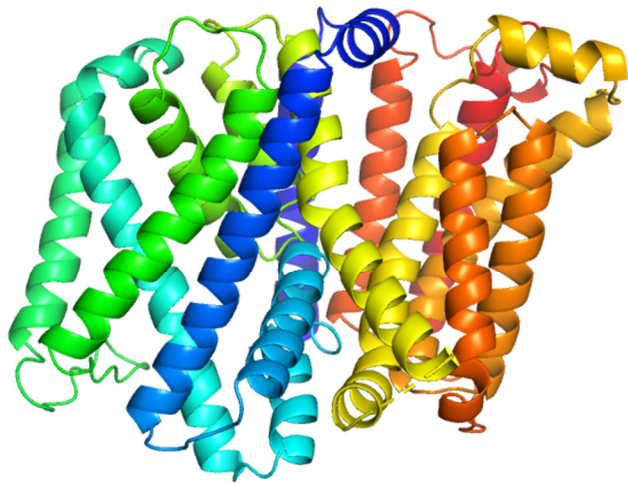
CFTR – disordered regions



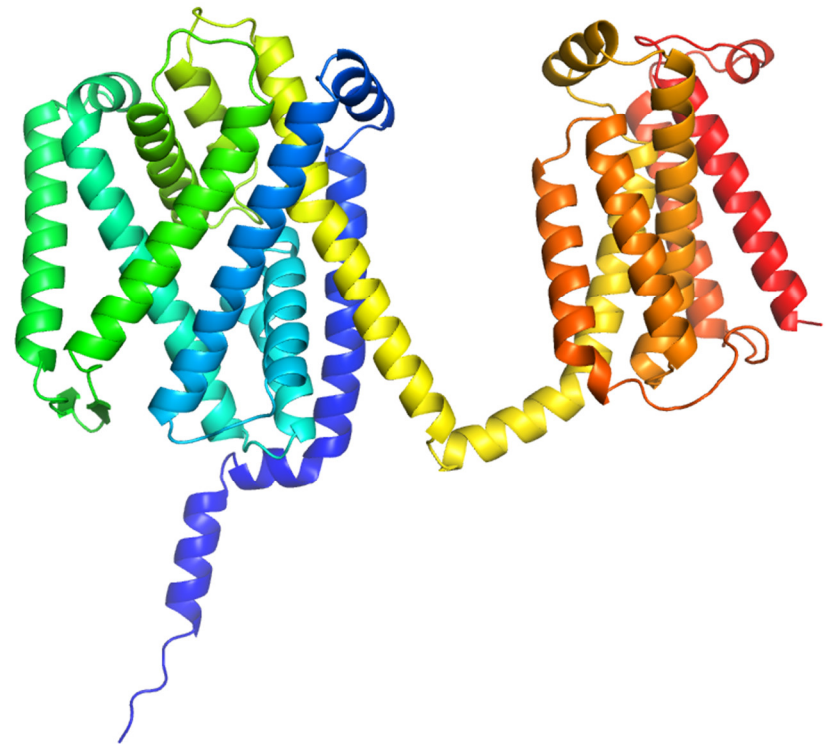
pLDDT score - IDR prediction

Prediction of new TM folds

MprF (PDBID: 7DUW)



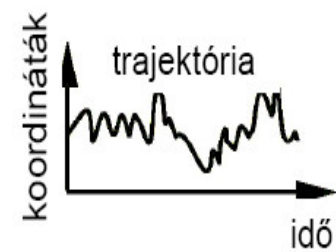
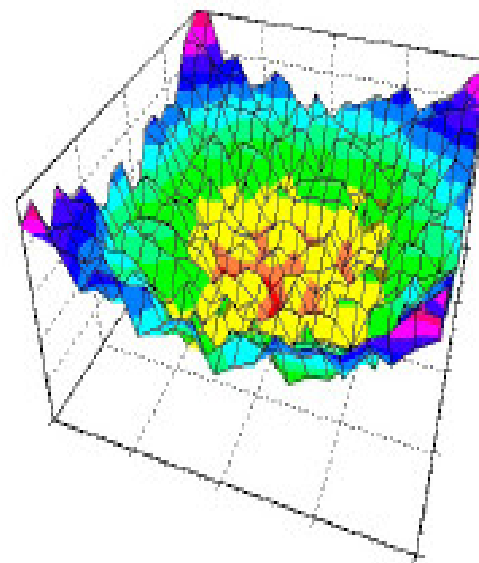
AF2



Van szerkezet, mozgassuk meg!

Molekula dinamika/Molecular dynamics

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



A „force field”

Baker (2007)

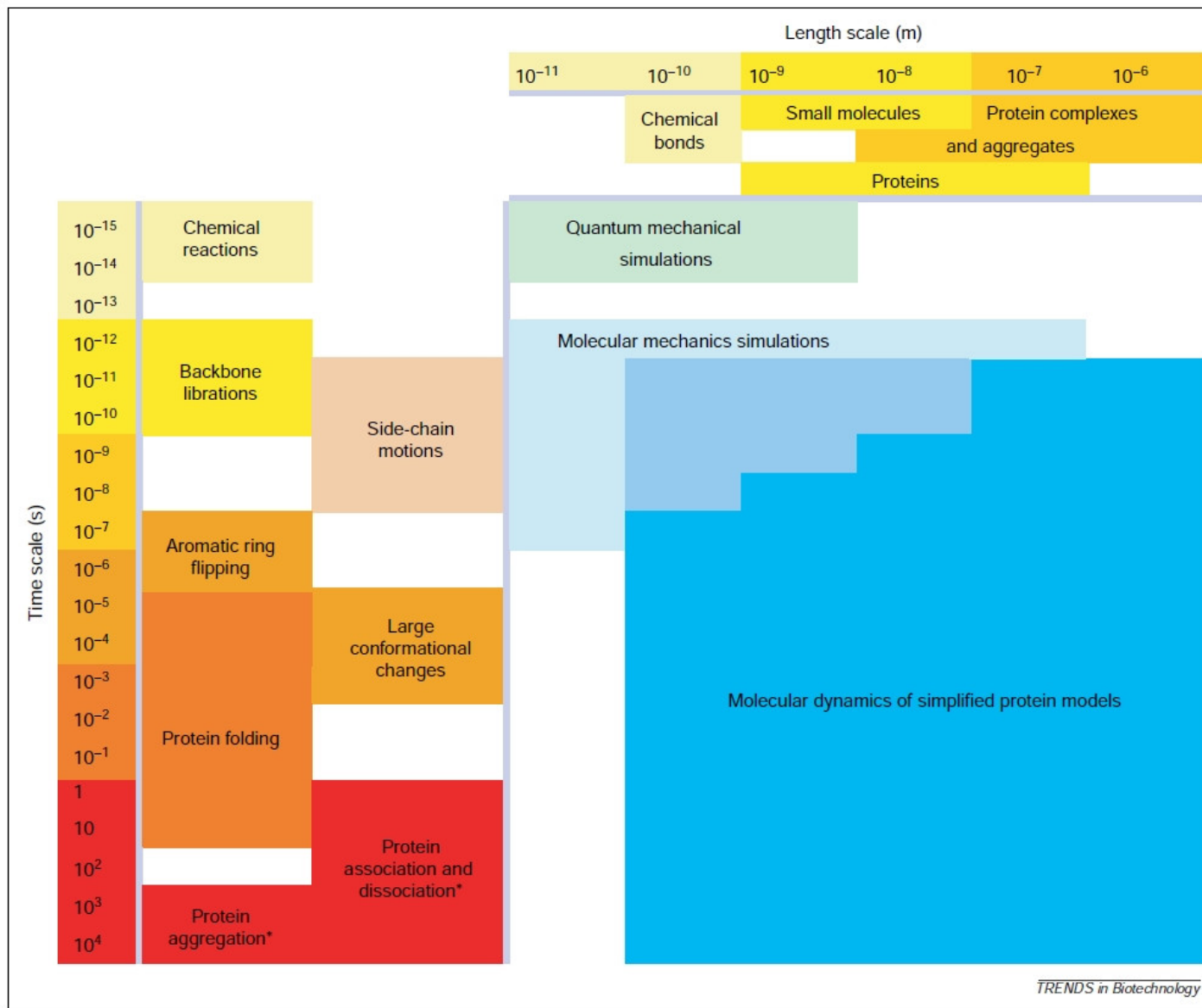
$$E_{\text{prot}} = W_{\text{rot}} E_{\text{rot}} + W_{\text{atr}} E_{\text{atr}} + W_{\text{rep}} E_{\text{rep}} + W_{\text{solv}} E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}} E_{\text{pair}} + W_{\text{mbenv}} E_{\text{mbenv}} + W_{\text{hbond}} E_{\text{hbond}} - E_{\text{ref}}$$

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

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

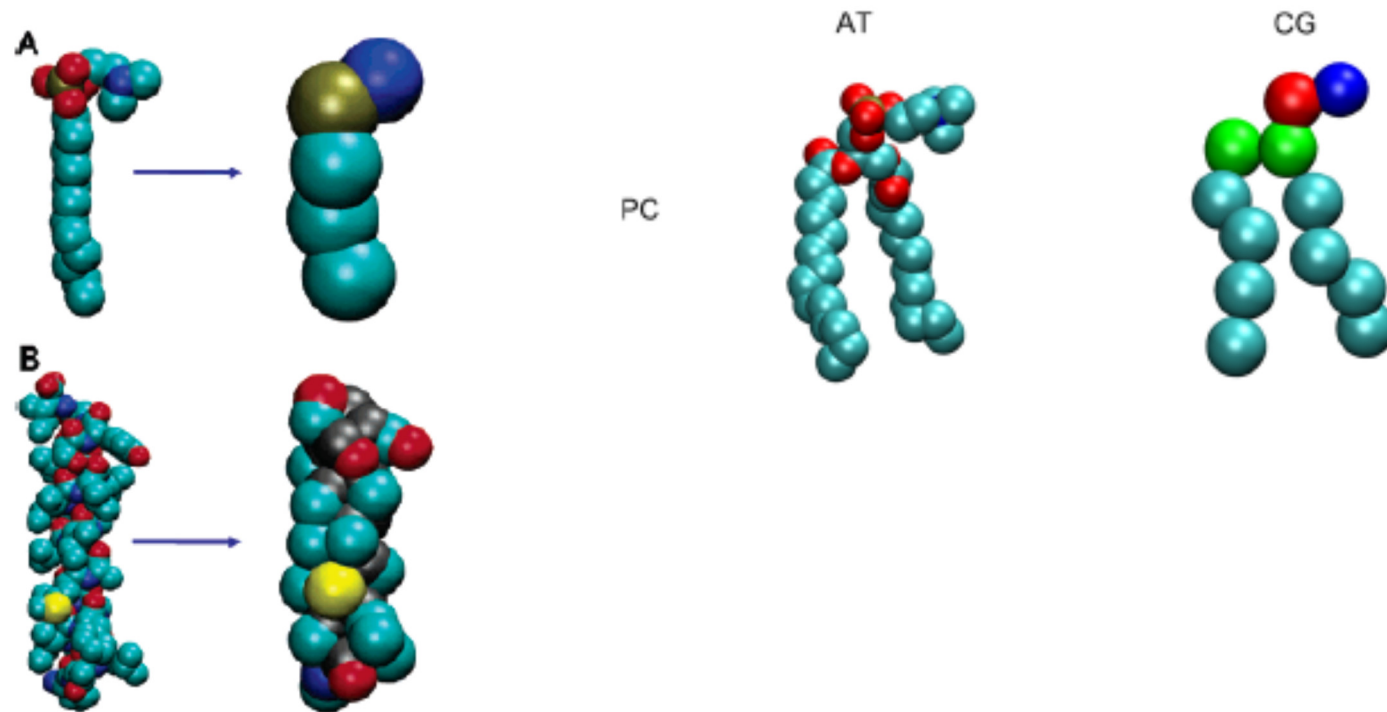
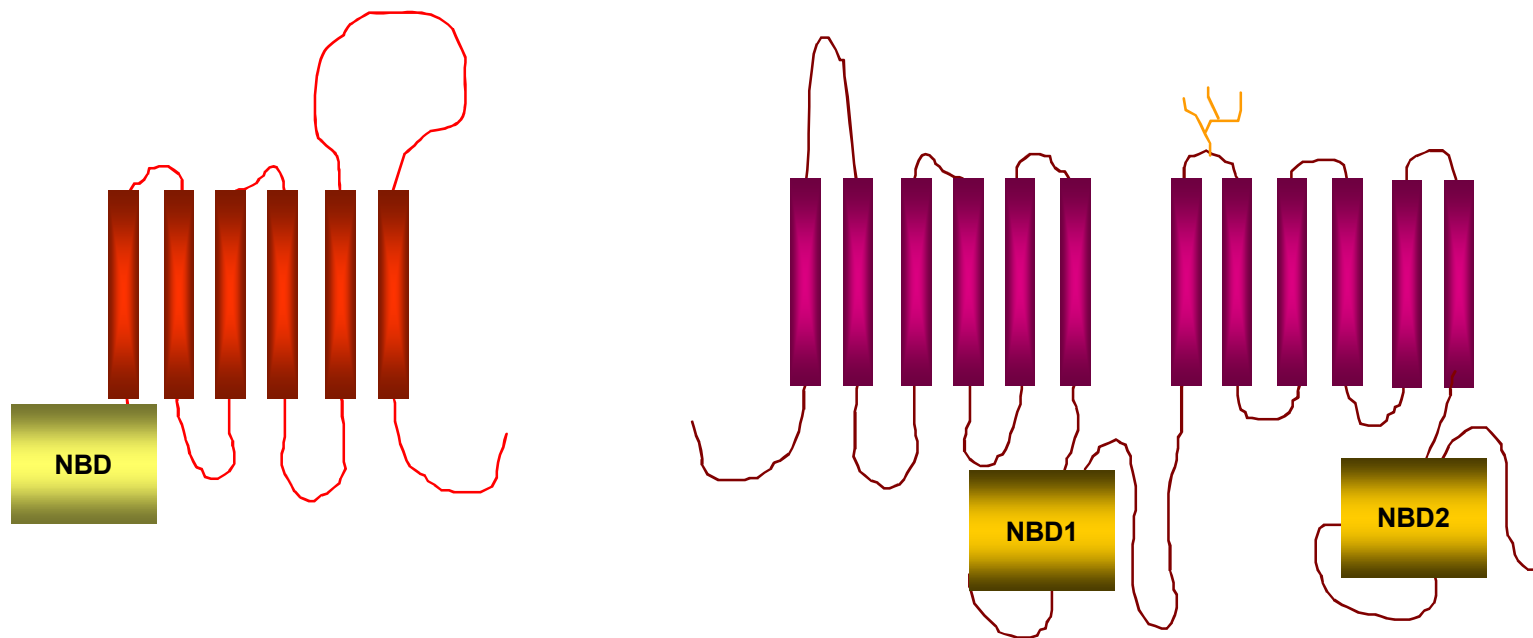


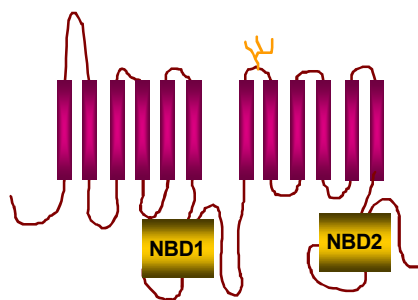
Figure 1. Atomistic (left-hand) and coarse-grained (right-hand) models compared for (A) a DPC molecule and (B) a GpA helix. Colors for atoms:

Sansom, Oxford University
Marrink, Groningen, MARTINI force field

ATP Binding Cassette (ABC) fehérjék

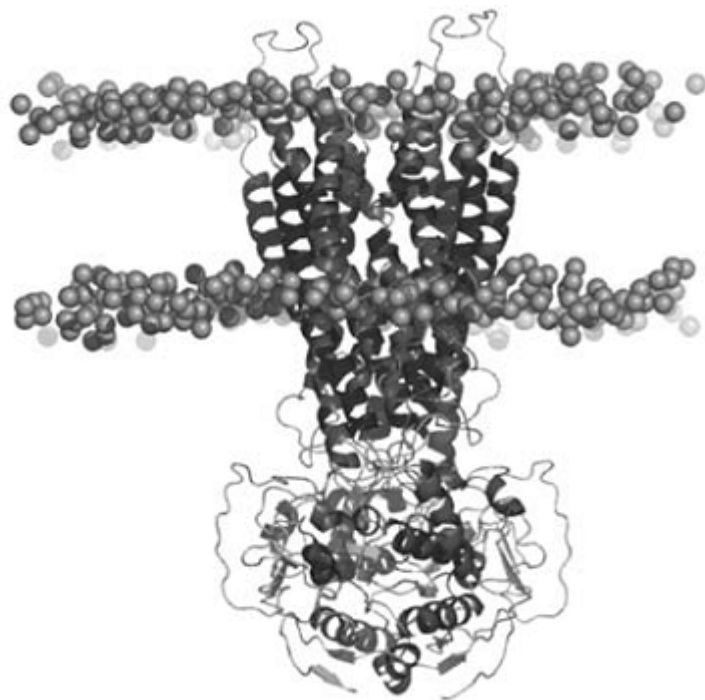


Fehérjék konformációinak stabilitása



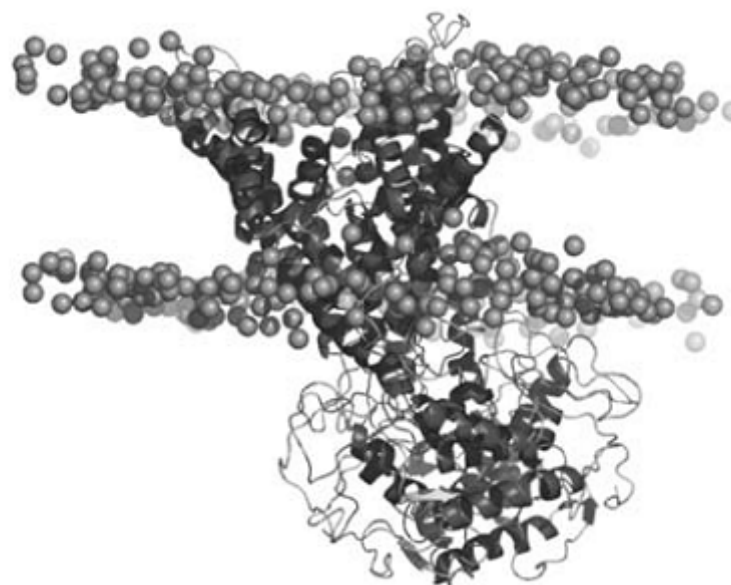
Eur Biophys J (2008) 37:403–409

B



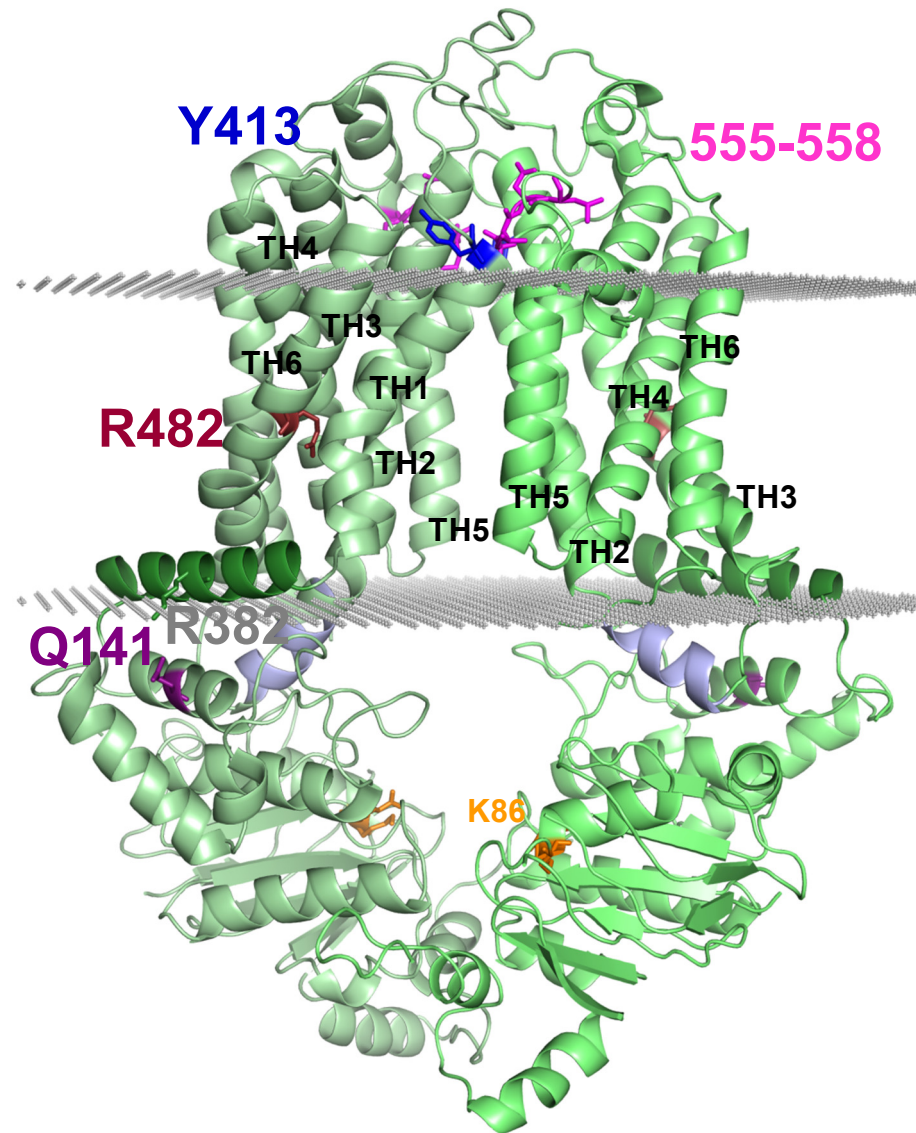
0 ns

C



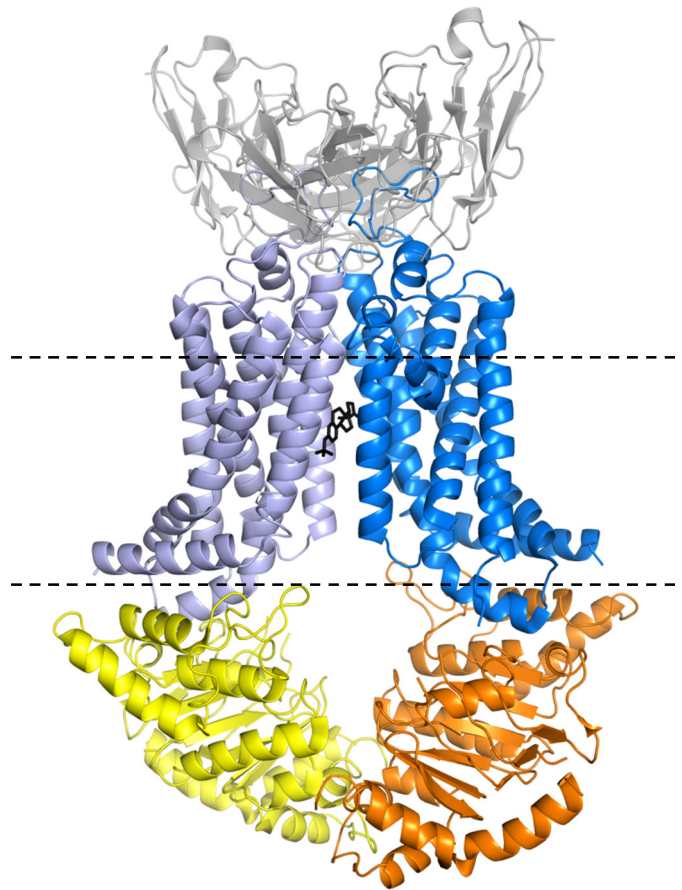
20 ns

Az ABCG2 modell

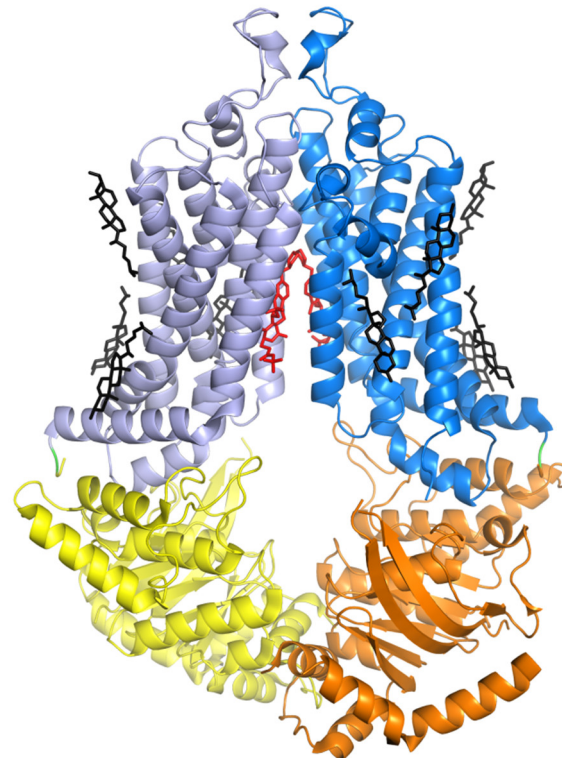


ABCG2 structures

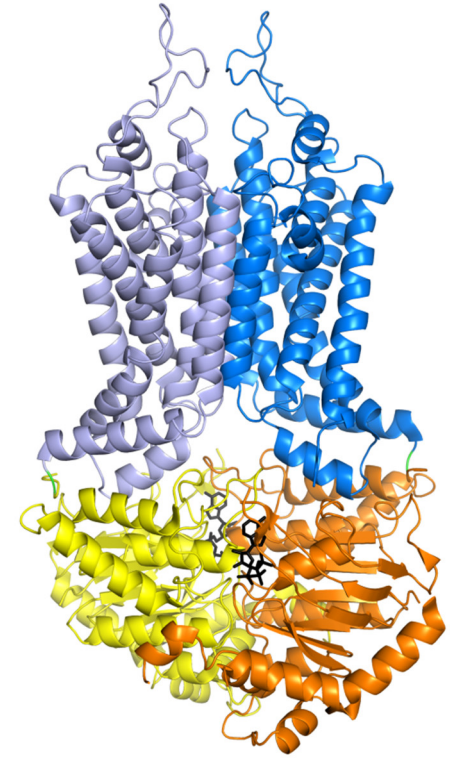
K. Locher, ETH, Zurich



6HCO

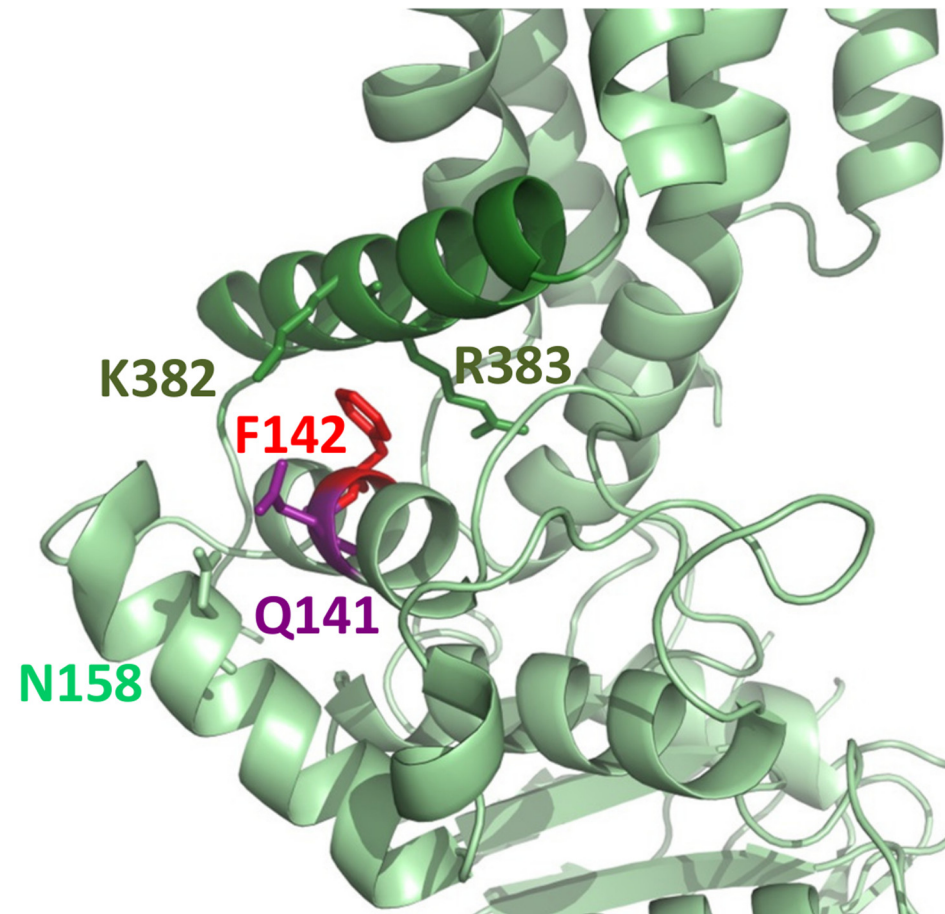


6HIJ



6HZM

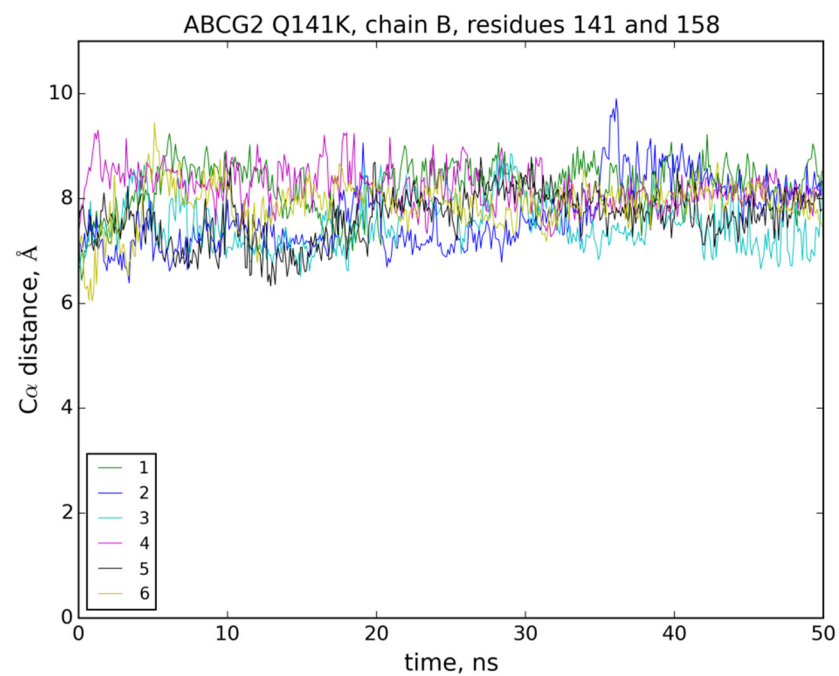
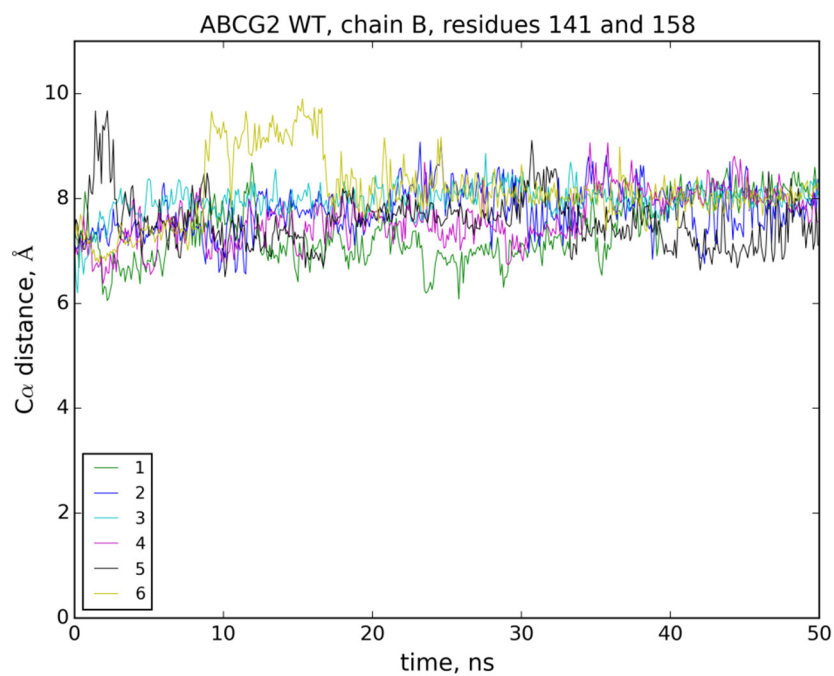
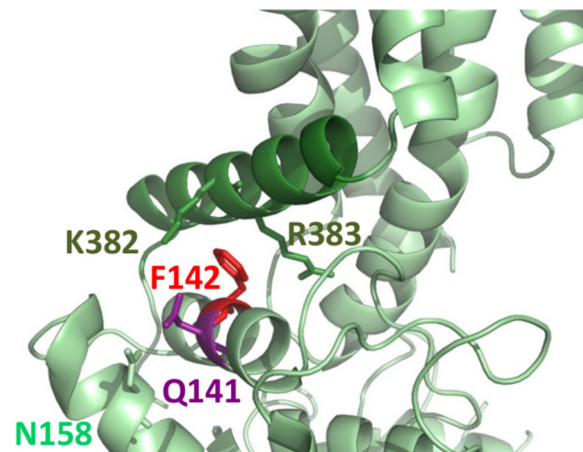
A Q141 helyzete



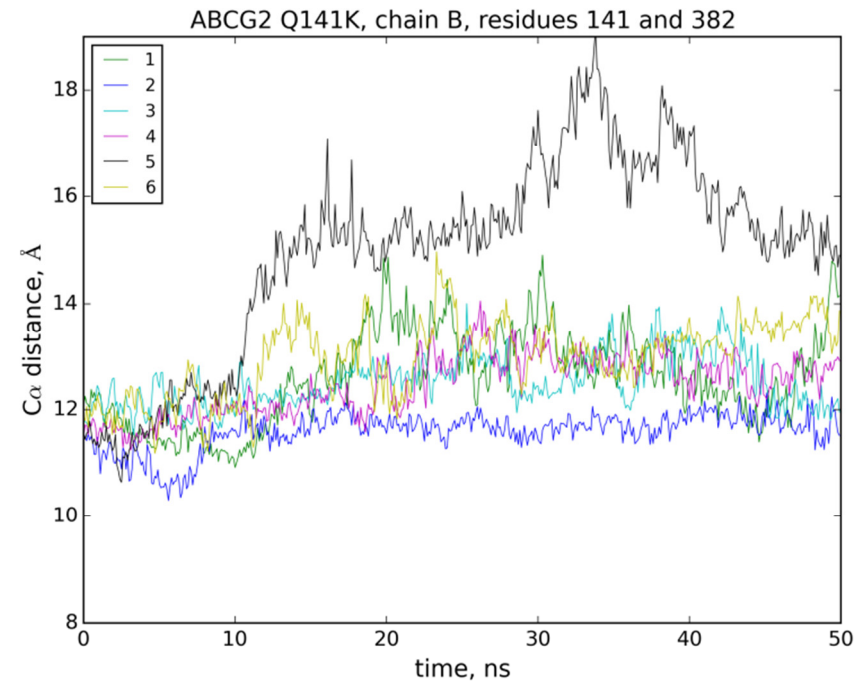
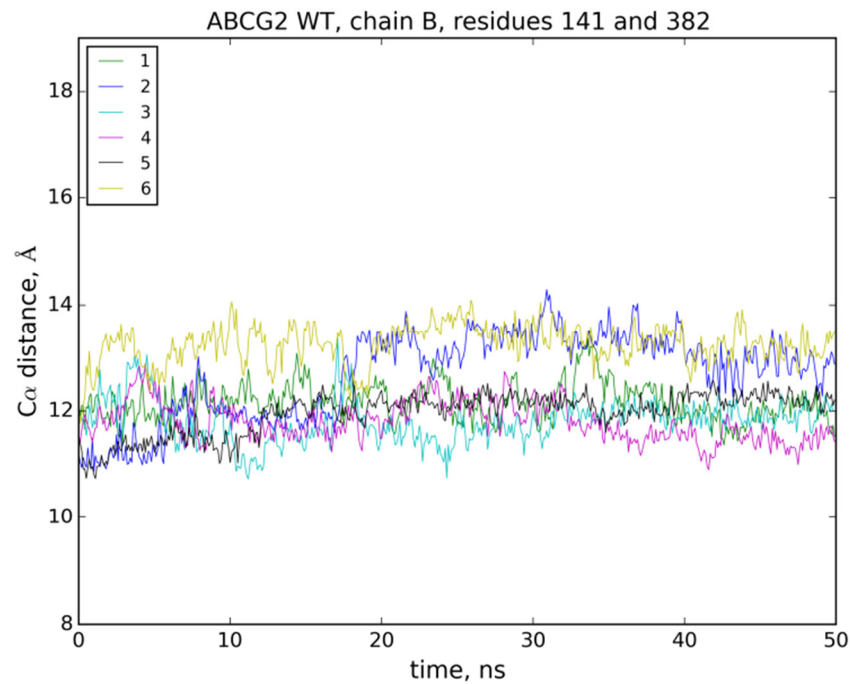
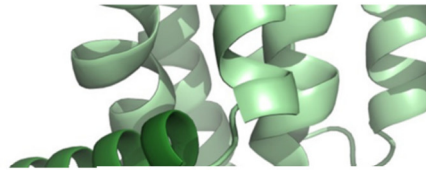
Molekula Dinamika (MD) szimulációk

- 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



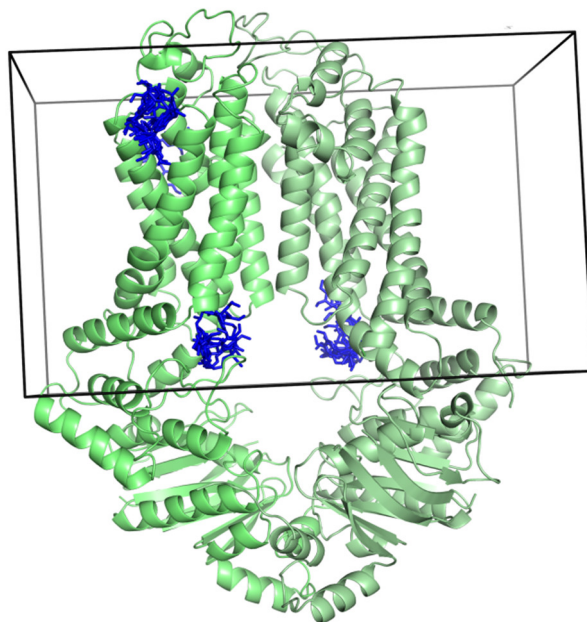
A Q141K hatása a 141/382 (NBD/TMD) kapcsolatra



Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

AutoDock Vina

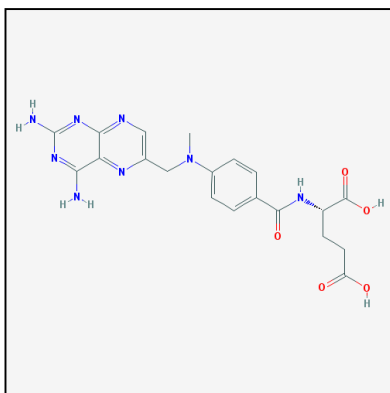
- Fix fehérje, flexibilis ligand
- Több konformáció (6 db, egyensúlyba hozott)
- Doboz; ligand odapróbálása nagyon sokszor (ebből 20/futás)



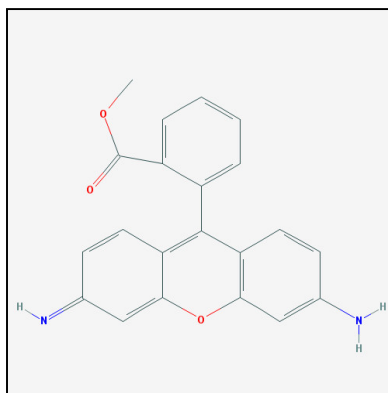
Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással AutoDock Vina

- 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

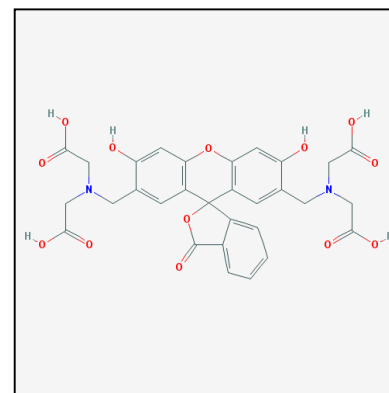
methotrexate



rhodamine123

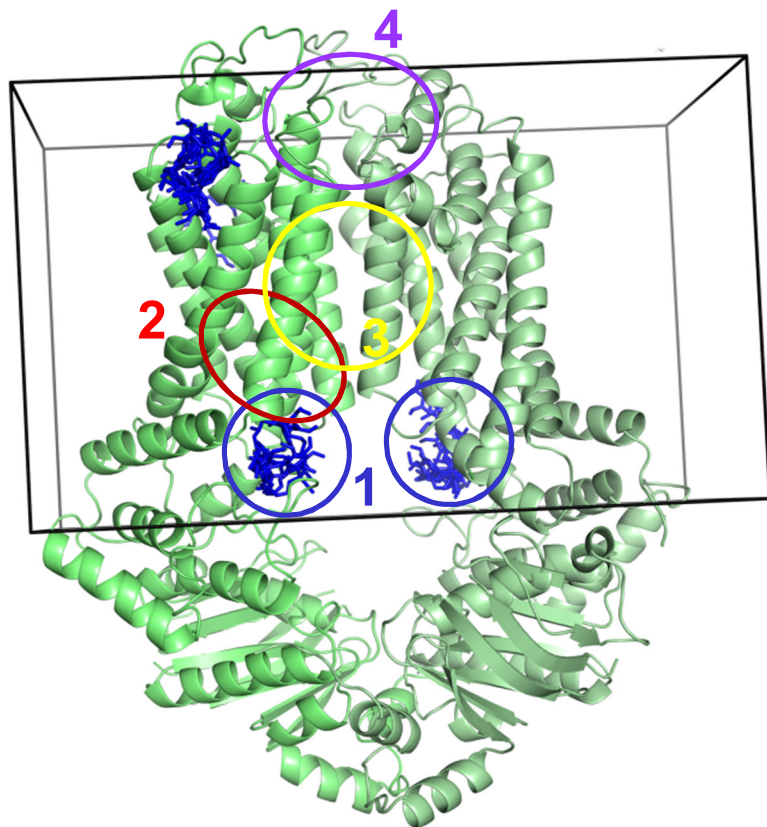


calcein

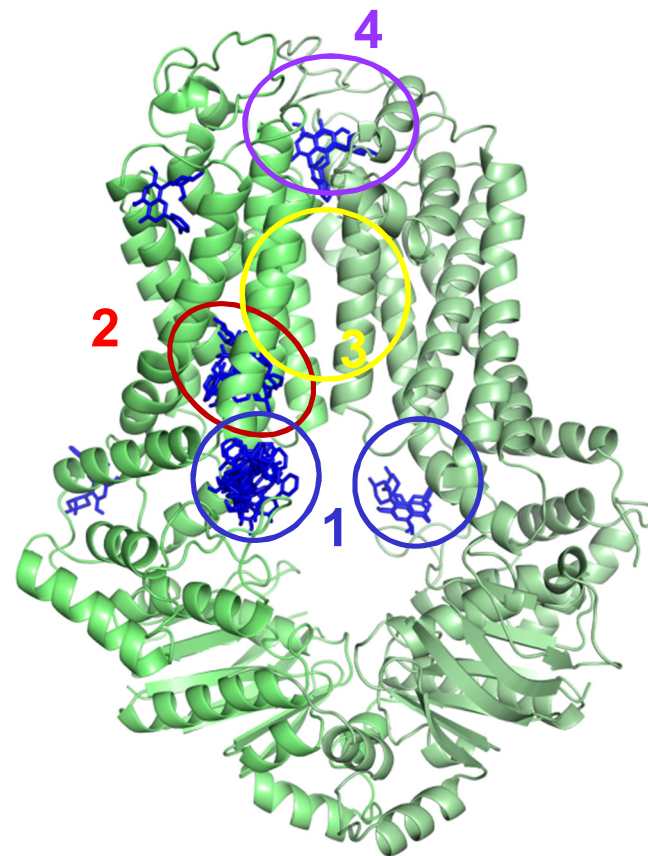


Drogkötő helyek vizsgálata *in silico* dokkolással

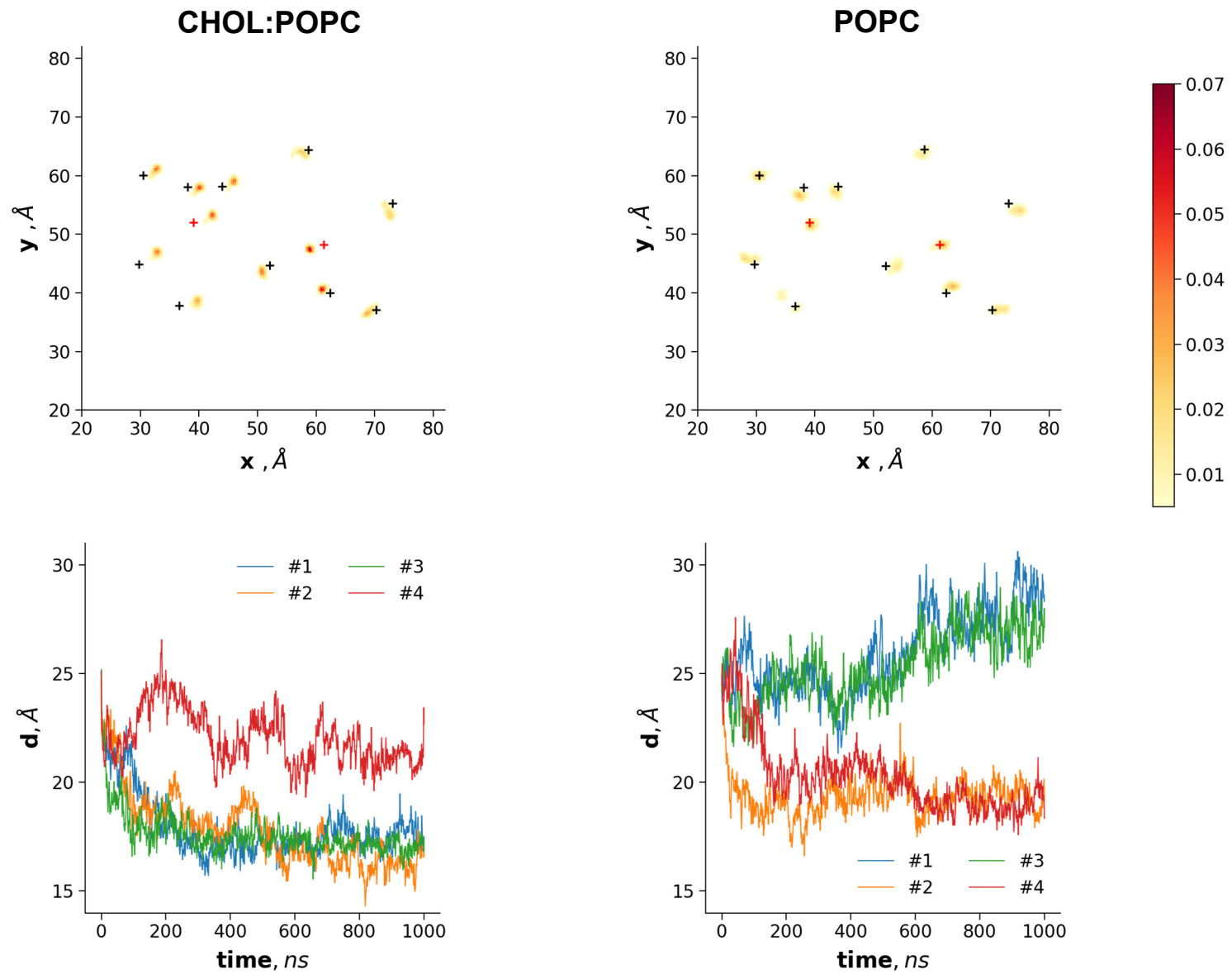
verapamil



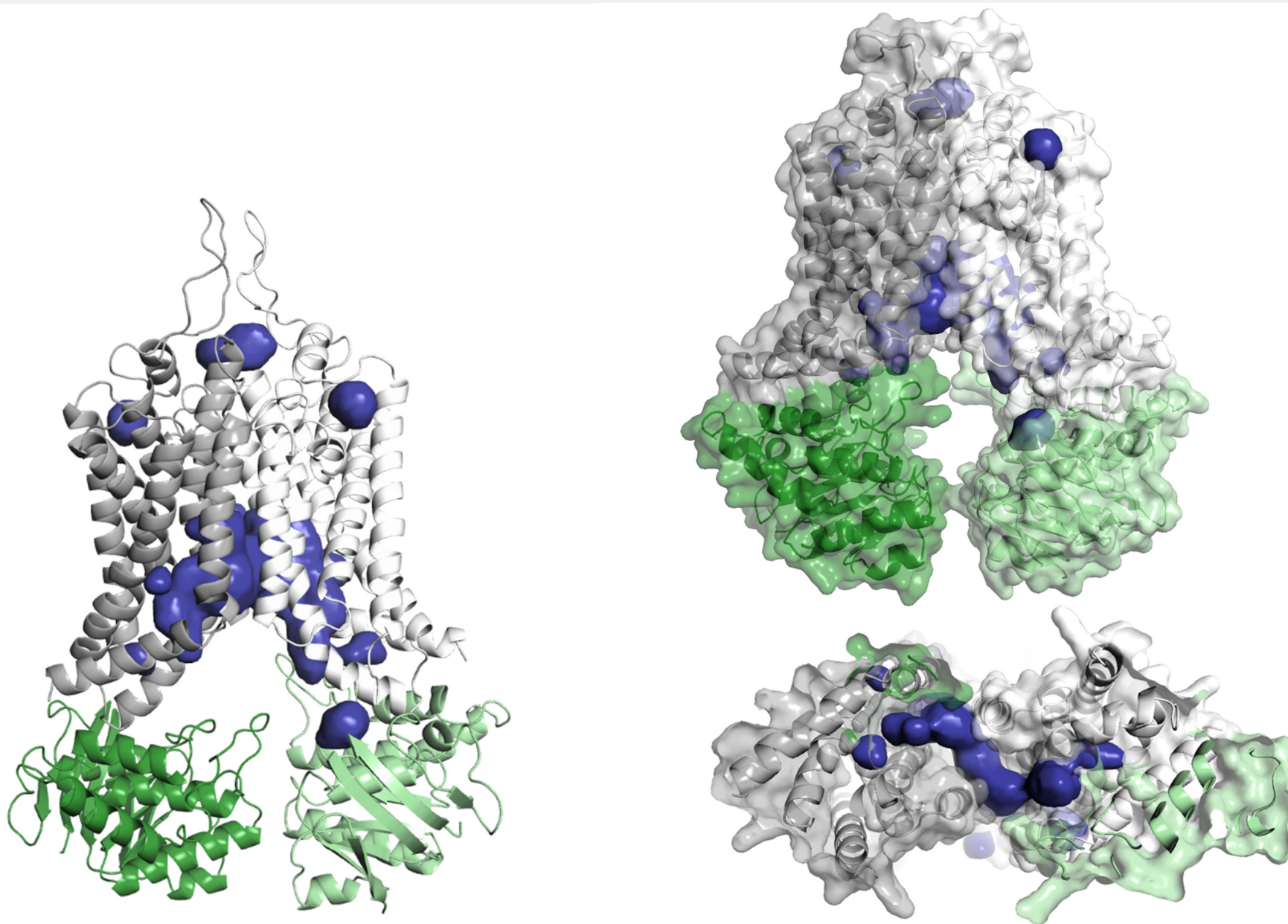
flavopiridol



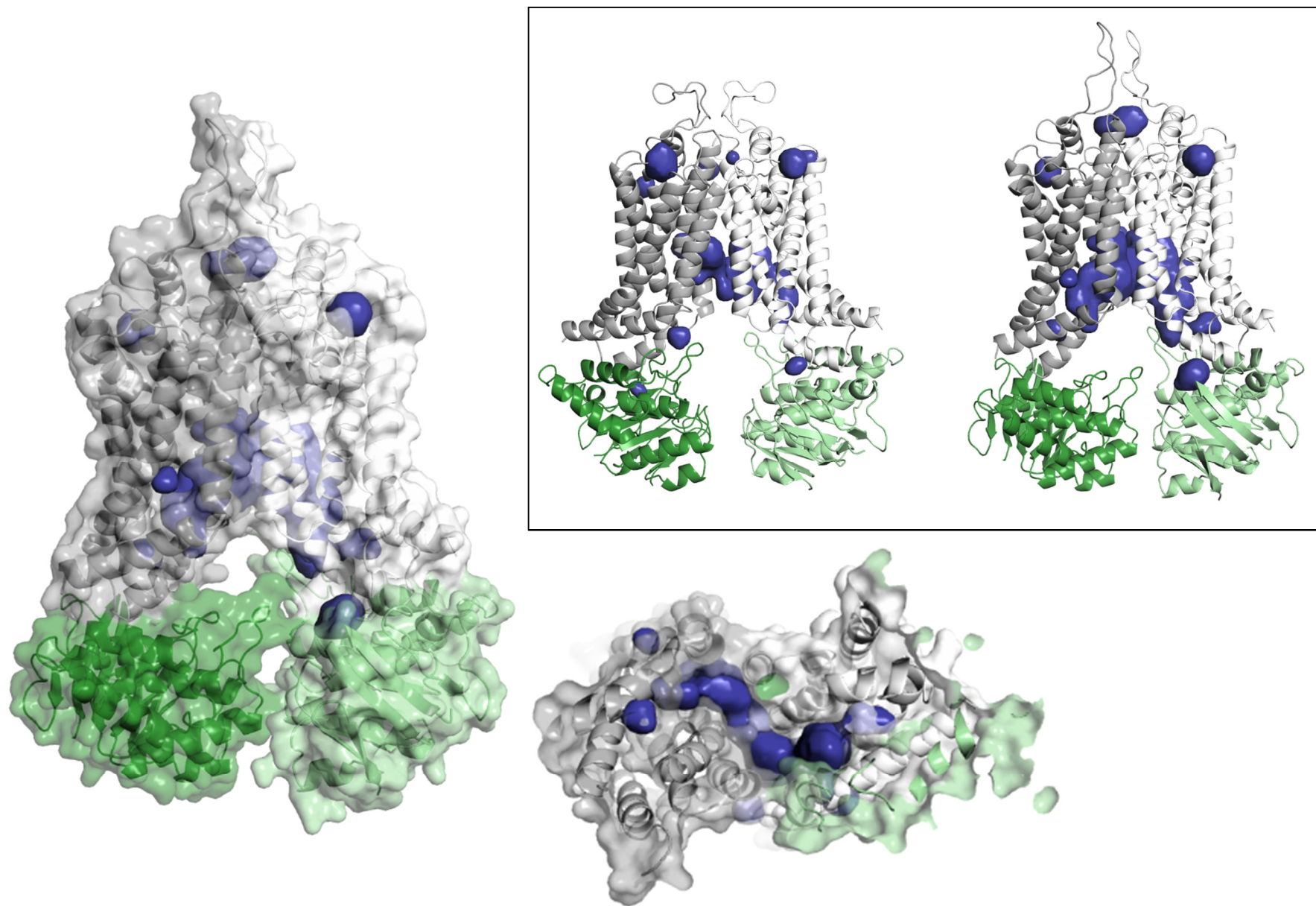
A koleszterin elősegíti a transzportot megelőző záródást



A drog-kötő zsebek dinamikus változása

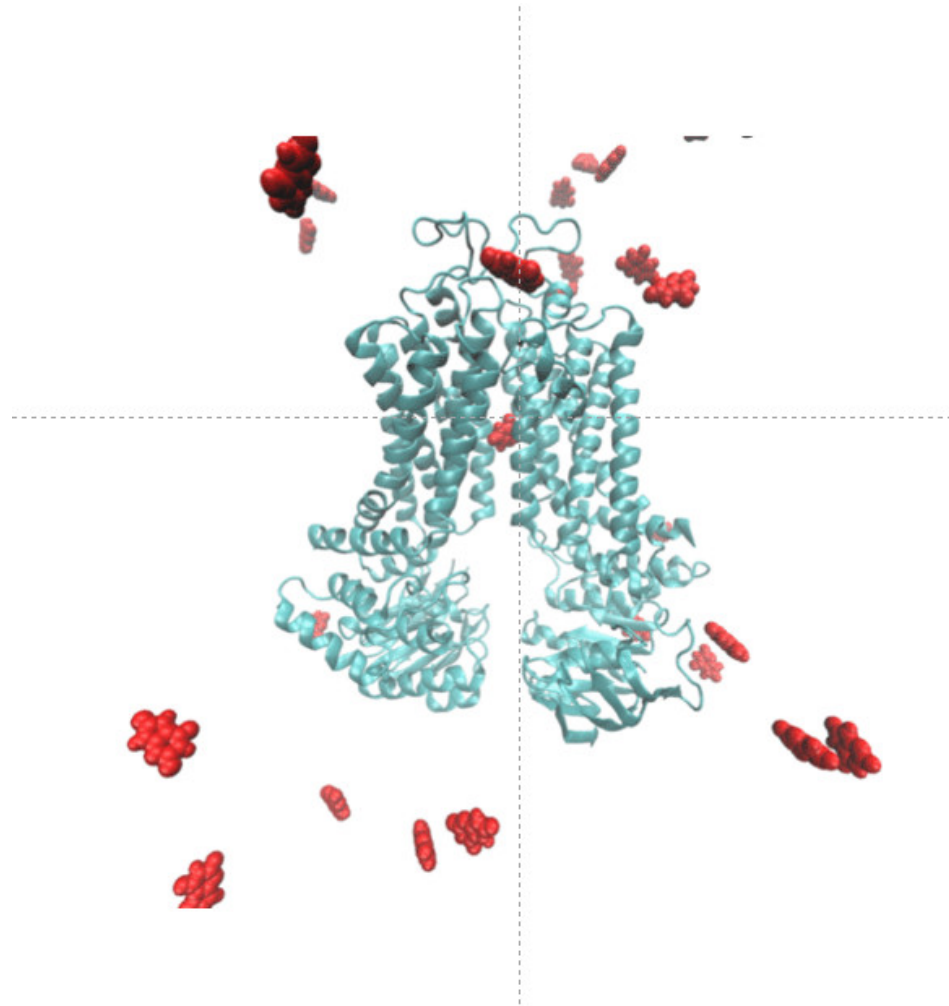


A drog-kötő zsebek dinamikus változása

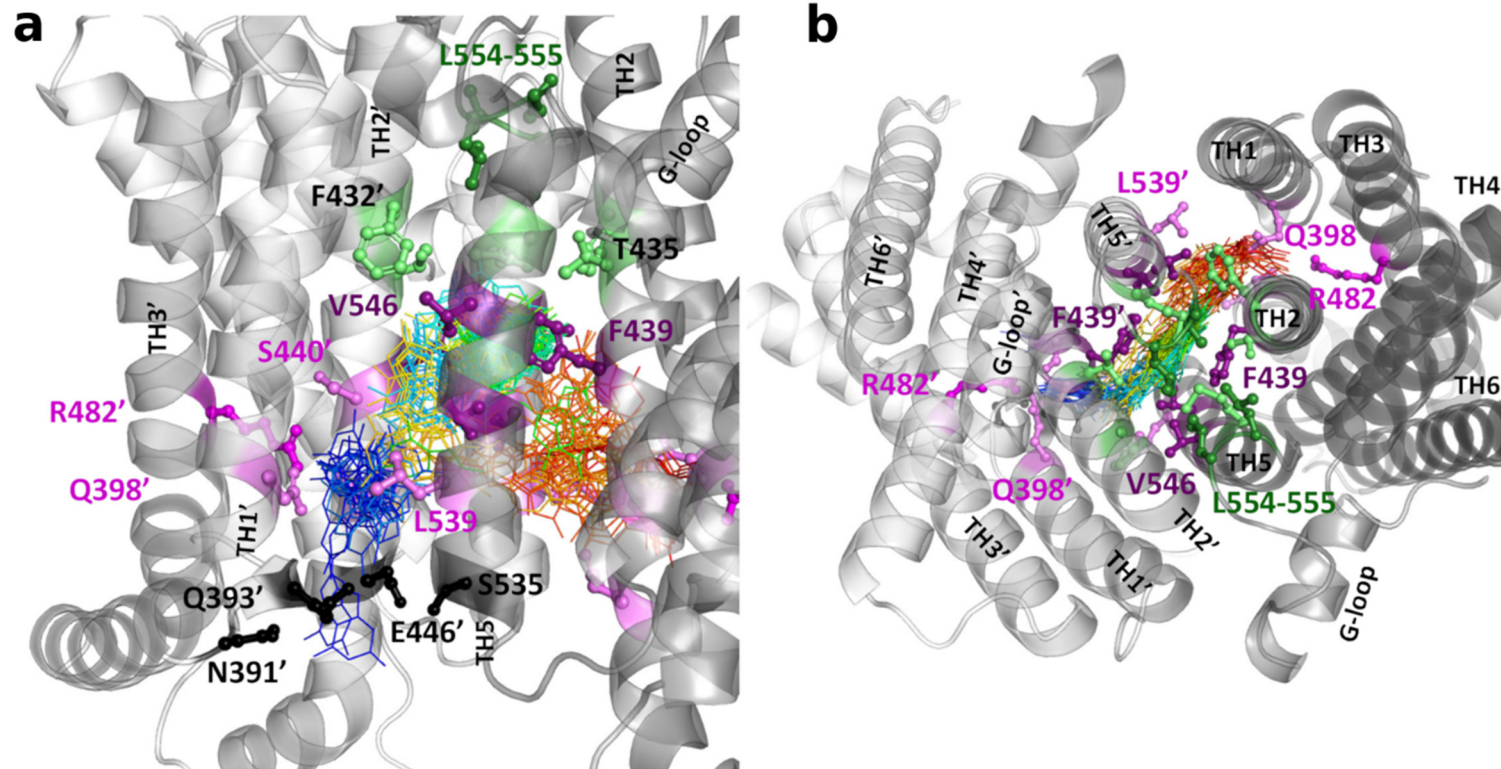


Describing the transport using MD

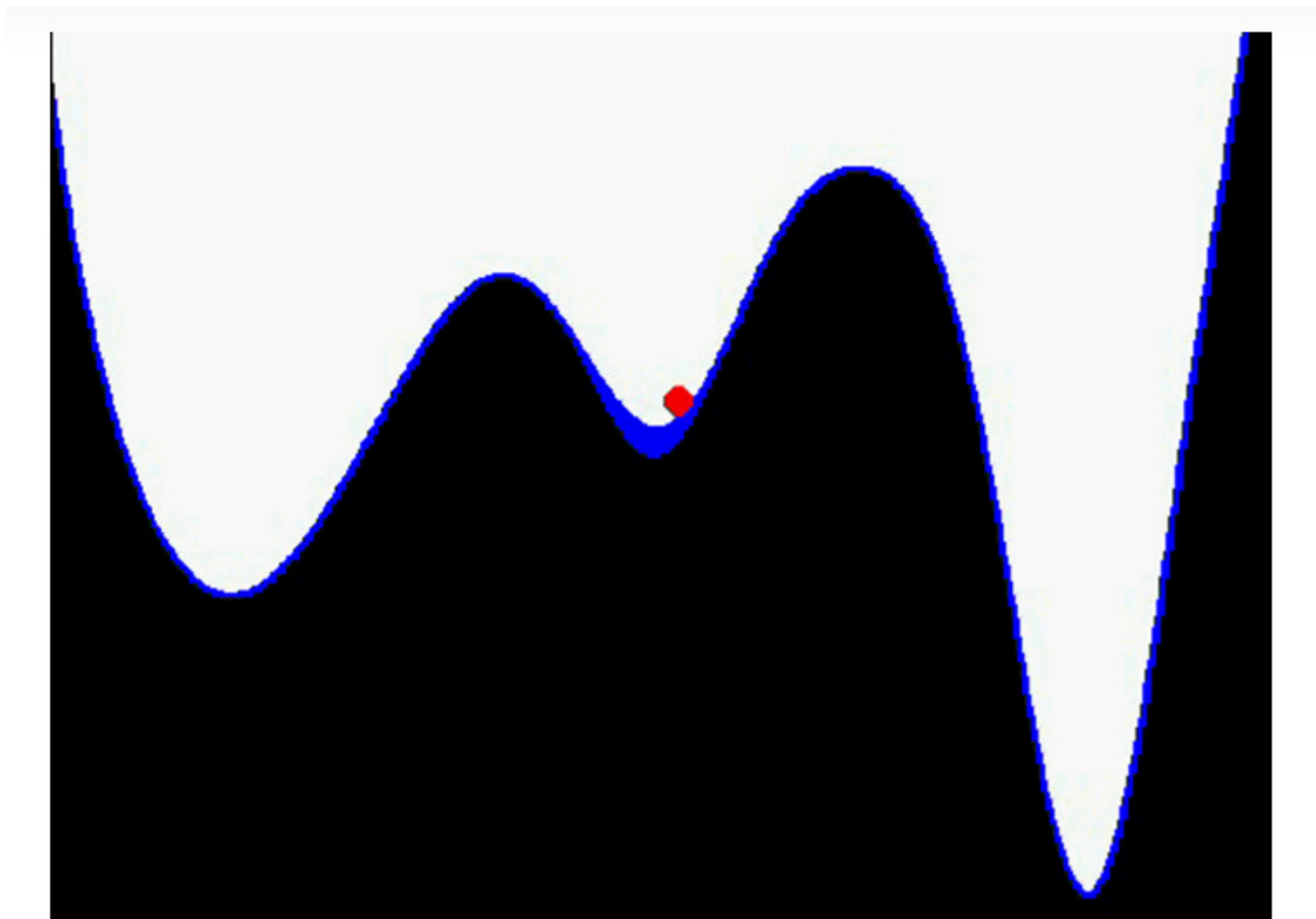
equilibrium simulations, uric acid molecules



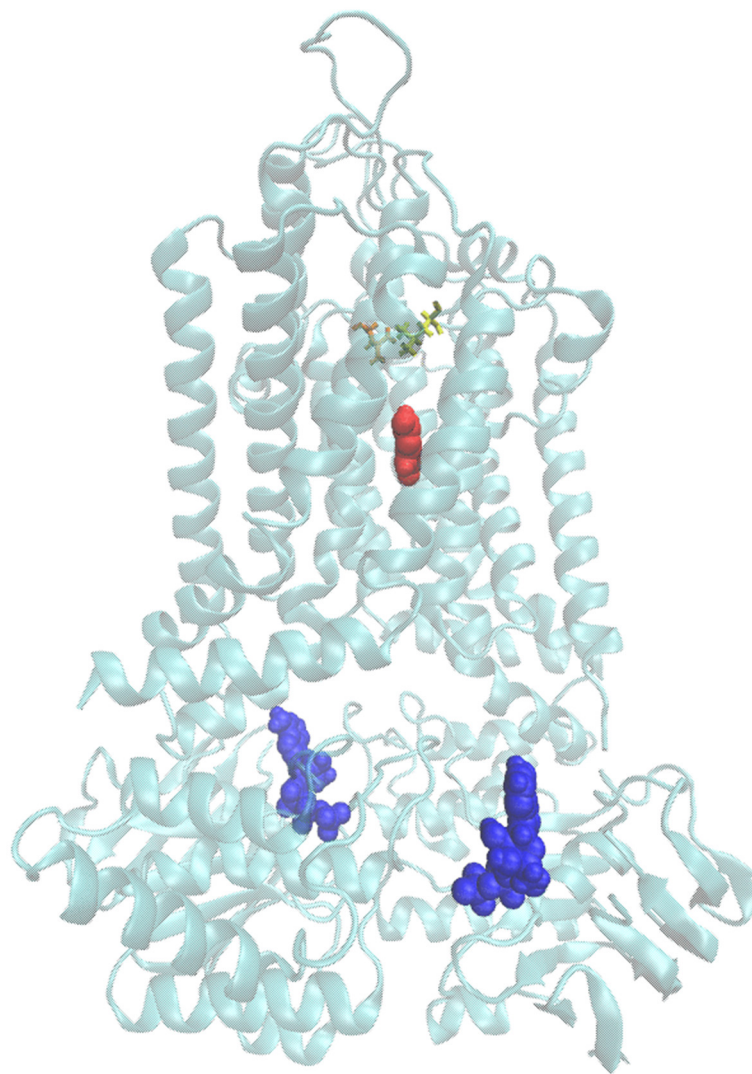
A transzport leírása egyensúlyi szimulációkkal



A „exit” jellemzése metadinamikával

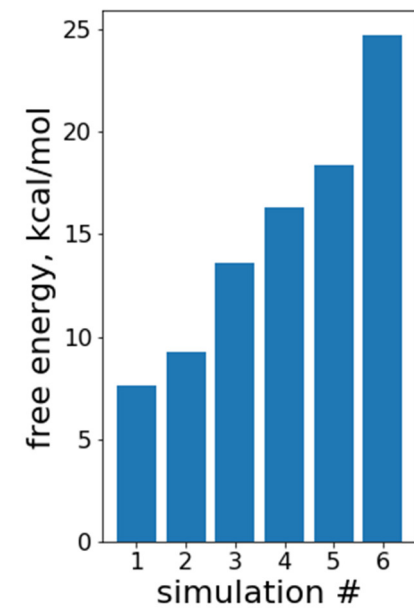
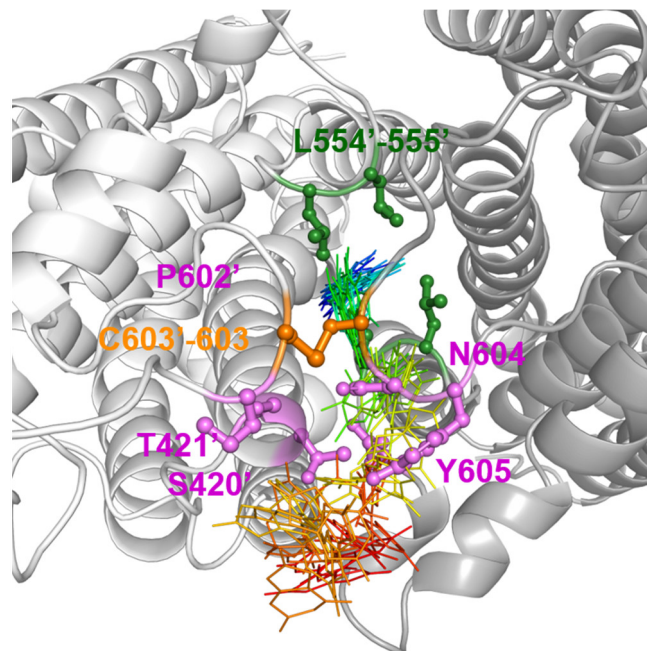
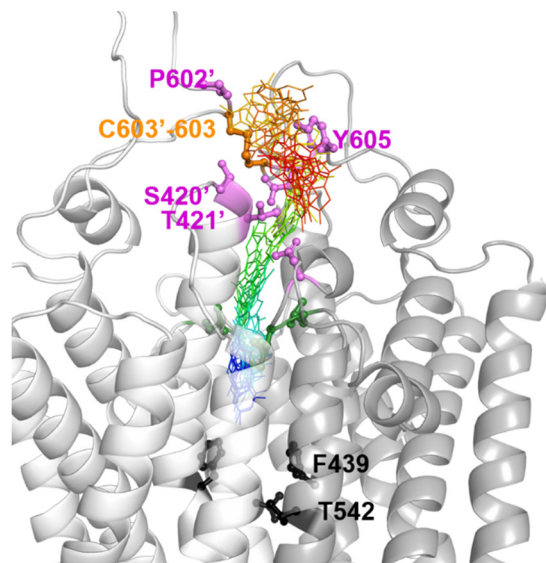


A „exit” jellemzése metadinamikával



A 3D ribbon diagram of a protein structure, likely a dimeric enzyme or transporter, shown in light blue. The protein is composed of several alpha-helices and beta-sheets. Two specific regions are highlighted: a red cylindrical shape located in the central cavity of the protein, and two blue cylindrical shapes located at the bottom of the structure, one on each side. These highlighted regions likely represent the binding site or the exit pathway of a substrate, as indicated by the title.

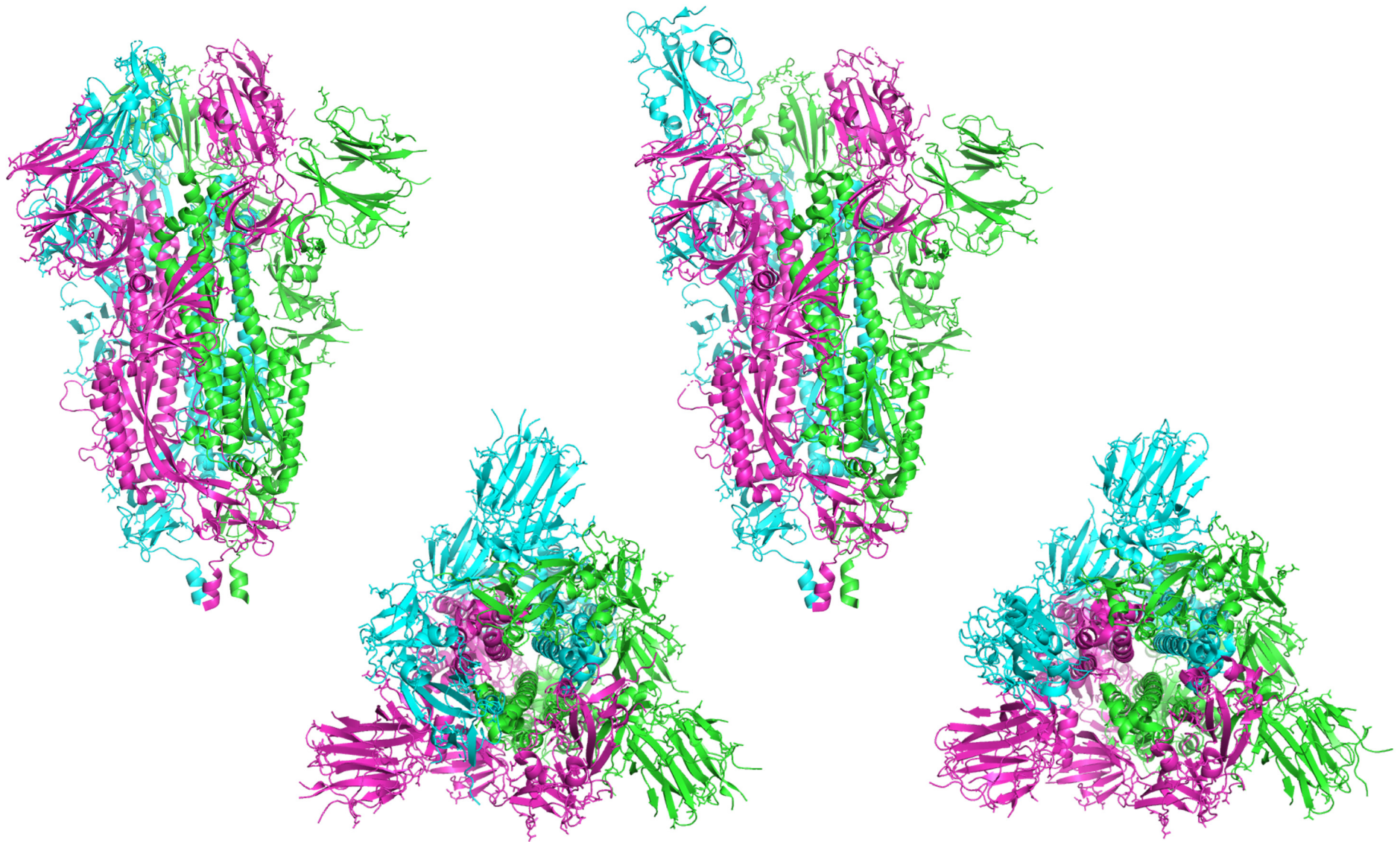
A „exit” jellemzése metadinamikával



SARS-CoV-2

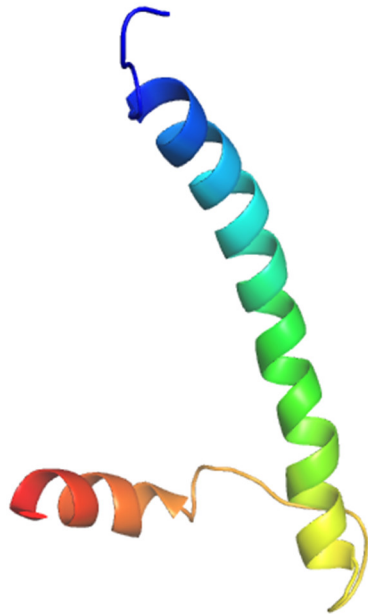
- **SARS-Cov** sok adat, szekvenciális és szerkezeti hasonlóság, homológia (modellezés)
- **Nagy erőforrás ráfordítás** már most rengeteg (szerkezeti) adat
- **Kezelési megközelítések:**
 - passzív immunizálás
 - immunizálás
(állatok immunizálása tesztrendszerek fejlesztéséhez)
 - gyógyszerfejlesztés

SARS-CoV-2, Spike fehérje



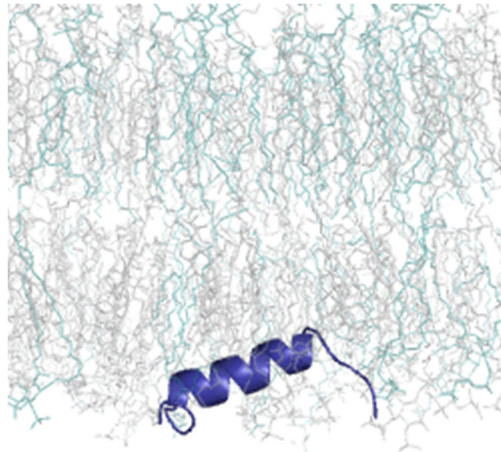
SARS CoV-2, E protein

E protein



MemMoRFs

Membrane Molecular Recognition Features, <https://memmorf.hegelab.org>



Összefoglalás

➤ Fehérje dinamika

1. Szerkezet
2. Szolvatálás
3. Energiaminimalizálás
4. Egyensúlyba hozás
5. *Production run*

➤ Számításos módszerek igen fontosak

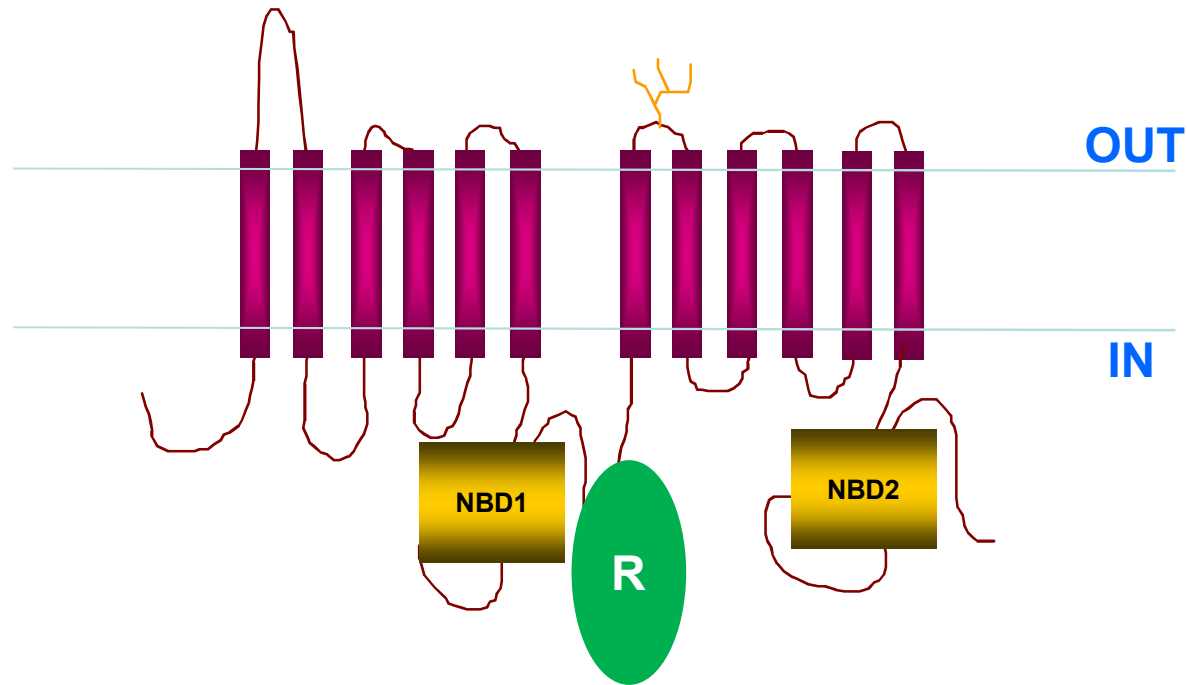
➤ Fehérjék működésének és mutációk hatásának megismerése

➤ Gyógyszertervezés

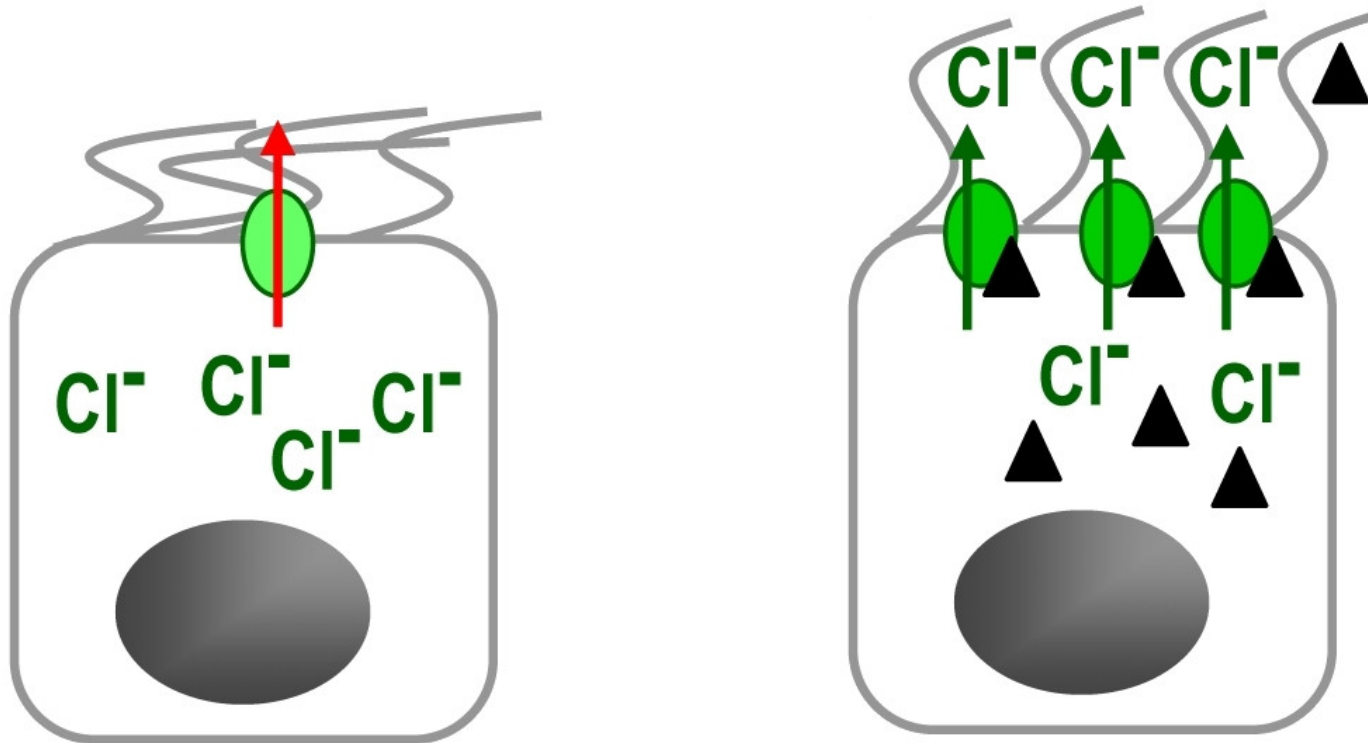
www.hegelab.org
hegedus.tamas@hegelab.org

ABCC7/CFTR

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

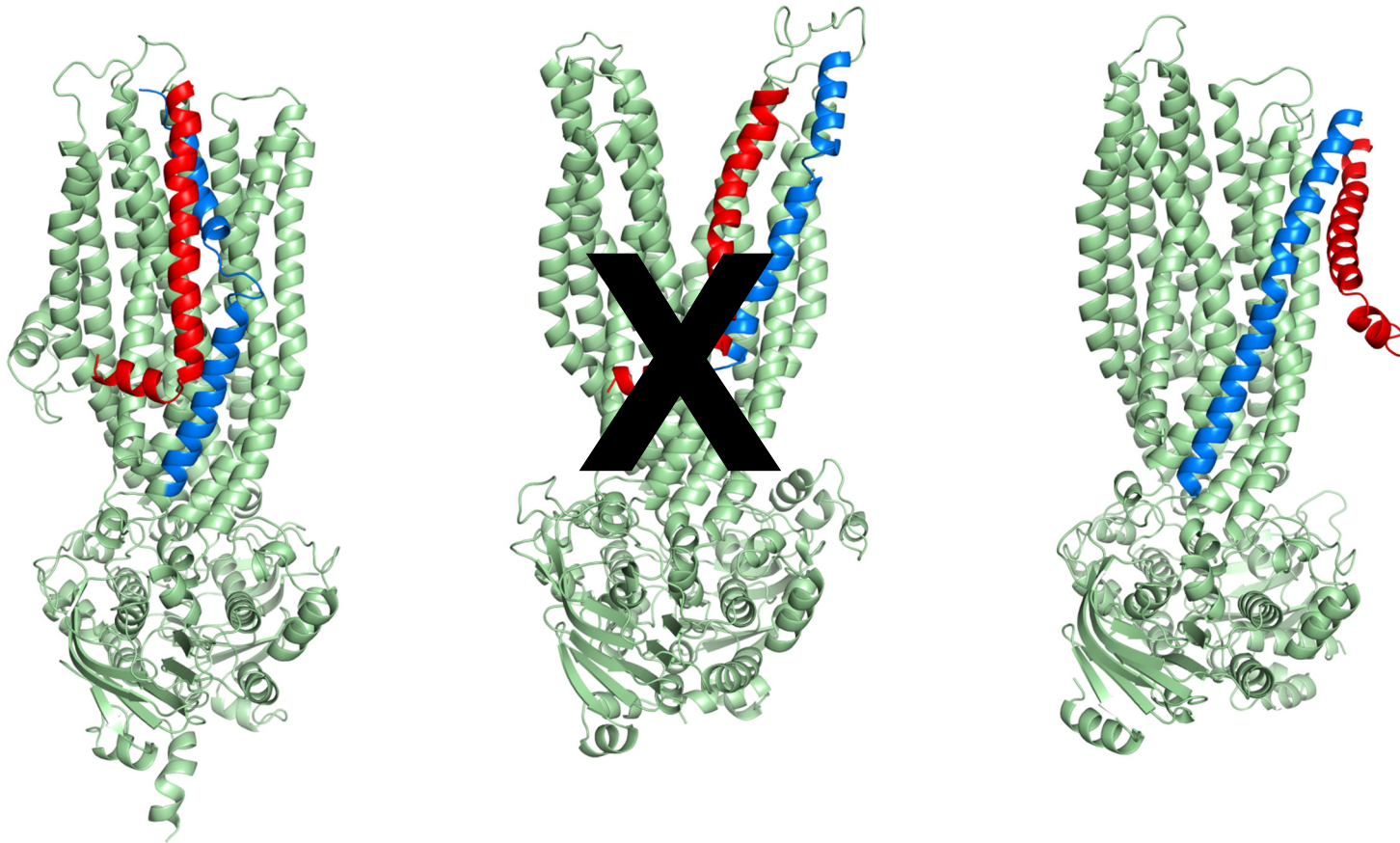


Cisztás fibrózis (CF)



Full-length, ATP-bound CFTR structures

Cryo-EM revolution

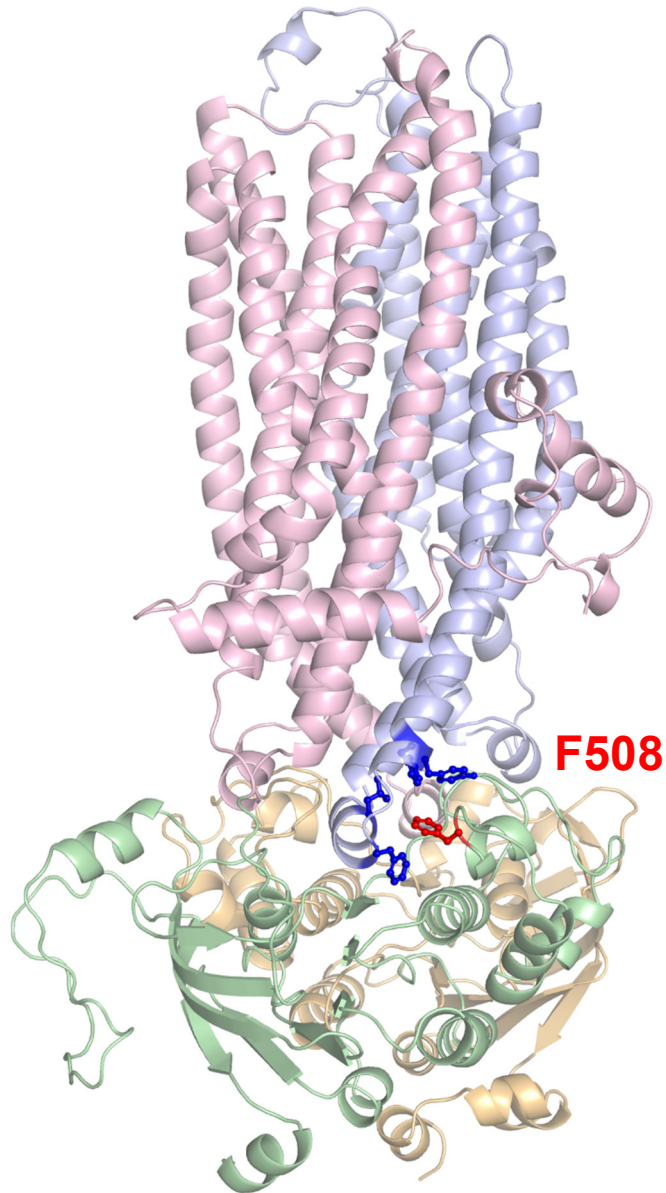


Zhang et al. (2017) Cell 170: 483-491.e8
PDBID:5W81

Bob Ford
University of Manchester, UK

J. Fay, Jack Riordan
UNC, Chapel Hill, USA

Δ F508 mutation



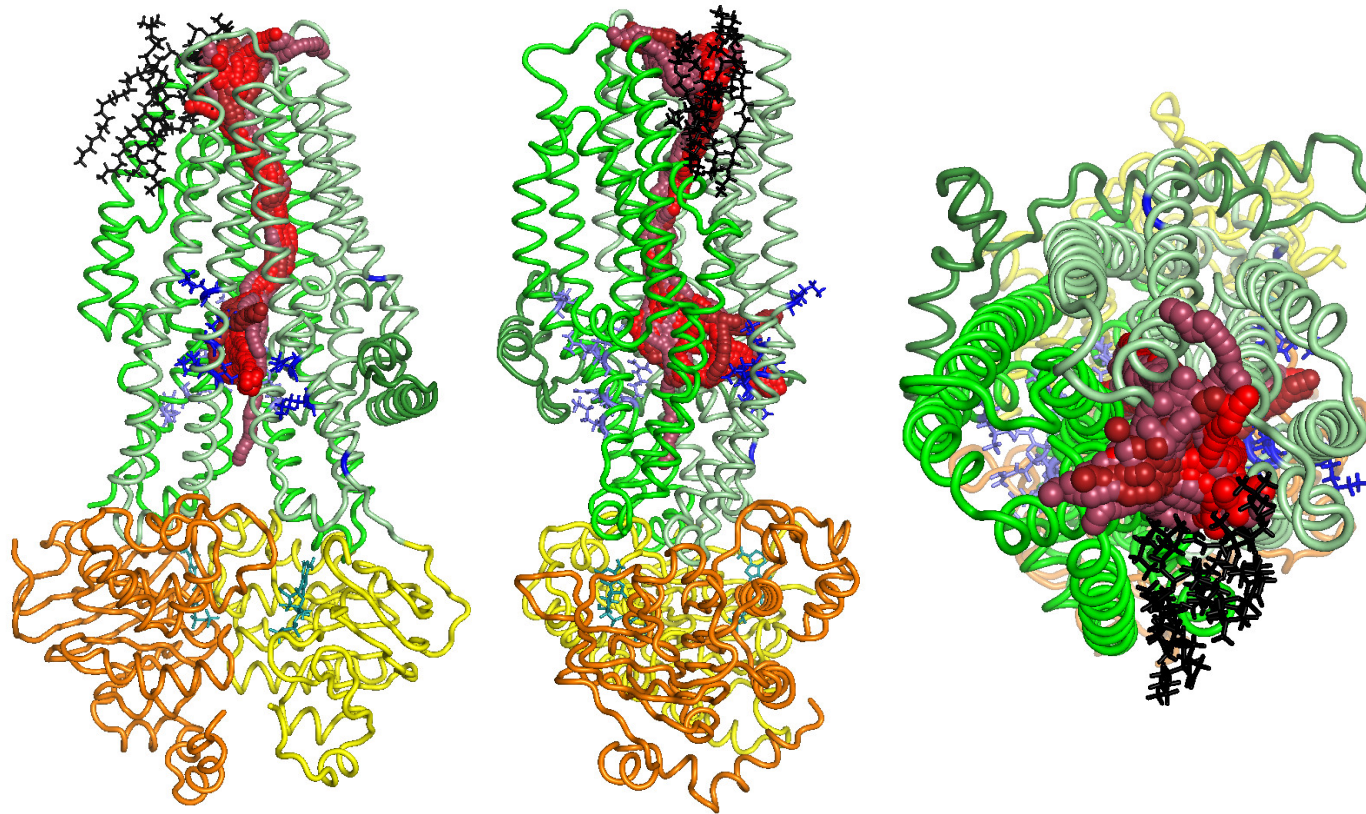
Many experimental and
computational studies

Domain folding
Domain stability
Domain-domain assembly

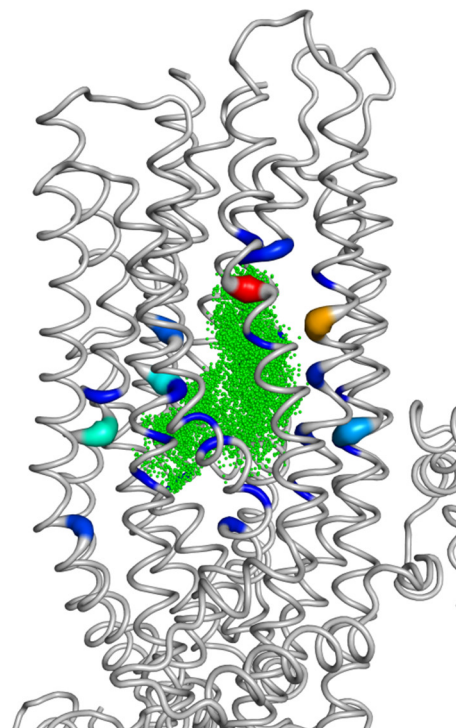
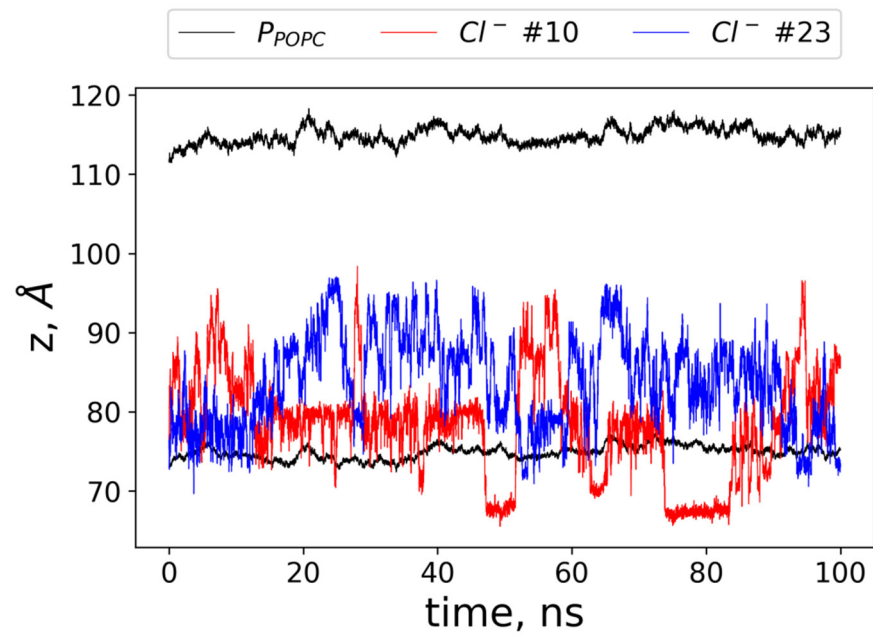
Transmission of the consequence of
a mutation; allosteric propagation of
alterations in dynamics

Identification of the chloride permeation pathway

Farkas *et al.* Cell Mol Life Sci. 2019 Jul 20. doi: 10.1007/s00018-019-03211-4



Ion movements in the channel



Characterizing the permeation by metadynamics

