

# **MEMMORF, MEMBLOB ÉS KONFTOR: MEMBRÁNFEHÉRJÉK SZÁMÍTÁSOS VIZSGÁLATA**

Doktori értekezés tézisei

**Gáspárné Csizmadia Georgina**

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hegedűs Tamás, D.Sc, kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Turu Gábor, Ph.D, egyetemi docens

Dr. Gáspári Zoltán, Ph.D, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, D.Sc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Kovács Mihály, D.Sc, egyetemi tanár

Dr. Cervenák László, Ph.D, tudományos tanácsadó

Budapest

2024

## **1. BEVEZETÉS**

Dolgozatom három projektet ölel fel, melyeket a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) vizsgálata köré szerveződnek. A CFTR az ABC (ATP-binding cassette) fehérje szupercsalád egyetlen ioncsatornaként működő tagja. Egyedülállósága ellenére szerkezete besorolható a Pgp-szerű (permeability glycoprotein) ABC exporterek csoportjába.

### **I. projekt**

Az ABC fehérjék közé tartozó Pgp-szerű exporterek két transzmembrán doménnel (TMD) rendelkeznek, melyek a két intracelluláris doménben (ICD) folytatódnak. Ezek kapcsolatban állnak a két nukleotid-kötő doménnel (NBD). Utóbbi két ATP molekula kötésével dimerizálódik, ami az ICD-ken keresztül a TMD-k átrendeződéséhez, és így a transzportfolyamat megvalósulásához vezet. A transzportfolyamat során az ABC fehérjék különböző karakterisztikus konformációkba rendeződnek. Ezen konformációk elkülönítése és strukturális elemzése nélkülözhetetlen a fehérjék működésének megértéséhez.

### **II. projekt**

Az előző projekt során több krio-elektronmikroszkópiával (krio-EM) megoldott szerkezetet is analizáltunk. A szerkezetmegoldás során egy 3D Coulumb potenciál térképet (krio-EM térképet) készítenek. Ezek a térképek gyakran tartalmaznak a fehérjeszerkezetre jellemző sűrűségeken kívül egyéb használható információt is, például ligandumok sűrűségeit. Membránfehérjék esetében a térkép tartalmazza a szerkezetmegoldás során használt lipidkörnyezetet is. Ez azért fontos, mert az, hogy a lipidkörnyezet hol helyezkedik el a fehérjeszerkezeten, kísérletes adatot szolgáltat a fehérje membránba illeszkedéséről. A membránfehérjék vizsgálatához nélkülözhetetlen a transzmembrán régiók ismerete, ugyanakkor erről általában csak predikciók elérhetőek.

### **III. projekt**

A CFTR működéshez nélkülözhetetlen rendezetlen regulátor régiójának vizsgálata (IDR, intrinsically disordered region) vezetett a membránfehérjék IDR-jeinek szélesebb körű tanulmányozásához. A membránfehérjék 41%-a tartalmaz legalább egy hosszabb IDR-t. Az IDR-ek nem rendelkeznek jól definiált szerkezettel, ezért szerkezeti sokaságként szoktuk őket leírni. Egy IDR több különböző partnerhez is képes specifikusan

és reverzibilisen kötődni, emiatt sokféle fiziológias folyamatban játszanak szerepet. Az IDR a fehérje partnerhez egy rövidebb motívumon (Molecular Recognition Feature, MoRF) keresztül kötődik és ez a kötődés során gyakran rendezetté válik. Az IDR-ek ugyanakkor biológiai membránokhoz is képesek kötődni. A membrán fizikokémiai tulajdonságai szintén hatással vannak az IDR-ek konformációs állapotára. Azokat a régiókat, melyek a membránhoz kötődés során rendeződnek, MemMoRF-nak neveztük el.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A Pgp-szerű ABC exporter szerkezetek konformációs állapotai közötti különbségek leírása
  - a. olyan konformációs vektorokkal (konftorok), melyek a szerkezetek funkcionálisan releváns részeit írják le,
  - b. membrán szolvatációs energia számolásával.
2. Olyan módszer/fejlesztése, mely a krio-EM térképekben található Coulomb potenciál értékekből számol transzmembrán régiókat (MemBlob).
3. A MemMoRF-okkal kapcsolatos információk adatbázisba rendezése.

### 3. MÓDSZEREK

#### **Konforok és elektrosztatikai számolások**

A Pgp-szerű ABC fehérjék listáját az UniProt adatbázisból gyűjtöttük, a szerkezeti fájlokat pedig az OPM vagy az RCSB adatbázisokból töltöttem le. Utóbbi esetben a PPM szerverrel azonosítottam a TM régiókat. Az egyéb fontos régiókat és a konformációs állapotokat a PyMOL program vizualizációt és kvantifikálást segítő függvényeinek használatával határoztam meg. A konforokat a python numpy és MDAnalysis csomagjaival számoltam.

#### Membrán prediktorok összehasonlítása

Az OPM, PDBTM és MEMPROTMD prediktorokkal kapott eredményeket hasonlítottam össze a következő szempontok alapján: a z tengely mentén jósolt membránpozíció, illetve a fehérje dőlésszöge a membránban. Előbbi esetben a TM hélixek geometriai középpontja volt a viszonyítási alap, a fehérje dőlésszögét pedig a membrán normál vektora és a 4-5 és 10-11-es TM hélixek felezővonala közötti szög adta meg.

#### Elektrosztatikai számolások

A szerkezetek előkészítésére a VMD és PDB2PQR programokat használtam. A szerkezetek felületi elektrosztatikai számítását az APBS, a membránba merülés elektrosztatikáját az APBSmem programokkal számoltam.

### Vizualizáció

A 3D szerkezetek és felületi elektrosztatikájuk vizualizációjára a PyMOL-t és annak APBS Electrostatics pluginját használtam. A konftorok ábrázolásához a Python Matplotlib csomagját használtam.

### **MemBlob**

A szerkezeteket az RCSB-ből, a sűrűség térképeket az EMDB-ből töltöttem le. A transzmembrán régiók predikciójára a TMDET-et használtam.

### MemBlob számolás

A MemBlobok meghatározására Python scripteket használtunk. Az eszköz két bemenete egy krio-EM térkép és a hozzá tartozó szerkezet PDB formátumban. A szerkezetből a VMD MDFF plugin-nal egy elméleti sűrűség térképet készítettünk, melyet kivontunk a kísérletes sűrűségekből. Az így kapott térképet 3D pontokká és sűrűség értékekké alakítottuk át.

Utána a TMDET által számolt translációs mátrixszal beforgattuk. Ezután 2 Å-onként x-y síkokat képeztünk, melyek 10°-os szeleteiben összeadtuk a sűrűség értékeket. Minden egyes szeletben z=0-ból indulva, z mentén pozitív és negatív irányba megkerestük az első minimum sűrűség értéket. Az így kapott membrán határokat rávetítettük a szerkezeti modellre.

## **MemMoRF**

A membránfehérjékhez tartozó NMR (Nuclear magnetic resonance) szerkezeteket az RCSB-ből, a hozzájuk tartozó kémiai eltolódásokat pedig a BMRB-ből töltöttem le. Az összegyűjtött szerkezetekhez tartozó pulbikációkban olyan nem TM régiókat kerestem, melyek rendezetlenek és képesek membránhoz kötődni. A kémiai eltolódásokból másodlagos szerkezeti populációkat (SSPop) és flexibilitást számoltam a  $\delta^2D$  és RCI (random coil index) programok segítségével. Ez alapján egy régiót akkor tekintettem rendezetlennek, ha a flexibilitás értéke legalább 0.15, a coil populációja pedig legalább 0.5 volt. A rendezetlenség megállapítására használtam még a DisProt, DIBS, MFIB és PFAM adatbázisokat és a röntgen krisztallográfiás és krio-EM szerkezetek hiányzó régióit.

## 4. EREDMÉNYEK

### Konftorok és elektrosztatikai számolások

A következő TM predikciós módszereket hasonlítottam össze: PPM, TMDET és MEMPROTMD. Ehhez 17, a Pgp-családba tartozó fehérje 62 szerkezetét használtam. A fehérjék membránhoz viszonyított dőlésszögében a legnagyobb eltérés  $10-12^\circ$  volt, ami elhanyagolható. A membrán z irányú elhelyezkedésében 4 szerkezet között volt 3 Å-nél nagyobb különbség (PDBID: 2HYD, 3QF4, 4KSB, 5UAK). Ezek membrán szolvatációs energiáinak különböző membrán pozíciókban történő kiszámítása alapján a 3QF4 és az 5UAK esetében az OPM, a 4KSB esetében a MEMPROTMD, a 2HYD esetében pedig a PDBTM adta a legjobb eredményt.

A Pgp-szerű ABC fehérje szerkezetek funkcionális alegységeinek térbeli elrendeződésének vizsgálatára  $2 \times 12$  konftort definiáltam. A konftorok által bezárt szögek illetve a köztük lévő távolság alapján a különböző konformációs állapotok elkülöníthetők egymástól.

Das és munkatársai molekuladinamikai szimulációkkal előállítottak egy olyan CFTR modellt, mely nyitott klorid csatornát tartalmaz (nyitott Das model). A konftorok segítségével ezt összehasonlítottam a dimerizálódott nuklotid kötő



doménekkel (NBD-kel) rendelkező 5W81 szerkezettel és egy McjD (Microcin-J25 export ATP-binding/permease protein) alapú homológia modellel. A 2D-re vetített konforok vizualizációja megmutatta, hogy a nyitott Das modell NBD-jeinek rotációja nagyban különbözik a többi modellektől. A nyitott NBD-kel rendelkező ún. zárt Das modell szintén jelentősen különbözik a hasonló CFTR modellektől.

A szeparált NBD-kel rendelkező 5UAK szerkezettel végzett molekuladinamikai szimulációink során az NBD-k összezártak. A trajektóriákat a konforok segítségével elemeztük. A konforok megmutatták, hogy az NBD-k a fehérje többi részénél lassabban stabilizálódtak a szimuláció során, és tetten érhető volt az NBD-k aszimmetrikus asszociációja is.

36 szerkezetre számoltam membrán szolvatációs energiát. Négy szerkezet az extracelluláris tér felé nyitott volt. Közülük a 3B60 és a 2HYD esetében magas volt a szolvatációs energia, míg a 6C0V és a 6BHU esetében alacsony volt. Ez utóbbi két szerkezetben a TM hélixek kevésbé tágra nyitottak az extracelluláris tér felé.

Az ABCC1 (ATP binding cassette subfamily C member 1, PDBID: 6BHU) szerkezet felületi elektrosztatikájának kiszámolásával azonosítható az L0 motívum kötőhelye.

## **MemBlob**

A MemBlob munkafolyamatot 92 TM fehérjére futtattuk le. A micellával megoldott sűrűség térképek 14%-a nem tartalmazta a membrán mimetikumból származó sűrűséget, míg ez az arány a nanodisc és az amphipol esetében 22 és 20% volt. A micellával megoldott szerkezetek 8%-a és az amphipollal megoldott szerkezetek 13%-a esetében túl zajos volt a térkép a TM régiók meghatározásához.

A MemBlob által meghatározott TM régiókat összehasonlítottuk a TMDET prediktorral jósoltakkal. Az általunk számolt membrán középpont 4 esetben tért el 5 Å-nál nagyobb mértékben, a legnagyobb eltérést a PDBID: 5U70 (dz = -7.4 Å) mutatta. A TM régiók vastagsága 8 Å-nél kisebb mértékben tért el a predikciótól a nanodiskben meghatározott szerkezetek 87%-ában, az amphipollal ill micellában meghatározott szerkezetek 44 ill 32 százalékában.

A MemBlob elérhető web applikáció formájában a [memblob.hegelab.org](http://memblob.hegelab.org) címen.

## **MemMoRF**

538 fehérjéből 107-ben találtam 149 membránnal kölcsönható régiót. A régiók közül 131 rendezetlen volt, melyből 92 hiányzott a DisProt adatbázisból. A rendezetlen szakaszok közül 107 rendeződik a membránnal való kölcsönhatás során, 19 flexibilis marad és 5 esetben nem volt megállapítható a membrán interakció hatása a szerkezetre. Találtam még 18 membránkötő stabil hélixet is.

Az integrin  $\beta 3$ , a T cell receptor CD3- $\zeta$  lánc és a PLN (Phospholamban) esetében a MemMoRF-al átfedő foszforilációs helyek megakadályozzák a rendezetlen régió membránhoz kapcsolódását.

Az integrin  $\beta 3$  esetében a számolt helikális előfordulási gyakoriság alacsonyabb, mint a széles körben alkalmazott határérték azon a szakaszon, ahol az NRM sokaságok mindegyike tartalmaz egy-egy rövid hélixet.

Patológias folyamatokban fontos szerepet játszó fehérjékben is találhatóak MemMoRF-ok, például neurodegeneratív betegségekkel összefüggésben lévő fehérjékben (pl  $\alpha$ -synuclein), toxinokban (pl melittin), vírusfehérjékben (pl a HIV1 kapszid fehérjéje, a SARS-CoV E fehérjéje) és regulátor fehérjékben (pl a

sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase regulátor (PLN).

Az összegyűjtött régiók elérhetőek a [memmorf.hegelab.org](http://memmorf.hegelab.org) adatbázisban.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A vizsgált, eltérő algoritmust alkalmazó membrán predikciós módszerek hasonló eredményt adnak a fehérjék membránba ágyazódásáról, ezért valószínűleg jól írják le a valós állapotot.
2. A Pgp-szerű ABC fehérjék esetében a fehérjék funkcionális alegységeinek vektorokkal való leírása alkalmas a szerkezetek összehasonlítására, a konformációs állapotok megállapítására és molekuladinamikai szimulációk elemzésére.
3. Elektrosztatikai számításokkal kötőhelyek azonosíthatók.
4. A TM régió helyzete atomi szinten meghatározható a krio-elektronmikroszkópiával meghatározott Cuolomb potenciál térképekben található lipidszörnyezetet reprezentáló adatokból.

5. A szerkezetmegoldás során használt membrán mimetikum befolyásolja a krio-EM térkép alapján számolt transzmembrán régió vastagságát.
6. A rendezetlen régiók egy része rendeződik a membránnal való kölcsönhatás során, s az ilyen régiókat MemMoRFnak nevezzük.
7. A MemMoRF-ok foszforilációja hatással lehet a membránnal való kölcsönhatásra, s ezáltal a rendezett/rendezetlen átmenetre.
8. A PDB adatbázisban található NMR szerkezetekben számos alkalommal stabil szerkezetet (hélixet) figyeltünk meg, amit a nyers adatokból számolt flexibilitási értékek nem támasztanak alá. Ebből arra következtethetünk, hogy a szerkezeti adatbázisokba feltöltött NMR sokaságok nem adnak jó alapot a rendezetlen régiók azonosítására.

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. **Csizmadia G\***, Erdős G\*, Tordai H, Padányi R, Tosatto S, Dosztányi Z, Hegedűs T. The MemMoRF database for recognizing disordered protein regions interacting with

cellular membranes. Nucleic Acids Res. 2021 Jan 8;49(D1):D355-D360.

IF: 19,160

2. Farkas B\*, **Csizmadia G\***, Katona E, Tusnády GE, Hegedűs T. MemBlob database and server for identifying transmembrane regions using cryo-EM maps. Bioinformatics. 2020 Apr 15;36(8):2595-2598.

IF: 6,937

3. **Csizmadia G**, Farkas B, Spagina Z, Tordai H, Hegedűs T. Quantitative comparison of ABC membrane protein type I exporter structures in a standardized way. Comput Struct Biotechnol J. 2018 Oct 18;16:396-403.

IF: 4,720

### **Disszertációtól független publikációk**

Kiss R, **Csizmadia G**, Solti K, Keresztes A, Zhu M, Pickhardt M, Mandelkow E, Tóth G. Structural Basis of Small Molecule Targetability of Monomeric Tau Protein. ACS Chem Neurosci. 2018 Dec 19;9(12):2997-3006

IF: 3,861