

dc_2020_22

MTA doktori értekezés tézisei

**Membrán ABC fehérjék működése és gyógyszer-kölcsönhatásai
a 3D bioinformatika tükrében**

Hegedűs Tamás

Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
ELKH-SE Biofizikai Virologia Kutatócsoport

Budapest, 2022

Bevezetés

Az ABC (*ATP Binding Cassette*; ATP-kötő kazetta) membránfehérjék minden élőlényben fontos szerepet játszanak különféle vegyületek biológiai membránokon keresztül történő átjuttatásában. Baktériumokban számos, a tápanyagfelvételben szerepet játszó, importer ABC fehérje ismert, míg eukarióta sejtekben az ABC transzporterek többsége vegyületek kipumpálásával exporterként működik. Több ABC fehérje a sejt szintű kemoimmunitási rendszer részeként, multidrog transzporterként működve védi a szervezetet a környezetből érkező mérgező anyagokkal szemben. Ezek a multidrog ABC transzporterek alacsony szubsztrátspecifitással rendelkeznek, képesek a sejtből különböző kémiai tulajdonságokkal rendelkező vegyületeket eltávolítani, ezáltal például a sejten belüli gyógyszerkoncentrációt a hatásos szint alatt tartani. Más ABC fehérjék hibás működése vagy termelődése transzportfolyamatok megváltozását eredményezi, ami különböző betegségek kialakulásához vezethet, mint például a cisztás fibrózis (CF), a Dubin-Johnson-szindróma, a II. típusú cukorbetegség és az adrenoleukodisztrófia.

Az ABC fehérjék funkcionális egysége két transzmembrán domént (TMD) és két nukleotid-kötő domént (NBD) tartalmaz. A TMD-k konzerváltsága alacsony, ami magyarázza eltérő működésüket és szerkezetüket. Ezzel szemben az NBD-k szekvenciálisan és szerkezetileg is igen hasonlóak, bennük találhatóak a konzervált Walker motívumok és az *ABC signature* szekvencia. A transzport folyamatokat általában e helyek ATP-kötése és/vagy hidrolízise hajtja, ez alól kivétel például a klorid csatornaként működő CFTR fehérje. Az ABC fehérjék többségére jellemző az ATP hiányában megfigyelhető "alul-nyitott" konformáció, amelyben az NBD-k és a TM hélixek intracelluláris vége távol van egymástól, és az ATP-kötés hatására bekövetkező "alul-zárt és felül-nyitott" konformáció. Ez az átfordulás a legtöbb esetben valószínűleg az *alternativ access* működési mechanizmussal hozható összefüggésbe.

Célkitűzések

1. Fő célunk, hogy bioinformatikai módszerek alkalmazásával megértsük a transzmembrán ABC fehérjék szerkezeti és működésbeli összefüggéseit.
2. Elméleti módszerek alkalmazásával tervezzük atomi szinten megérteni a cisztás fibrózist okozó mutációknak a hatásmechanizmusát és a CFTR fehérje szerkezetére és dinamikájára kifejtett hatását.

3. A kísérletesen meghatározott statikus CFTR szerkezetek egyike sem tartalmaz klorid vezetésre alkalmas nyitott csatornát, ezért a klorid átjutási mechanizmus és útvonal megismerését tűztük ki célul.
4. Az ABCG2 transzporter számos gyógyszer szerkezeten belüli eloszlását (ADME-Tox tulajdonságait) befolyásolja, így csökkentheti hatásosságukat. Ezért igen fontosnak tartom működésének és szubsztrátfelismerésének leírását a számításon biológia módszereinek felhasználásával.
5. A CFTR és az ABCG2 fehérjékkel végzett munka során számos ABC vagy általánosan transzmembrán fehérjékkel kapcsolatos kérdés felmerült. Annak érdekében, hogy az ezekre adott algoritmikus megoldásaink és bányászott adataink ne csak a saját projektjeinkben tudjanak hasznosulni, hanem mások is fel tudják használni, ezért ezeket is közzétettük, illetve publikus webapplikációkon keresztül elérhetővé tettük.

Tézisek

1. tézis (Cikk-1)

A CFTR fehérje feltekeredését segítő legígéretesebb korrektor vegyületek még egymással kombinálva is csak kismértékben növelték a $\Delta F508$ -CFTR sejtfelszíni mennyiségét, csekély klinikai haszonnal kecsegtetve. Bemutattuk, hogy a korrektorok többsége az NBD1/CL4 interfészt stabilizálja, s a terápia hatásosságának növelésére szükség van más helyen ható vegyületekre. Eléleti és kísérleti eredményeink alapján azt javasoltuk, hogy olyan $\Delta F508$ -CFTR konstrukcióval kell gyógyszerjelöltek keresését végrehajtani, amelyben ez az interfész stabilizált (pl. R1070W), így ki lehet válogatni azokat a vegyületeket, amelyek az NBD1 stabilitását növelik.

2. tézis (Cikk-2)

Bizonyos CF mutánsok esetében a CFTR ioncsatorna nyitódását befolyásoló VX-770 (Ivakaftor) potenciátor terápiás hatása jelentős. Mivel a $\Delta F508$ -CFTR betegek kezelése a fehérje feltekeredését javító VX-809 (Lumakaftor) korrektorral nem eredményezte diagnosztikus paraméterek szignifikáns javulását, ezért felmerült esetükben a VX-809 korrektor és a VX-770 potenciátor együttes alkalmazása. Kimutattuk azonban, hogy a VX-770 a fehérje funkcióját annak destabilizálásán keresztül javítja, ami viszont a korrektor hatását gyengíti. Ezért hatékony kombinált terápiákhoz a meglévő potenciátorok módosítása vagy új potenciátorok fejlesztése szükséges.

3. tézis (Cikk-3)

A CFTR aktív állapotban meghatározott szerkezete nem mutat klorid-vezetésre alkalmas útvonalat. Annak érdekében, hogy a klorid-vezetéshez szükséges geometriával rendelkező CFTR-konformációkat tudjunk azonosítani, a kísérletesen meghatározott CFTR szerkezettel egyensúlyi molekuladinamika (MD) szimulációkat végeztünk. Eredményeink olyan atomi szintű adatokat szolgáltatottak, amely CF elleni gyógyszer-molekulák hatásmechanizmusának megismeréséhez és potenciátorok fejlesztéséhez járul hozzá.

4. tézis (Cikk-4)

Az ABCG fehérjék szekvenciájuk alapján külön alcsaládot alkotnak az ABC fehérjék családján belül. Jellemzően alacsonyabb a transzmembrán doménben található aminosavak száma, ezért más alcsaládba tartozó ABC fehérje szerkezetét templátként használva nem lehet szerkezetüket modellezni. Az ABCG5/ABCG8 heterodimer kristályszerkezetének meghatározása után, a bioinformatika alapelveit és eszközeit használva elsőként modelleztük az ABCG2 fehérje szerkezetét. Molekula dinamikai szimulációk alapján meghatároztuk a köszvényel asszociált Q141K és a szubsztrátspecifitás változását okozó R482G mutációk lehetséges szerkezeti hatásait is.

5. tézis (Cikk-5)

A rendkívül fontos kísérletes ABCG2 szerkezetek nem tartalmaznak információt a fehérje dinamikájáról, ezért a transzport leírására csak limitáltan alkalmazhatók. Ezért egy fiziológias szubsztrát, a húgysav jelenlétében végzett MD-szimulációkkal jellemeztük a transzlokációs útvonalat *in silico* dokkolás alkalmazása mellett.

6. tézis (Cikk-5)

Korábban munkatársaim kísérletesen bemutatták, hogy az ABCG2 működését a koleszterin jelentősen befolyásolja. A hatás atomi szintű értelmezéséhez különböző lipidösszetételű membránba ágyazott ABCG2 transzporterrel végeztünk MD-szimulációkat, amelyek alapján megállapíthattuk, hogy a koleszterin a transzportfolyamatot a transzmembrán hélixek intracelluláris oldalon történő zárásának elősegítésével mozdítja elő.

7. tézis (Cikk-6)

Fehérjék természetes variánsait és laboratóriumban előállított mutációit nehéz publikációkból összegyűjteni és homológ fehérjék szekvenciájának és szerkezetének kontextusában vizsgálni. Az ABCM2 web alkalmazásunkban ezeknek a kihívásoknak egy részét bioinformatikai megközelítéssel megoldottuk, amelynek kiemelkedő eleme, hogy szekvencia-illesztések

használatával lehetővé tettük különböző ABC fehérjék szekvenciálisan homológ pozícióiban lévő variánsainak összehasonlítását is.

8. tézis (Cikk-7)

Egyre több ABC membránfehérje szerkezetét határozzák meg, amely szerkezetek között számos jobban vagy kevésbé eltérő konformáció figyelhető meg. Ezek összehasonlítására és osztályozására szabványosított, automatikusan generálható mérőszámokat, *konftorokat* hoztunk létre. Ezek a metrikák hozzájárulnak az ABC membránfehérjék szerkezeti jellemzőinek mélyebb megértéséhez és szerkezeteinek validálásához. Hasonló 3D bioinformatikai metrikák más fehérjecsaládokra is kidolgozhatók és alkalmazhatók.

9. tézis (Cikk-8)

A krio-elektronmikroszkópiát (krio-EM) alkalmazó membránfehérje szerkezetmeghatározás során számos esetben a jelenlevő lipidkörnyezet is látható a krio-EM denzitásban. Ezért kifejlesztettünk egy olyan munkafolyamatot (MemBlob), ami ezt a kísérletes adatot felhasználva meghatározza a fehérje lipidkörnyezettel körülvevő TM részét. Tanulmányunk bemutatta, hogy a krio-EM sűrűségterképek a fehérjeszerkezeten kívül más értékes információt is tartalmaznak, mint például a lipidkörnyezet helyzete és a rendezetlen régiókhoz tartozó sűrűségek.

10. tézis (Cikk-9)

Fehérjék szerkezetének szekvenciájuk alapján történő jóslásában nagy áttörést hozott a neurális hálózaton alapuló AlphaFold, amelyet a betanítás során nem érzékenyítettek membránfehérjékre. Ezért megvizsgáltuk és bemutattuk, hogy az AF2 membránfehérjékre is hasonló minőségű szerkezeteket tud jósolni mint szolubilis fehérjékre. A módszer felhasználásával megépítettük olyan dimer humán ABC fehérjék szerkezetét, amelyek sem a kísérletes PDB, sem az AF2 EBI adatbázisban nem találhatóak meg (<https://abc3d.hegelab.org>).

11. tézis (Cikk-10)

A fehérje-membrán kölcsönhatások alapvető szerepet játszanak számos celluláris folyamatban, s ezek kialakításában gyakran vesznek részt rendezetlen régiók (*Intrinsically Disordered Region*). Az olyan rendezetlen régiókat, amelyek nemcsak más fehérjékkel, hanem lipidekkel is képesek specifikus, reverzibilis kölcsönhatásokat kialakítani, MemMoRF-oknak (*Membrane Molecular Recognition Feature*) neveztük el. Ezeket a régiókat és a hozzájuk tartozó szerkezeti adatokat, betegségekkel kapcsolatos információkat összegyűjtöttük, és egy web applikáción keresztül elérhetővé tettük. A MemMoRF adatbázis felhasználóbarát felületen keresztül érhető

el, így jó eséllyel válhat a széles tudományos közösség számára a transzmembrán és membránhoz kapcsolódó fehérjék rendezetlen régióinak központi, 3D bioinformatikai forrásává.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Cikk-1 Okiyoneda, T, G Veit, JF Dekkers, M Bagdany, N Soya, H Xu, A Roldan, AS Verkman, M Kurth, A Simon, T Hegedus, JM Beekman, and GL Lukacs. 2013. “Mechanism-Based Corrector Combination Restores $\Delta F508$ -CFTR Folding and Function.” *NATURE CHEMICAL BIOLOGY* 9 (7): 444–454. doi:10.1038/nchembio.1253.

Cikk-2 Veit, G, R Avramescu, D Perdomo, P Phuan, M Bagdany, P Apaja, F Borot, D Szollosi, Y Wu, W Finkbeiner, T Hegedus, A Verkman, and G Lukacs. 2014. “Some Gating Potentiators, Including VX-770, Diminish $\Delta F508$ -CFTR Functional Expression.” *SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE* 6 (246). doi:10.1126/scitranslmed.3008889.

Cikk-3 Farkas, Bianka, Hedvig Tordai, Rita Padányi, Attila Tordai, János Gera, Gábor Paragi, and Tamás Hegedűs. 2020. “Discovering the Chloride Pathway in the CFTR Channel.” *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES* 77 (4): 765–778. doi:10.1007/s00018-019-03211-4.

Cikk-4 László, L, B Sarkadi, and T Hegedűs. 2016. “Jump into a New Fold-A Homology Based Model for the ABCG2/BCRP Multidrug Transporter.” *PLOS ONE* 11 (10). doi:10.1371/journal.pone.0164426.

Cikk-5 Nagy, T, Á Tóth, Á Telbisz, B Sarkadi, H Tordai, A Tordai, and T Hegedűs. 2021. “The Transport Pathway in the ABCG2 Protein and Its Regulation Revealed by Molecular Dynamics Simulations.” *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES* 78 (5): 2329–2339. doi:10.1007/s00018-020-03651-3.

Cikk-6 Gyimesi, G, D Borsodi, H Saranko, H Tordai, B Sarkadi, and T Hegedűs. 2012. “ABCmdb: A Database for the Comparative Analysis of Protein Mutations in ABC Transporters, and a Potential Framework for a General Application.” *HUMAN MUTATION* 33 (11): 1547–1556. doi:10.1002/humu.22138.

Cikk-7 Csizmadia, Georgina, B Farkas, Z Spagina, H Tordai, and T Hegedűs. 2018. “Quantitative Comparison of ABC Membrane Protein Type I Exporter Structures in a

Standardized Way.” *COMPUTATIONAL AND STRUCTURAL BIOTECHNOLOGY JOURNAL* 16: 396–403. doi:10.1016/j.csbj.2018.10.008.

Cikk-8 Farkas, Bianka, G Csizmadia, E Katona, GE Tusnady, and T Hegedus. 2020. “MemBlob Database and Server for Identifying Transmembrane Regions Using Cryo-EM Maps.” *BIOINFORMATICS* 36 (8): 2595–2598. doi:10.1093/bioinformatics/btz539.

Cikk-9 Hegedus, Tamas, M Geisler, GL Lukacs, and B Farkas. 2022. “Ins and Outs of AlphaFold2 Transmembrane Protein Structure Predictions.” *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES* 79 (1). doi:10.1007/s00018-021-04112-1.

Cikk-10 Csizmadia, Georgina, G Erdos, H Tordai, R Padanyi, S Tosatto, Z Dosztanyi, and T Hegedus. 2020. “The MemMoRF Database for Recognizing Disordered Protein Regions Interacting with Cellular Membranes.” *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 49 (D1): D355–D360. doi:10.1093/nar/gkaa954.