

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2832.

SIMON MÁRTON ANDRÁS

Celluláris és molekuláris élettan
című program

Programvezető: Dr. Hunyady László, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Csanády László, egyetemi tanár

A CFTR anioncsatorna extracelluláris régiójának a csatorna működésére gyakorolt hatása

Doktori értekezés

Simon Márton András

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csanády László, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Varga Zoltán, az MTA doktora, egyetemi docens
Dr. Hegedűs Tamás, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Várnai Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Barta Csaba, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Szakács Gergely, Ph.D., Kutatócsoport vezető

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
1.1. A cisztás fibrózis.....	7
1.1.1. A hR117H CF mutáció kórétettana.....	8
1.2. A CFTR anioncsatorna	8
1.2.1. A CFTR anioncsatorna szerkezeti felépítése	8
1.2.2. A CFTR anioncsatorna működése	11
1.2.3. A vad típusú csatornák kapuzási ciklusa, valamint a nem-hidrolitikus mutációk elméleti háttere és alkalmazása	13
1.2.4. A CFTR ioncsatorna más fajokban.....	14
2. Célkitűzések.....	16
3. Módszerek.....	17
3.1. Vegyszerek és felhasznált anyagok	17
3.2. Molekuláris biológia	17
3.2.1. A cDNS molekuláris klónozása a megfelelő expressziós vektorokba.....	17
3.2.2. Mutagenézis	18
3.2.3. RNS előállítás.....	19
3.3. A CFTR ioncsatorna kifejezése a különféle expressziós modellrendszerekben	19
3.3.1. A CFTR ioncsatorna kifejezése békapetesejtekben.....	19
3.3.2. A CFTR ioncsatorna HEK293 emlős sejtekben történő expressziója	20
3.4. Inside-out Patch clamp mérések	20
3.5. Kinetikai analízis	21
3.5.1. A makroszkópos relaxációk kivitelezése és elemzése	21
3.5.2. Az intraburst egyensúlyi állandó meghatározása.....	21

3.5.3. Koncentráció-hatás diagrammok illesztése a Michaelis-Menten egyenlettel	22
3.5.4. Az egycsatornás mérések elemzése telítési ATP koncentráció mellett	24
3.5.5. A modellfüggő sebességi együtthatók számítása.....	26
3.6. Termodinamikai mutáns ciklus.....	27
3.7. A szabadentalpia profilok számítása.....	29
3.8. Szekvencia illesztés	29
3.9. Homológia-modellezés és szerkezetelemzés	30
3.10. Statisztika.....	30
4. Eredmények	31
4.1. Szerkezeti különbségek a hR117 / zR118 pozíciót illetően a humán és zebrahal ortológokban	31
4.2. A hR117H mutáció molekuláris patomechanizmusának vizsgálata.....	32
4.2.1. A hE1124 Δ mutáns hR117H-szerű fenotípussal jellemezhető.....	32
4.2.2. A hR117-E1124 kölcsönhatás stabilizálja a B állapotot, de nem jön létre a C _s állapotban	36
4.2.3. A B állapoton belül csak az O állapotban jön létre a hR117-hE1124 kölcsönhatás.....	39
4.3. A zebrahal és a humán ortológ kapuzásának összehasonlítása nem-hidrolitikus háttérben.....	42
4.4. A zR118H mutáció nem gyorsítja a zebrahal csatornák záródási sebességét...45	
4.5. Az extracelluláris régió konzervált szerinjének szerepe különböző ortológok esetén.....	47
4.5.1. Az OF-zCFTR és OF-hCFTR lehetséges alternatív stabilizáló kölcsönhatásai.....	47
4.5.2. A zS109-zN120 kölcsönhatás stabilizálja a C _f állapotot	49
4.5.3. A hS108 oldallánc a hR117 oldallánccal együtt stabilizálja az O állapotot	51

4.5.4. A C_f állapotot stabilizáló ősi kölcsönhatás helyreállítható a humán ortológban	54
4.6. Modellfüggő analízis: $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ avagy $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$	57
4.6.1. Az O állapot szelektív destabilizálásával nem tehető különbség a két modell között.....	58
4.6.2. A C_f állapot szelektív destabilizálásával sem tehető különbség a két modell között.....	59
5. Megbeszélés.....	61
6. Következtetések	67
7. Összefoglalás	69
8. Summary	70
9. Irodalomjegyzék	71
10. Saját publikációk jegyzéke	79
11. Köszönetnyilvánítás.....	81

Rövidítések jegyzéke

ABC	ATP-binding cassette (ATP-kötő kazetta)
ATP	adenozin-trifoszfát
B	burst állapot
BLAST	basic local alignment search tool
BS3-Cl	NMDG-Cl alapú kádoldat
cAMP	ciklikus adеноzin-monofoszfát
CF	cisztás fibrózis
C _f	flickery zárt állapot
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CH	csatoló hélix
C _s	interburst állapot
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
<i>E. coli</i>	<i>Echerichia coli</i>
ECL	extracellular loop (extracelluláris hurok)
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)
h	humán
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinétánszulfonsav
IF	inward-facing (befelé néző)
K _{eq} B	intraburst egyensúlyi állandó
k _h	az ATP hidrolízis sebességi állandója
k _{nh}	nem-hidrolitikus záródás sebességi állandója
NBD1/2	nukleotidkötő domén 1/2
NMDG	N-metil-D-glükózamin
O	nyitott állapot
OF	outward-facing (kifelé néző)
P	foszfát csoport
PCR	polimeráz láncreakció
P-dATP	2'-deoxi-N6-(2-feniletilyl)-adenozin-trifoszfát
PKA-C	protein kináz A katalitikus alegység

P_o	open probability (nyitvatartási valószínűség)
PS3	NMDG-Cl alapú pipetta oldat
R-domén	regulációs domén
SEM	standard error of the mean (az átlag standard hibája)
T^\ddagger	átmeneti állapot
TM	transzmembrán hélix
TMD1/2	transzmembrán domén 1/2
WT	wild type (vad típus)
z	zebrahal
$\Delta\Delta G_{\text{int}}(S_1 \leftrightarrow S_2)$	a kölcsönhatási energia változása S_1 és S_2 kapuzási lépések között
τ_{burst}	átlagos 'burst' élettartam
τ_{flicker}	a 'flickery' zárt állapot átlagos élettartama
$\tau_{\text{interburst}}$	átlagos 'interburst' élettartam
τ_{open}	a nyitott állapot átlagos élettartama

1. Bevezetés

Kutató munkám során a CFTR ioncsatorna szerkezet-funkció összefüggéseit vizsgáltam, így ezen fejezetben ismertetem a fehérje – értekezésemben foglalt eredményeim megértéséhez nélkülözhetetlen – irodalmi háttérét.

1.1. A cisztás fibrózis

A cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) fehérje különböző mutációi cisztás fibrózis (CF) kialakulásához vezethetnek, amely az egyik leggyakoribb monogénesen öröklődő letális több szervet érintő betegség a kaukázusi populációban (1). A klorid (2, 3) és a bikarbonát (4) transzport defektusa révén kialakuló sűrű nyák a légzőszervrendszerben elzárja a légutakat, ami idült tüdőgyulladás, hörgőtágulathoz és visszatérő tüdőfertőzésekhez vezethet; míg a hasnyálmirigyben a kivezető csövek elzáródása az exokrin funkció elégtelen működéséhez, a β -sejtek pusztulását követően pedig diabetes kialakulásához vezethet (1, 5, 6). Jelentős tünet lehet még a máj biliáris cirrózisa, a férfiaknál fellépő terméketlenség, valamint az újszülöttek vékonybelének elzáródása (meconium ileus). A leggyakoribb halálok a visszatérő fertőzések okozta légzési elégtelenség (1, 7). Említésre méltó, hogy a fehérje túlműködése a fokozott elektrolit szekréció miatt hasmenéshez vezethet. Ilyen helyzetet jellemzően a különböző bakteriális toxinok (pl. kolera toxinja) idéznek elő a heterotrimer G_s -fehérjefüggő jelátvitelen keresztül megvalósuló túlzott CFTR stimuláció révén (8).

A több száz azonosított CF-et okozó mutáció különböző osztályokba sorolható az mRNS / fehérje expresszióra (1. osztály), a fehérje érésére (2. osztály), csatorna kapuzására (3. osztály), vezetőképességére (4. osztály), valamint sejtmembránbeli mennyiségére és stabilitására (5-6. osztály) gyakorolt hatása alapján (9, 10). A betegség kialakulásáért leggyakrabban (~ 70 %) az 508-as fenilalanin delécióna ($\Delta F508$) felelős, mely a fehérje érését és kapuzását is megzavarja (11). Ezzel szemben a G551D mutáció, a 3. leggyakoribb mutáció CF-fel diagnosztizált betegekben, az ioncsatorna ATP-függő kapuzását teszi tönkre (12).

Bár a CF nem gyógyítható, az utóbbi évtizedben több olyan kismolekulás gyógyszert fejlesztettek ki, amelyek magán a CFTR fehérjén fejtik ki hatásukat, és

alkalmazásukkal segíthető a fehérje érése (korrektorok, pl.: lumacaftor, tezacaftor) (13-15), illetve a csatorna kapuzása (potenciátorok, pl.: ivacaftor, elexacaftor) (16, 17). Ezek a klinikailag is jóváhagyott vegyületek jelentősen mérsékelhetik a betegek tüneteit, ugyanakkor hatékonyságuk erősen mutáció-függő, döntően a csatorna biológiai komplexitása miatt. Így kulcsfontosságúvá vált a különböző mutációk molekuláris patomechanizmusának feltárása (18).

1.1.1. A hR117H CF mutáció kóréletana

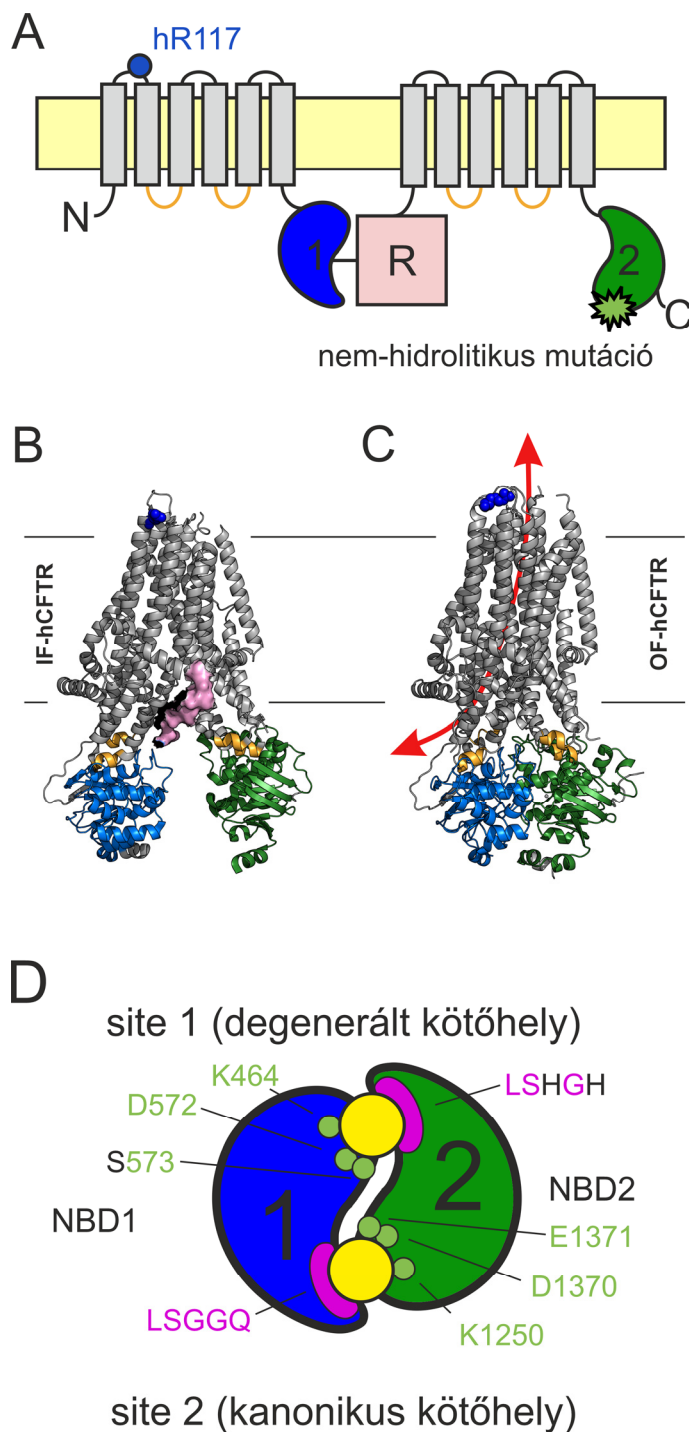
A membránon átívelő ioncsatorna extracelluláris régiójában található arginin (hR117) mutációja CF kialakulásához vezethet (19, 20), e mutációt kb. 2000 CF-es beteg esetén diagnosztizáltak az Egyesült Államok populációjában (www.cftr2.org). A hR117H mutáció a 3. és 4. mutációs osztályba sorolható, azaz a csatorna érését nem befolyásolja, ugyanakkor nagymértékben gyorsítja a csatornák záródását, valamint a csatorna vezetőképességének csökkenéséhez vezet (21, 22). Bár számos elektrofiziológiai és klinikai adat áll rendelkezésre, a mutáció közvetlen molekuláris hatása ismeretlen.

1.2. A CFTR anioncsatorna

A CFTR anioncsatorna az 'ATP-binding cassette' (ABC) fehérjék szupercsaládjába, azon belül az ABCC alcsaládba tartozik (23). Az ABC fehérjék közt egyedüli ioncsatornaként építél sejtek apikális membránjában van jelen, és a légutak, bél, máj és hasnyálmirigy só-víz transzportfolyamataiban játszik szekréción szerepet (5).

1.2.1. A CFTR anioncsatorna szerkezeti felépítése

Az ABCC alcsaládra jellemzően a CFTR anioncsatorna egyetlen polipeptidláncból álló fehérje, amely két – a csatorna pórusát képező – egyenként hat transzmembrán hélixet tartalmazó transzmembrán doménből (TMD1/2, 1. ábra, szürke) és két – az ATP kötéséért és hidrolíziséért felelős – nukleotidkötő doménből (NBD1/2,



1. ábra A CFTR topológiája, valamint a humán ortológ befelé ('inward facing') és kifelé ('outward-facing') néző konformációinak szerkezete. (A) A CFTR topológiájának vázlatja, valamint a hR117 pozíció helyzete (kék kör). A TMD-k szürke, az NBD1/2 rendre kék és zöld, az R domén rózsaszín, a csatoló hélixeket (CH) tartalmazó intracelluláris régiók narancs, a membrán halványsárga színnel van ábrázolva. A halványszöld csillag az NBD2 Walker B motívumában található nem-hidrolitikus háttérmutációkat (hD1370N, hE1371S) jelöli. (B) A befelé néző foszforilálatlan ('inward facing', IF) hCFTR (PDB: 5UAK) valamint a (C) kifelé néző foszforilált, ATP-t kötött ('outward facing', OF) hCFTR (PDB: 6MSM) szerkezete, kiemelve a hR117

pozíció helyzetét, valamint a csatoló hélixeket (CH, narancs) a térszerkezetben. A domének szinkódolása (A) szerint, az R domént szemléltető elektron denzitás a (B) panelen látható. A piros nyíl a (C) esetén az anionok transzlokációs útvonalát ábrázolja sematikusán (D) Az NBD dimer sematikus szerkezete. A panel szinkódolása (A) szerint, az ATP sárga, a 'signature' szekvencia rózsaszín, a Walker A és B motívumok fontosabb pozíciói halvány zöld színnel jelölve.

1. ábra, kék/zöld) épül fel (5). E két homológ, de aszimmetriát mutató molekulafelet (TMD1-NBD1 és TMD2-NBD2) egy szabályozó szerepet betöltő domén (R domén, 1. ábra, rózsaszín) köti össze. Ez utóbbi domén egyedi az ABC fehérje családban, sőt, szekvenciája semmilyen ismert fehérje szekvenciájával nem mutat homológiát (24). Minthogy másodlagos szerkezete javarészt nem definiált, szerkezete máig ismeretlen.

Az NBD-k az ABC szupercsaládra általánosan jellemző ATPáz aktivitással rendelkező domének, amelyek két aldoménből állnak. A 'fej' aldomént egy α -hélixek által stabilizált F1-szerű parallel β -redő és egy háromláncú antiparallel β -redő alkotja, előbbi tartalmazza az ATP kötéséhez elengedhetetlen konzervált Walker A (GXXXXGKS/T) (P-hurok) és Walker B (ZZZZDE, Z: hidrofób) motívumokat (1D ábra) (25). E két β -redő egy központi α -hélixet vesz körül, mely a Walker A motívum formálta P-hurkot követi. Az α -helikális 'farok' aldomén tartalmazza az ún. 'signature' szekvenciát (LSGGQ, C-hurok, 1D ábra). Az ATP trifoszfát láncát a P-hurok és a Walker A lizin oldalláncai (hK464, hK1250, 1D ábra) (26), adenin gyűrűjét pedig az antiparallel β -redő aromás oldalláncai (hW401, hY1219) koordinálják. A Walker B motívum aszpartátjai (hD572, hD1370, 1D ábra) a Mg^{2+} -ion koordinálásában töltenek be fontos szerepet (27-29), az NBD2 Walker B glutamát (hE1371, 1D ábra) oldallánca az ATP hidrolízise során katalitikus bázisként szerepel (30, 31). A két NBD domén az ATP NBD-khez való kötődése révén stabil NBD-dimert képez (32-34), mely két kompozit ATP-kötő helyet foglal magába. Míg a konszenzus kötőhely (Site 2) esetén (Walker A és B motívumok az NBD2-ben található) az ATPáz aktivitás megtartott (26), a degenerált kötőhely (Site 1) esetén (Walker A és B motívumok az NBD1-ben található) az ATPáz aktivitás sérült, ezen a kötőhelyen ATP hidrolízis nem megy végbe (35, 36). Említésre méltó, hogy bár az ATP még a dimer kialakulása előtt kötődik az NBD domének 'fej' aldoménjéhez, maguk a kötőhelyek csak az NBD dimer kontextusában léteznek, hiszen mindkét NBD hozzájárul mindkét kötőhely kialakításához (34).

A TMD1/2 membránon átívelő, mélyen a citoplazmába nyúló 12 transzmembrán hélixből (TM1-12) épül fel. A 6-6 α -hélixből álló TMD-k dimerizálva képezik az anionok transzlokációs útvonalát (34). Említésre méltó, hogy a dimerizáción túl egy-egy intracelluláris hurkuk keresztezi egymást, s kapcsolatot létesít a fehérje ellenkező oldalán lévő NBD-vel, így a TMD-k mindkét NBD-vel összeköttetésben vannak (34, 37). A TMD-k és NBD-k közti kommunikáció rövid, ún. csatoló ('coupling') hélixek (CH) révén valósul meg (1B-C ábra, narancs), amelyek párhuzamosak a plazmamembrán síkjával, s közvetítik a konformációváltozásokat a két szerkezeti egység közt. A négy csatoló hélix (TMD1: CH1, CH2, TMD2: CH3, CH4) közül az NBD1 az elsővel és negyedikkel, az NBD2 a másodikkal és a harmadikkal áll kapcsolatban (38). Magát a pórust a TM1, TM5, TM6, TM8, TM11 és TM12 hélixek határolják, üregét a citoszóllal az intracelluláris oldalon található laterális nyílás köti össze, amely a TM4 és TM6 hélixek között nyílik (34, 39). A permeábilis anionok a nyitott póruson keresztül tehát szabadon áramolhatnak elektrokémiai gradiensüknek megfelelően (40). Az aszimmetrikus homokóra alakú pórus legszűkebb ($\sim 5.3 \text{ \AA}$ a nyitott konformációban), az extracelluláris felszínhez közeli része alkotja a kaput (40, 41). Szelektivitását tekintve a pórus pozitív töltésű oldalláncainak (37) köszönhetően igen szelektív anionokra kationokkal szemben, ugyanakkor kevésbé szelektál anionok között (42). A kloridion mellett élettani szempontból jelentős a bikarbonát transzportja is, amely fontos szerepet játszik az epitél felületeket beborító folyadék réteg pH-jának szabályozásában (4, 43).

1.2.2. A CFTR anioncsatorna működése

A nem-foszforilált csatorna zárt, befelé néző ('inward-facing', IF, 1. ábra) állapotában az R domént az NBD1 és NBD2 domének fogják közre (37). A cAMP-függő protein kináz A katalitikus alegysége (PKA-C) kölcsönhatásba lép az R doménnel (44), és ATP jelenlétében az R domén több szerin oldalláncát foszforilálja (45), mely események hatására az R domén kimozdul az NBD1/2 közé ékelődött helyzetéből, és az NBD-k közti tér szabaddá válik (34). Ezt követően egy-egy ATP kötődik az NBD1/2 'fej' részéhez, és kialakulhat a 'fej-farok' NBD dimer (34). E folyamat konformációs változást indukál a TMD1/2-ben is, átrendezve a csatorna IF

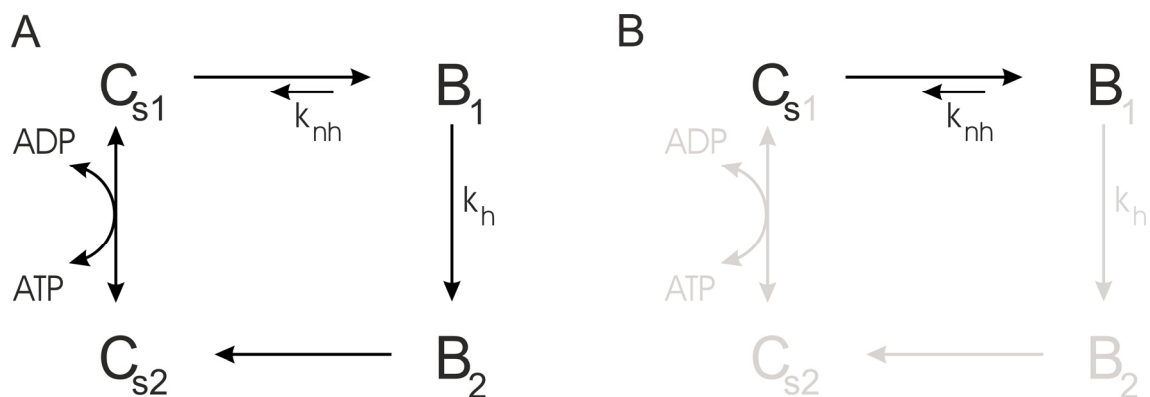
konformációját egy kifelé néző ('outward-facing', OF, 1. ábra) orientációra, ezzel lehetővé téve a csatorna pórusának megnyitását (33, 34).

A foszforilált CFTR kapuzása 'bursting' viselkedéssel jellemezhető; a csupán rövid ('flickery', ~10 ms) záródásokkal váltakozó csatornanyitások ('open') csoportjait 'burst'-öknek, míg e burst-öket egymástól elválasztó hosszabb ('slow', ~1 s) zárt szakaszokat 'interburst'-öknek nevezik. Ezen események alapján határozható meg az interburst (C_s) és burst (B) állapot, valamint a B állapoton belül a nyitott (O) és flickery zárt (C_f) állapotok (46). Kinetikai értelemben ez a fajta kapuzás kétféle mechanizmussal, a $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ és a $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$ modellekkel, írható le. Az IF konformációjú C_s zárt állapotban a csatorna extracelluláris régióhoz közeli pórusa zárt, és az NBD1/2 nem alkot szoros dimert, ugyanakkor a degenerált kötőhely valószínűleg nem esik teljesen szét (37, 47) (bár az irodalomban vannak érvek a teljes disszociáció mellett (48)). Ezzel szemben a B állapot egy kompozit állapot, mely magába foglalja az O és C_f állapotokat. Ez utóbbiak TMD konformációja alapvetően OF (49, 50), amelyet az ATP-t kötött NBD dimer stabilizál, azonban a csatorna extracelluláris kapuja csak az O állapotban található valóban nyitva (32). A vad típusú ('wild-type', WT) CFTR esetén az igen stabil B állapotnak a site 2-ben kötött ATP hidrolízise vet véget, az így keletkező ADP és foszfát közötti elektrosztatikus taszítás miatt az NBD dimer a site 2 oldalán felnyílik, és a csatorna visszatér eredeti (IF) konformációba, amelyben az ADP új ATP-re cserélődik (51).

Bár a nemrégiben krio-elektron-mikroszkópiával megoldott CFTR szerkezetek új lendületet adtak a CFTR szerkezet-funkció összefüggésekre összpontosító kutatásoknak, fontos újra hangsúlyozni, hogy az IF szerkezet (PDB: 5UAK) nem pontosan a C_s állapotot, azaz egy foszforilált, ATP jelenlétében aktívan kapuzó csatorna zárt állapotát, jeleníti meg, hiszen a szerkezet nem-foszforilált csatornáról, ATP hiányában készült. Továbbá, az OF szerkezet sem tükrözheti pontosan a nyitott állapotot, mivel pórusának extracelluláris vége nem elég széles ahhoz, hogy egy hidratált klorid ion transzportja megvalósulhasson ('kvázi-nyitott' szerkezet). Mindazonáltal, e szerkezetekkel elfogadhatóan modellezhető a domének (TMD-k és NBD-k) alapvető elrendeződése, egymáshoz viszonyított helyzete a csatorna zárt (C_s) illetve nyitott (O) állapotában (52).

1.2.3. A vad típusú csatornák kapuzási ciklusa, valamint a nem-hidrolitikus mutációk elméleti háttere és alkalmazása

A foszforilált WT csatornák az ATP-t kötött IF konformációból (C_{s1} állapot, 2. ábra) az NBD dimer kialakulása révén a prehidrolitikus burst állapotba (B_1 állapot, 2. ábra) kerülnek. Az ATP hidrolízisét követő poszthidrolitikus burst állapotból (B_2 állapot, 2. ábra) az instabil poszthidrolitikus NBD dimer disszociációja révén a csatornák ismét IF konformációba kerülnek (C_{s2} állapot, 2. ábra), majd az ADP (site 2) ATP-re történő cseréjével visszakerülnek a kiindulási állapotba (51). Egy burst esemény tehát kétféle módon érhet véget: az NBD domének disszociációját előidézhetheti az ATP hidrolízis ($B_1 \rightarrow B_2 \rightarrow C_{s2}$), de bekövetkezhet spontán, ATP hidrolízis nélkül is ($B_1 \rightarrow C_{s1}$). Ugyanakkor, WT csatornák esetén a 'nem-hidrolitikus' záródás sebessége ($\sim k_{nh}$) az ATP hidrolízis sebességéhez ($\sim k_h$) képest lényegesen kisebb (51). Ahhoz, hogy a nem-hidrolitikus záródási sebesség, azaz a prehidrolitikus NBD dimer stabilitása vizsgálható legyen, úgynevezett nem-hidrolitikus háttérmutációk alkalmazásával meg kell akadályozni az ATP hidrolízist (53). Így a ciklikus kapuzási forma egy reverzibilis interburst \leftrightarrow burst átmenetre egyszerűsödik (2. ábra), s a most már kizárólag nem-hidrolitikusan megvalósuló záródás sebességének mérésével meghatározható a nem-hidrolitikus záródási sebességi együttható (k_{nh}) (54).



2. ábra A vad típusú (WT) valamint a nem-hidrolitikus CFTR ioncsatornák kapuzásának összehasonlítása. (A) A vad típusú CFTR kapuzásának ciklikus sémája, amelyben C_{s1} (ATP(site 1) / ATP (site 2)) és C_{s2} (ATP / ADP) zárt (IF), míg B_1 (ATP / ATP, prehidrolitikus burst) és B_2 (ATP / ADP, poszthidrolitikus burst) ionvezető OF állapotok. Továbbá k_{nh} és k_h rendre a nem-hidrolitikus és a hidrolitikus záródási sebességi együtthatók. (B) A nem-hidrolitikus háttérmutációval rendelkező CFTR csatornák kapuzása reverzibilis interburst (C_s) burst (B) átmenettel írható le, k_{nh} a nem-hidrolitikus záródási sebességi együttható.

Számos nem-hidrolitikus mutációt leírtak korábban, amelyek különböző mechanizmusokkal gátolják az ATP hidrolízisét. Miután e mutációk a prehidrolitikus NBD dimer stabilitását is eltérően befolyásolják, így egymástól eltérő átlagos burst időtartamot (τ_{burst}) és nyitvatartási valószínűséget (P_o) eredményeznek. A hD1370N mutáció a Walker B motívum konzervált aszpartátjának Mg^{2+} -ot koordináló γ -karboxil-csoportját amid-csoportra cseréli (27-29). Ennek hatására τ_{burst} mintegy 10-szeresére, a P_o mintegy 3-szorosára nő a WT csatornáéhoz képest (54).

A katalitikus glutamát (hE1371) bázikus jellege szintén csökkenthető, melynek következtében az ATP γ -P csoportjának hasítását végző, nukleofil szerepet betöltő vízmolekula nem polarizálódik, s az ATP hidrolízis megakad (31). Fontos megemlíteni, hogy e pozícióban több nem-hidrolitikus mutáció is ismeretes (S, Q), melyek egymástól eltérően befolyásolják a B állapot stabilitását (32, 51, 55, 56). Míg a P_o értéke mindkét mutáció esetén közel maximális, addig τ_{burst} értékét a hE1371S mutáció több mint 100-szorosára (55), a hE1371Q mutáció pedig több mint 1000-szeresére növeli (32, 56, 57). Ezen különbség molekuláris oka máig ismeretlen.

A Walker A motívumban található K1250 lizin oldallánca az ATP P-csoportjainak koordinálásában játszik kiemelkedő fontosságú szerepet. Alaninra való cseréje gátolja az ATP hidrolízisét, így τ_{burst} értékét ~ 100 -szorosára, míg a P_o értékét ~ 2 -szeresére növeli, ugyanakkor, az NBD2-'fej' ATP iránti affinitásának drámai csökkenése miatt a 'telítési' ATP melletti P_o nem határozható meg (26, 58).

1.2.4. A CFTR ioncsatorna más fajokban

A CFTR gerinces-specifikus ioncsatorna, legősibb ortológja a tengeri ingolóban található meg (59, 60). Figyelemre méltó ugyanakkor, hogy a nagyfokú szekvencia homológia ellenére az egyes ortológok szerkezete és működése közt igen jelentős különbségek fedezhetők fel, amelyek a csatorna molekuláris evolúciójának vizsgálatára adnak lehetőséget (57).

A humán ortológ (hCFTR) nem-foszforilált, ATP-mentes szerkezete (37) (IF-hCFTR, PDB: 5UAK) és a távoli zebrahal ortológ (zCFTR) hasonló körülmények között megoldott szerkezete (61) (IF-zCFTR, PDB: 5UAR) szuperpozicionálást követően jól illeszkednek egymáshoz. Ezzel szemben a két ortológ foszforilált, ATP-kötött szerkezetei jelentős eltéréseket mutatnak (33, 34). Egyrészt, az extracelluláris

TMD hurkok eltérő konformációi révén az OF-hCFTR fent leírt 'kvázi-nyitott' pórusával szemben az OF-zCFTR pórusa egyértelműen zárt (33). Másrészt, jelentős különbség figyelhető meg a kialakult NBD dimerek között: míg a konszenzus kötőhelyen az NBD-interfész mindkét ortológ esetén szorosan zárt, addig a degenerált kötőhelyen az OF-hCFTR szorosan, az OF-zCFTR viszont lazábban zárt interfészt mutat (33).

E szerkezeti különbségek mellett, a humán és zebraahal CFTR ortológok működése között is érdekes eltérések figyelhetők meg (57). Míg a WT humán és zebraahal csatornák átlagos burst hossza azonos nagyságrendű (~0.2-0.7 s), addig a zCFTR csatornák nyitvatartási valószínűsége számottevően alacsonyabb (~0.03) a hCFTR P_o értékénél (~0.3) (57). Továbbá, eltérő hatású a katalitikus glutamát (hE1371 / zE1372) glutaminra történő cseréje is: a zE1372Q csatorna τ_{burst} értéke negyede, míg a burst perióduson belül megfigyelhető P_o ('intraburst P_o ') értéke harmada a hE1371Q csatornáénak (57). Végül, fontos különbségek figyelhetők meg a vezetőképesség terén is: míg a humán ortológ áram-feszültség (I-V) görbéje lineáris, addig a zCFTR csatorna befelé rektifikál, vezetőképessége pedig csak feleakkora, mint a humán ortológé (57).

2. Célkitűzések

A hR117H mutáció vezetőképességre gyakorolt hatása könnyen magyarázható a pórus extracelluláris oldalán jelenlévő pozitív töltés megszűnésével (21), ugyanakkor szokatlan, hogy egy extracelluláris oldallánc mutációja markáns kapuzási defektust okozzon (62). E jelenség megértéséhez elengedhetetlen a CF-et okozó R117H mutáció molekuláris kórélettanának feltárása, mely révén válasz adható arra, hogy miért és hogyan okoz(hat) egy ABC fehérje extracelluláris pozíciójának mutációja jelentős működési defektust, a B állapot stabilitásának drasztikus csökkenését (56).

Amennyiben a hR117-es oldallánc közvetlenül befolyásolja a B állapot stabilitását, az arra enged következtetni, hogy a CFTR csatorna extracelluláris régiójának általában véve fontos szerepe van a B állapot stabilitásában. Tekintve, hogy a távoli zebrahal ortológ TM hélixének extracelluláris orientációja jelentősen különbözik a hCFTR-étől (33, 34), felmerül a kérdés, hogy van-e összefüggés a hR117/zR118 oldalláncok esetlegesen különböző szerkezeti kölcsönhatásai, valamint a két ortológ korábban részletezett eltérő kapuzása között.

E két izgalmas és tudományos szempontból kiemelkedő fontossággal bíró kérdés megválaszolása érdekében kutatásom során a CFTR anioncsatorna extracelluláris régiója szerkezet-funkció összefüggéseinek vizsgálatát tűztem ki célul. Elsődleges célul tűztem ki a hR117 oldallánc B állapotra gyakorolt hatásának vizsgálatát, valamint mutációi molekuláris mechanizmusának felderítését (52). További célul tűztem ki az h117-es pozíció, és általában az extracelluláris régió, kapuzásra gyakorolt hatásának evolúciós vizsgálatát, amely magyarázattal szolgálhat a két távoli ortológ közötti funkcionális különbségekre (63).

E kérdések megválaszolása egyrészt egy CF-et okozó mutáció (R117H) molekuláris kórélettanának megértése révén orvosbiológiai alkalmazásokra adhat lehetőséget, másrészt az extracelluláris régió kapuzásra gyakorolt hatásának feltárása révén a CFTR anioncsatorna kapuzási energetikájáról és molekuláris evolúciójáról adhat értékes információt.

3. Módszerek

3.1. Vegyszerek és felhasznált anyagok

A NaCl és a HEPES a VWR Chemicals-tól; a KCl, MgCl₂, NaOH, CaCl₂, NMDG, EGTA, PKA-C és a MgATP a Sigma-Aldrich-tól, a tömény HCl a Supelco-tól, a P-dATP a Biolog-tól, a Vx-770 a Selleck Chemicals-tól származott. Az egyéb enzimek és sejtek ismertetésére az adott szekcióban térünk ki.

OR2 puffer: 82 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5 (titráló oldat: 5 M NaOH). **OR2+** puffer: OR2 puffer 1.8 mM CaCl₂-al és 50 µg / ml gentamicinnel kiegészítve. A puffereket steril szűrés után szobahőn tároltuk.

PS3: 138 mM NMDG, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 136 mM HCl, pH 7.4 (titráló oldat: 12 M HCl). **BS3-Cl**: 138 mM NMDG, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 134 mM HCl, pH 7.1 (titráló oldat: 12 M HCl). Az oldatokat steril szűrés után szobahőn tároltuk.

Mg-ATP törzsoldat: 400 mM-os vizes törzsoldat, pH 7.1 (titráló oldat: 2 M-os NMDG). Az oldatot -20°C-on tároltuk, majd felhasználáskor 2 mM, illetve 5 mM végkoncentrációra hígítottuk BS3-Cl pufferben.

P-dATP: A P-dATP-t 50 µM végkoncentrációban alkalmaztuk BS3-Cl-ban hígítva, melyet felhasználásig -20°C-on tároltunk.

Vx770 / ivacaftor: 10 mM koncentrációjú törzsoldatot készítettünk DMSO oldószerben, melyet felhasználásig -20°C-on tartottunk. A mérések során 10 nM végkoncentrációban alkalmaztuk BS3-Cl pufferbe hígítva.

PKA-C törzsoldat és mérőoldat: A liofilizált szarvasmarha PKA-C-t (Sigma P2645-400UN) vízben oldottuk (50 µl), majd 6 µl 1 mM DTT-t adtunk redukálószerként. Felhasználásig 4°C-on tároltuk. A törzsoldatból (~19 µM) 16 µl-t adtunk 1 ml BS3-Cl pufferhez, mely így 300 nM-os végkoncentrációt eredményezett.

3.2. Molekuláris biológia

3.2.1. A cDNS molekuláris klónozása a megfelelő expressziós vektorokba

A pcDNA3 vektorban található zCFTR gén T.C. Hwang professzor nagylelkű ajándéka volt. A zCFTR cDNS-ét a békapetesejtes expressziós vektor (pGEMHE) XmaI és Sall-HF restrikciós hasítóhelyei közé klónoztuk. A XmaI és Sall-HF hasítási helyeit tartalmazó 'forward' illetve 'reverse' primerek alkalmazásával PCR reakcióval felszorzozott inszertet, valamint a cirkuláris pGEMHE plazmidot a fenti két endonukleázzal emésztettük, majd agaróz gélen történő futtatást követően tisztítottuk (Qiagen gel extraction kit). Az inszert és a linearizált plazmid elegyéhez T4 ligáz hozzáadásával létrehozott cirkuláris DNS-t hő sokk révén (42°C, 1 perc) juttattuk be kompetens DH5α *E. coli* sejtekbe, melyeket ampicillin tartalmú (100 µg / ml) táptalajra szélesztettünk és egész éjszakán át növesztettünk 37°C-on. A kinőtt telepek közül négyet 100 µg / ml ampicillin tartalmú LB tápoldatba (10 ml) mostuk, majd további egy éjszakán át tartó növesztést (37°C, 200 rpm rázatás) követően izoláltuk a DNS-t (Qiagen Mini Kit). Diagnosztikus emésztést követően (XmaI), a zCFTR cDNS-t tartalmazó konstrukciók DNS szekvenciáját teljes szekvenálással ellenőriztük (LGC Genomics). A hCFTR-pGEMHE konstrukció D.C. Gadsby professzor, a hCFTR-pcDNA3 konstrukció K.L. Kirk professzor nagylelkű ajándéka. A különböző cDNS-eket tartalmazó konstrukciókat -80°C-on tároltuk.

3.2.2. Mutagenézis

A tervezett pontmutációkat a 'Quikchange' technikával hoztuk létre (QC II XL kit, Agilent) a gyártói előírásoknak megfelelően az adott békapetesejt (pGEMHE) és / vagy emlős (pcDNA3.1) expressziós vektorban. Röviden, a pontmutációt tartalmazó forward és reverse primerek alkalmazásával végzett alacsony ciklusszámú PCR-t követően a szülői DNS szálát DpnI enzimmal emésztettük (37°C, 1 óra), majd a terméket kompetens DH5α (Top10, Invitrogen) *E. coli* sejtekbe transzformáltuk (42°C 1 perc, majd 0°C 5 perc). Az előző fejezetben foglaltak szerint a kultúrát ampicillin tartalmú táptalajra szélesztettük, majd 37°C-on éjszakán át tartó inkubálást követően konstrukciónként 2 telepet mostunk (két különböző) ampicillin tartalmú LB tápoldatba. Újabb egész éjszakán át tartó növesztést követően a DNS-t izoláltuk (Qiagen Mini Kit), koncentrációját spektrofotometriával ellenőriztük, majd a mutagenézis sikerét a célgén teljes cDNS szekvenálásával ellenőriztük. A szekvenálással igazolt konstrukciókat -80°C-on tároltuk.

3.2.3. RNS előállítása

A békapetesejtben történő expresszió végett a plazmidokat NheI-HF restrikciós endonukleázzal linearizáltuk (37°C, 2 óra), majd az emésztett vektort izoláltuk (PCR isolation kit, Qiagen). In vitro transzkripcióval (mMessage mMachine Kit, T7 polimeráz, Thermo Fischer) a lineáris vektor felhasználásával cRNS-t szintetizáltunk a gyártói előírásoknak megfelelően. A cRNS-t LiCl hozzáadásával kicsaptuk, majd 30 perc -20°C-os inkubálást követően centrifugálással (4°C, 15 perc, 30000 rcf) elválasztottuk, nukleáz mentes vízben oldottuk. A kapott cRNS molekuláris integritását agaróz gélelektroforézissel, koncentrációját spektrofotometriával ellenőriztük. A cRNS-t -80°C-on tároltuk.

3.3. A CFTR ioncsatorna kifejezése a különféle expressziós modellrendszerekben

3.3.1. A CFTR ioncsatorna kifejezése békapetesejtekben

A békapetesejt modellrendszerben végzett mérésekhez altatott (tricaine, Sigma) dél-afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) sebészeti úton eltávolított petefészek-lebenyéből a petesejteket (~5 ml sejt az OR2 pufferben) mechanikai disszociációt követően 2-es típusú kollagenáz enzim (Collagenase Type II, Gibco) alkalmazásával izoláltuk. Az emésztést egy órán át végeztük 18°C-on, majd meghatároztuk az izolált (follikuláris sejtrétegétől megszabadított) petesejtek arányát. Az optimális aránytól (sejtek ~30%-a) való nagyobb eltérés esetén az emésztési időt a kívánt emésztési fok eléréséhez adaptáltuk. Az izolált petesejteket 1.8 mM CaCl₂-t és 50 µg/ml gentamicin-szulfátot tartalmazó módosított OR2 pufferben (OR2+) 18°C-on inkubáltuk. Az egyedi-csatornás vagy makroszkópos méréseknek megfelelő expressziós szint eléréséhez a petesejtekbe 0.1-20 ng CFTR cRNS-t injektáltunk (Nanject II, Drummond), a méréseket 1-4 nap elteltével végeztük a 18 °C-on inkubált injektált sejteken (64).

3.3.2. A CFTR ioncsatorna HEK293 emlős sejtekben történő expressziója

A HEK293 sejtek tenyésztése 37°C-on, 5 V/V% CO₂ mellett történt DMEM tápoldatban. A 4.5 g/l glükóz tartalmú tápoldatot FBS (10 V/V%), glutamin (2 mM) és penicillin/sztreptomycin (100 egység / ml) hozzáadásával egészítettük ki. A különféle CFTR konstrukciókat tranziensen kifejező HEK293 sejtek létrehozásához a sejt kultúrát kotranszfektáltuk CFTR –GFP 10:1 arányú keverékével (Fugene HD reagens, Promega) a gyártói protokollnak megfelelően, majd 4-6 óra múlva a sejteket mechanikus disszociációt követően poli-D-lizinnel borított üveglemezekre pipettáztuk (65).

3.4. Inside-out Patch clamp mérések

A békapetesejtek / HEK293 sejtek membrán ioncsatorna áramait az 1.5-4 MΩ ellenállású boroszilikát kapilláris és a plazmamembrán közötti - több száz GΩ-os ellenállás – úgynevezett 'giga seal' kialakulása után kiszakított, inside-out konfigurációjú membránfoltokból vezettük el. A boroszilikát kapillárist pipettahúzó (Narishige PP-830) segítségével állítottuk elő (2 fázisú húzó protokoll, fűtőszál: 65, 50), majd hőpolírozást követően a pipetta falának elektromos kapacitását viaszréteg felvitelével csökkentettük (növelve a jel/zaj arányt). A pipettát PS3 oldattal töltöttük fel, majd a giga seal kialakulását követően a membrán foltot kiszakítottuk, majd a patch pipetta hegyét folyamatosan áramló BS3-Cl kádoldatba merítettük. A makroszkópikus méréseket jellemzően -20 - -80 mV, a mikroszkópikus méréseket -80 - -120 mV membránpotenciál alkalmazása mellett végeztük. A perfúziós rendszert számítógép-vezérelt szelepek (ALA-VM8, ALA Scientific Instruments) segítségével irányítottuk. Az oldatsere időállandóját a békapetesejt natív Ca²⁺-függő Cl⁻csatornák felhasználásával vizsgáltuk. Ezen csatornák gyors záródása révén az oldatsere időállandójának felső határa becsülhető, mely hozzávetőlegesen 100 ms volt. A csatorna működését 25°C-on vizsgáltuk Mg²⁺-ATP (Sigma-Aldrich) jelenlétében. Minden méréstípus során a membránban lévő csatornákat foszforiláltuk 300 nM PKA-C (Sigma-Aldrich) alkalmazásával (1-2 perc), majd a PKA-C és ATP elvonását követően kezdtük meg az adott mérési protokollt. A mért áramot (pA) felerősítettük és 2 kHz –es sarokfrekvenciájú aluláteresztő szűrőn szűrtük (Axopatch 200B, Molecular

Devices), majd 10 kHz mintavételezési frekvenciával digitalizáltuk (Digidata 1550B, Molecular Devices), s rögzítettük (pClamp 11, Molecular Devices). Az alkalmazott mérési protokollok a következő fejezetben kerülnek ismertetésre.

3.5. Kinetikai analízis

3.5.1. A makroszkópos relaxációk kivitelezése és elemzése

A kiszakított membránfoltban lévő csatornákat prefoszforiláltuk 5 mM ATP + 300 nM PKA-C hozzáadásával (1 perc), majd a csatornákat az ATP és a kináz elvonásával zártuk. Az ezt követően, az 5 mM ATP (1 perc) alkalmazásával aktivált áram ATP elvonására bekövetkező csökkenését illesztettük egyszerű exponenciális egyenlettel. Az alkalmazott membrán potenciál értékét -20 mV – -80 mV között tartottuk, az expresszió függvényében. Az áramregisztrátumot manuális alapvonal korrekciót követően 100 Hz frekvencián szűrtük, majd az *1. egyenlettel* illesztettük,

$$I(t) = I_0 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_{burst}}} \quad (1. \text{ egyenlet})$$

ahol t az idő, τ_{burst} a burst átlagos élettartama, I_0 és $I(t)$ pedig a nulla és a t időpillanatban mért áram nagysága. A kapott τ_{burst} reciprok értéke adja meg a nem-hidrolitikus záródási sebességi együtthatót.

3.5.2. Az intraburst egyensúlyi állandó meghatározása

Az intraburst kinetikai analízis során a makroszkópos relaxációknál leírt kísérletes protokollt alkalmaztuk. Az analízis az áramregisztrátum ATP elvonást követő azon szakaszára korlátozódott, amelyben már csak egy aktív csatorna kapuzott. A membránpotenciál értéke -80 mV (hCFTR), illetve -120 mV (zCFTR) volt. Az analízis kezdőpontja az utolsó előtti csatorna végső záródása volt. A kiválasztott áramregisztrátumokat 100 Hz frekvencián szűrtük, majd automatikus alapvonal korrekciót követően félamplítúdó módszerrel idealizáltuk, mely során a kapuzási események időben rendezett listáját állítjuk elő (azaz egy adott vezetési szinten (0, 1, 2, ...) megszakítás nélkül eltöltött idő reprezentálja az adott eseményt). Az átlagos nyitott állapotban eltöltött időt (τ_{open}) és az átlagos flickery zárt állapotban eltöltött időt

($\tau_{flicker}$) a nyitott illetve zárt állapotban eltöltött tartózkodási idők egyszerű aritmetikai átlagáiként számoltuk. Az intraburst egyensúlyi állandót ($K_{eq|B}$) a 2. *egyenlet* alapján számoltuk.

$$K_{eq|B} = \frac{\tau_{open}}{\tau_{flicker}} \quad (2. \text{ egyenlet})$$

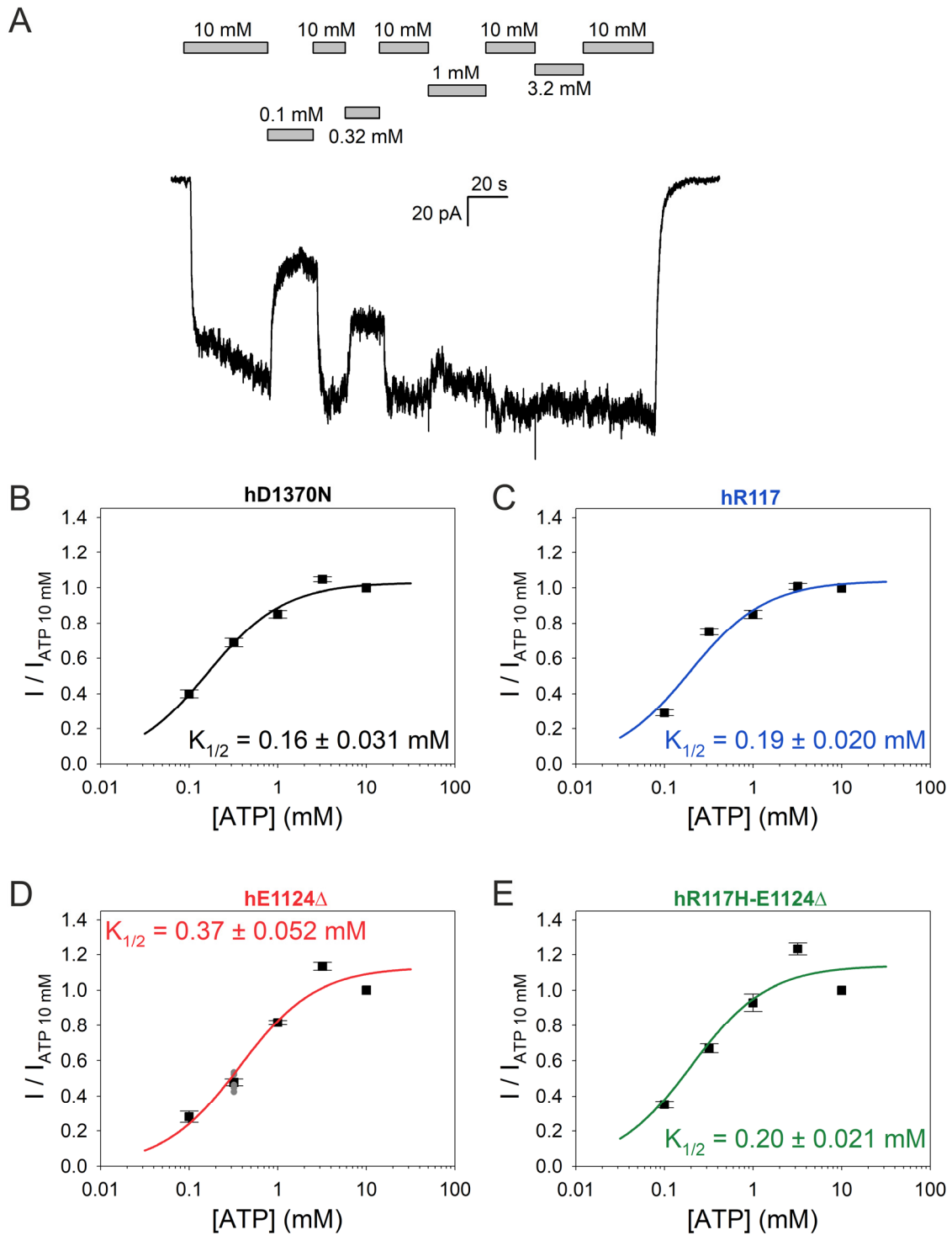
Megjegyzendő, hogy az alacsony intraburst P_o értékkel jellemezhető konstrukciók esetén lehetséges, hogy az utolsó előtti csatornának – az analízis kezdőpontjaként szolgáló – látszólag végső záródása valójában nem a végső záródás, csak az alacsony nyitvatartási valószínűség miatt nem figyelhető meg további szimultán nyitási esemény. Mindazonáltal, egy ehhez hasonló jelenség a P_o hirtelen csökkenését eredményezné az elemzett szegmensen belül (az utolsó előtti aktív csatorna valódi végső záródásakor). Minthogy ilyen jelenséget nem tapasztaltunk; feltételezzük, hogy az elemzett szakaszok nagy részében valóban az utolsó aktív csatorna kapuzását figyeltük meg.

3.5.3. Koncentráció-hatás diagrammok illesztése a Michaelis-Menten egyenlettel

A hD1370N háttérmutáció, valamint eme konstrukcióban elkészített pontmutációk (hR117H, hE1124 Δ , hR117H-E1124 Δ) esetén megvizsgáltuk az ATP dózis-hatás összefüggéseit (3. ábra). Ehhez a kiszakított membránfolt csatornáinak pefoszforilációját követően váltakozva 10 mM (telítési), illetve 3.2, 1, 0.32 vagy 0.1 mM teszt koncentrációkban alkalmazott ATP jelenlétében aktiválódó makroszkópikus áramok egyedi szegmenseinek amplitúdóit vizsgáltuk (3. ábra). Az egyes tesztszegmensekben mért amplitúdókat a teszt előtt és után alkalmazott 10 mM ATP jelenlétében mért áramok átlagához normáltuk. A kapott hányadosokat a Michaelis-Menten egyenlettel illesztettük (3. *egyenlet*)

$$I_{rel} = I_{rel,max} \cdot \frac{L}{L+K} \quad (3. \text{ egyenlet}),$$

ahol L a ligand koncentrációja, I_{rel} a normált áramhányados, $I_{rel,max}$ a normált áramhányados maximális értéke, K a ligand látszólagos affinitása. A mért látszólagos affinitás értékeket a 3. ábra szemlélteti. Az adatok alapján a steady-state mikroszkópikus mérések során alkalmazott 'telítési' ATP koncentrációt 5 mM-ban definiáltuk.



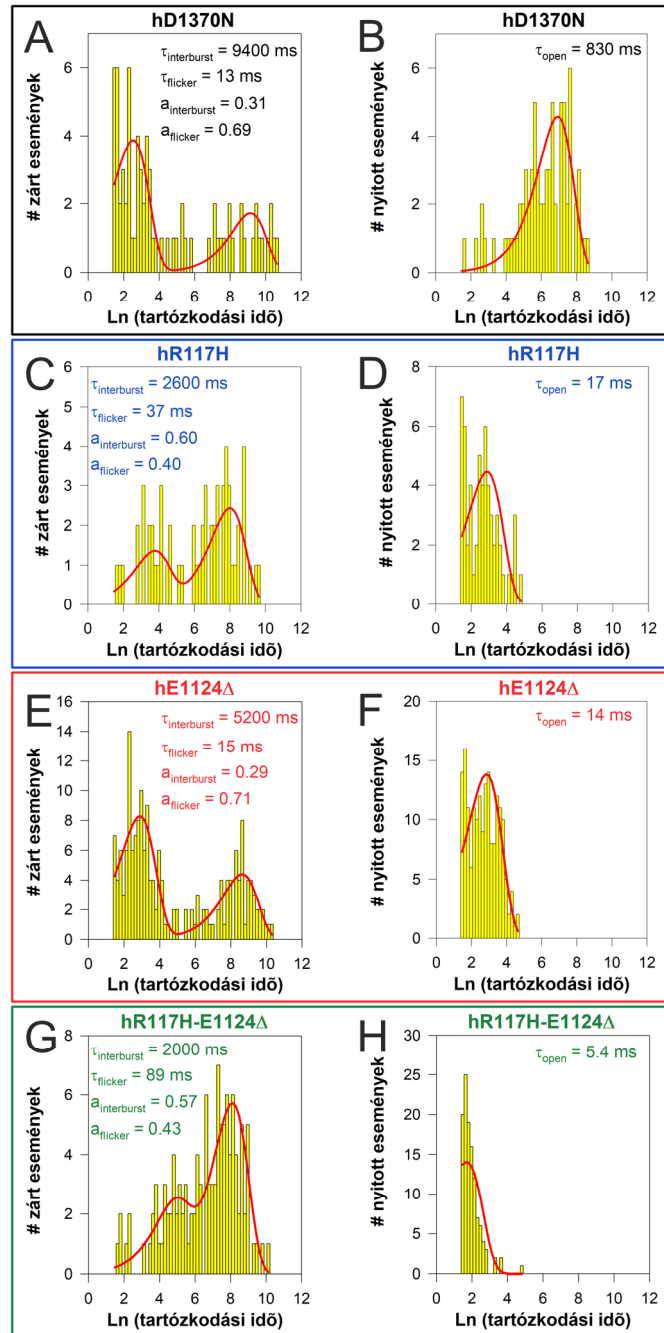
3. ábra A hD1370N konstrukciók telítési ATP koncentrációinak meghatározása. (A) Reprezentatív makroszkopikus áramregisztrátum (hD1370N), mely a különböző ATP koncentrációk esetén (0.1-10) szemlélteti a csatornákon átfolyó áram nagyságát. A membránpotenciál -80 mV volt. (B-E) ATP dózishatás görbék a négy konstrukció esetén a hD1370N háttérben. A relatív áram nagyságát a 10 mM ATP koncentrációra adott válaszhoz képest határoztuk meg ($I/I_{ATP\ 10\ mM}$). Minden mérési pont öt független mérés eredménye, melyet az átlag \pm SEM szemléltet. A kapott mérési pontokból Michealis-

Menten kinetika illesztésével határoztuk meg a látszólagos disszociációs állandót ($K_{1/2}$).

3.5.4. Az egycsatornás mérések elemzése telítési ATP koncentráció mellett

A steady-state mikroszkópikus mérésekhez a kiszakított membránfoltban található csatornákat (hD1370N, - hR117H, - hE1124Δ, -hR117H-hE1124Δ) foszforiláltuk 300 nM PKA-C és 5 mM ATP alkalmazásával, majd a ligand és a kináz elvonását követően a csatornák kapuzását regisztráltuk telítési (5 mM) ATP koncentráció mellett -80 mV membránpotenciál alkalmazásával. Az elemzésre kiválasztott szegmenseket 100 Hz-en történő szűrést és alapvonal korrekciót követően a félamplitúdó módszerrel idealizáltuk. A kapott eseménylistát $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ / $C_{s1} \leftrightarrow C_{s2} \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ / $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_{f1} \leftrightarrow C_{f2}$ modellel illesztettük maximum likelihood módszerrel (4. ábra), majd a (modellfüggő) sebességi együtthatók felhasználásával kiszámoltuk a modellfüggetlen időparamétereket (τ_{burst} , $\tau_{interburst}$, $\tau_{flicker}$, τ_{open}) (66). A véges sáv szélesség okozta torzítás elkerülése végett a $t = 4$ ms alatti eseményeket kizártuk az elemzésből. A modellfüggetlen nyitási és záródási sebességi együtthatókat rendre $1 / \tau_{interburst}$ és $1 / \tau_{burst}$ formában határoztuk meg.

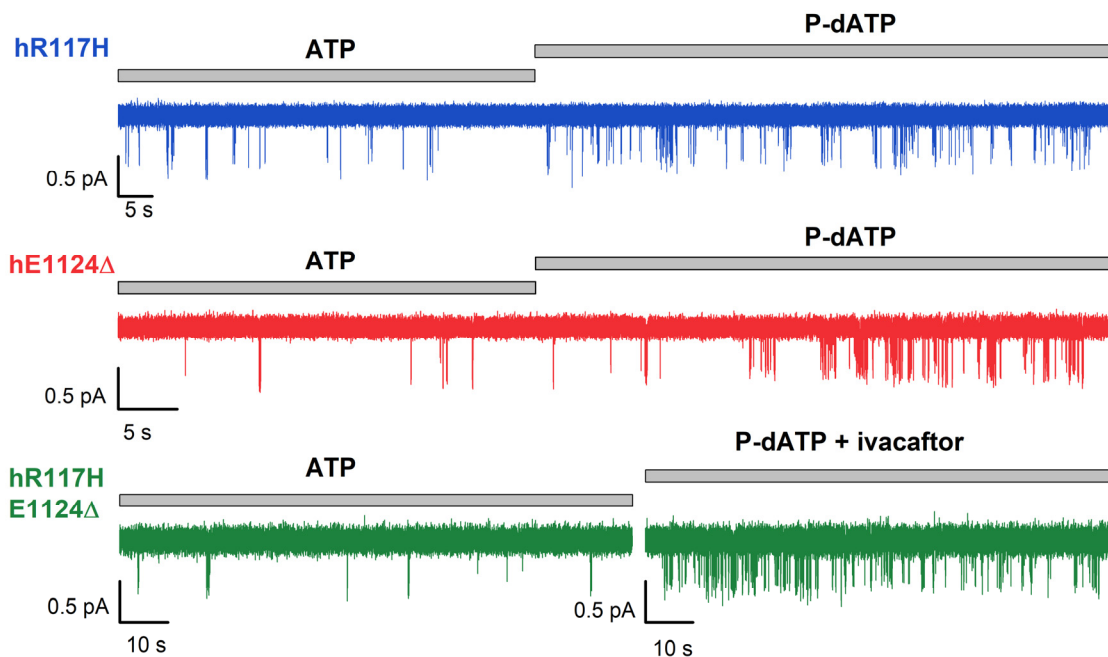
Az illesztést minden esetben először az egyszerűbb modellel végeztük ($C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$), majd vizuálisan ellenőriztük az zárt és nyitott időesemények valós hisztogramjai és a számolt sűrűségfüggvények egyezését (4. ábra). Amennyiben az interburst vagy flickery zárt események több komponensre oszlottak, az adatokat a megfelelő bonyolultabb modellel ($C_{s1} \leftrightarrow C_{s2} \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ / $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_{f1} \leftrightarrow C_{f2}$) is megillesztettük, és a Loglikelihood Ratio Test alapján döntöttünk el, hogy a bonyolultabb modell szignifikánsan jobb illeszkedést biztosít-e. Ez utóbbi esetben a két C_s vagy C_f állapot eseményszámmal súlyozott átlagával számoltunk tovább az elemzés során.



4. ábra A célpozíciók esetén kapott 'steady-state' tartózkodási idő eloszlások a hD1370N konstrukciókban. (A, C, E, G) A hD1370N, illetve az ebben a háttérben létrehozott konstrukciók egyedi csatornás méréseinek eseménylistáiból létrehozott zárt és (B, D, F, H) nyitott tartózkodási idő hisztogramok (4 ms alsó 'binning' határ). A vörös görbe a tartózkodási idők $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ modellel történt maximum likelihood illesztése, τ_{open} , τ_{flicker} , $\tau_{\text{interburst}}$ a számolt időállandók, 'a' a zárt tartózkodási idő hisztogramok két komponensének relatív súlyai.

Az alacsony P_o -val rendelkező mutánsok esetén (szimpla és dupla mutánsok) a kivágott membránfoltban található csatornák számának bizonytalansága miatt az

analizálandó szegmens végén a csatornák számának megbízhatóbb becslése céljából a nyitvatartási valószínűséget a lehetséges maximumra stimuláltuk (50 μ M P-dATP / 50 μ M P-dATP + 10 nM Vx770) (5. ábra). Ezen szegmensek elemzésével az adott szegmensre jellemző nyitási sebességi együttható, valamint a kumulatív nyitvatartási idő összehasonlításán alapuló statisztikai tesztek alkalmazásával megállapítottuk, hogy mely steady-state szegmensek esetén zárható ki 95 %-os konfidenciával egy további, nem észlelt csatorna jelenléte (67). A $p > 0.05$ esetén az adott szakaszt kizártuk az analízisből.



5. ábra A csatornaszám meghatározása az alacsony P_o -val rendelkező mutánsok esetén a P-dATP és ivacaftor okozta stimuláció felhasználásával. A kivágott membránfoltokban található csatornák 5 mM telítési ATP koncentráció jelenlétében regisztrált kapuzását követően a P_o -t 50 μ M P-dATP-vel stimuláltuk, kiegészítve 10 nM ivacaftorral a dupla mutáns esetén. A megfigyelt nyitási sebesség, valamint a kumulált nyitott idő összehasonlításán alapuló statisztikai teszt révén nagy megbízhatósággal zárható ki egy további, nem megfigyelt aktív csatorna mindhárom reprezentatív mérés esetén ($p > 0.012$, $p > 0.03$, $p > 0.003$).

3.5.5. A modellfüggő sebességi együtthatók számítása

A kinetikai analízis során a modellfüggetlen időparaméterek (τ_{burst} , $\tau_{interburst}$, τ_{open} , $\tau_{flicker}$) felhasználásával számoltuk ki a modellfüggő sebességi együtthatókat a

következő egyenletek szerint (68). A $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ modell esetén $k_{C_s \rightarrow O} = 1 / \tau_{\text{interburst}}$, $k_{O \rightarrow C_s} = ((\tau_{\text{flicker}} / \tau_{\text{open}}) + 1) / (\tau_{\text{burst}} + \tau_{\text{flicker}})$, $k_{O \rightarrow C_f} = ((\tau_{\text{burst}} / \tau_{\text{open}}) - 1) / (\tau_{\text{burst}} + \tau_{\text{flicker}})$, $k_{C_f \rightarrow O} = 1 / \tau_{\text{flicker}}$. A $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$ modell esetén pedig $k_{O \rightarrow C_f} = 1 / \tau_{\text{open}}$, $k_{C_f \rightarrow O} = (\tau_{\text{burst}} - \tau_{\text{open}}) / (\tau_{\text{flicker}} * (\tau_{\text{burst}} + \tau_{\text{flicker}}))$, $k_{C_f \rightarrow C_s} = ((\tau_{\text{open}} / \tau_{\text{flicker}}) + 1) / (\tau_{\text{burst}} + \tau_{\text{flicker}})$, $k_{C_s \rightarrow C_f} = (\tau_{\text{burst}} + \tau_{\text{flicker}}) / ((\tau_{\text{burst}} - \tau_{\text{open}}) * \tau_{\text{interburst}} - 2 * \tau_{\text{flicker}} * (\tau_{\text{burst}} + \tau_{\text{flicker}}))$.

3.6. Termodinamikai mutáns ciklus

Egy vizsgált pozíciópár kölcsönhatási energiájának a különféle kapuzási állapotok közötti változását termodinamikai mutáns ciklusok alkalmazásával határoztuk meg, korábban ismertetett protokoll alapján (69, 70). Röviden, a háttérkonstrukció, a két vizsgált célpozíció szimpla mutánsai, valamint a duplamutáns egy termodinamikai ciklus négy sarkát alkotják, amelynek egy-egy oldala reprezentálja azokat az energetikai változásokat, amelyeket az adott mutáció adott háttérbe történő bevitele okoz (6. ábra). Ennek megfelelően, egy $S_1 \leftrightarrow T^\ddagger \leftrightarrow S_2$ kapuzási séma esetén a következőképpen határoztuk meg a kölcsönhatási energia változásait. Az átmeneti (T^\ddagger) és kiindulási (S_1) állapot egymáshoz viszonyított stabilitásának egy adott pozíció mutációja okozta változását a

$$\Delta\Delta G_{T^\ddagger \rightarrow S_1}^0 = -kT \ln \left(\frac{r'_{12}}{r_{12}} \right) \quad (4. \text{ egyenlet})$$

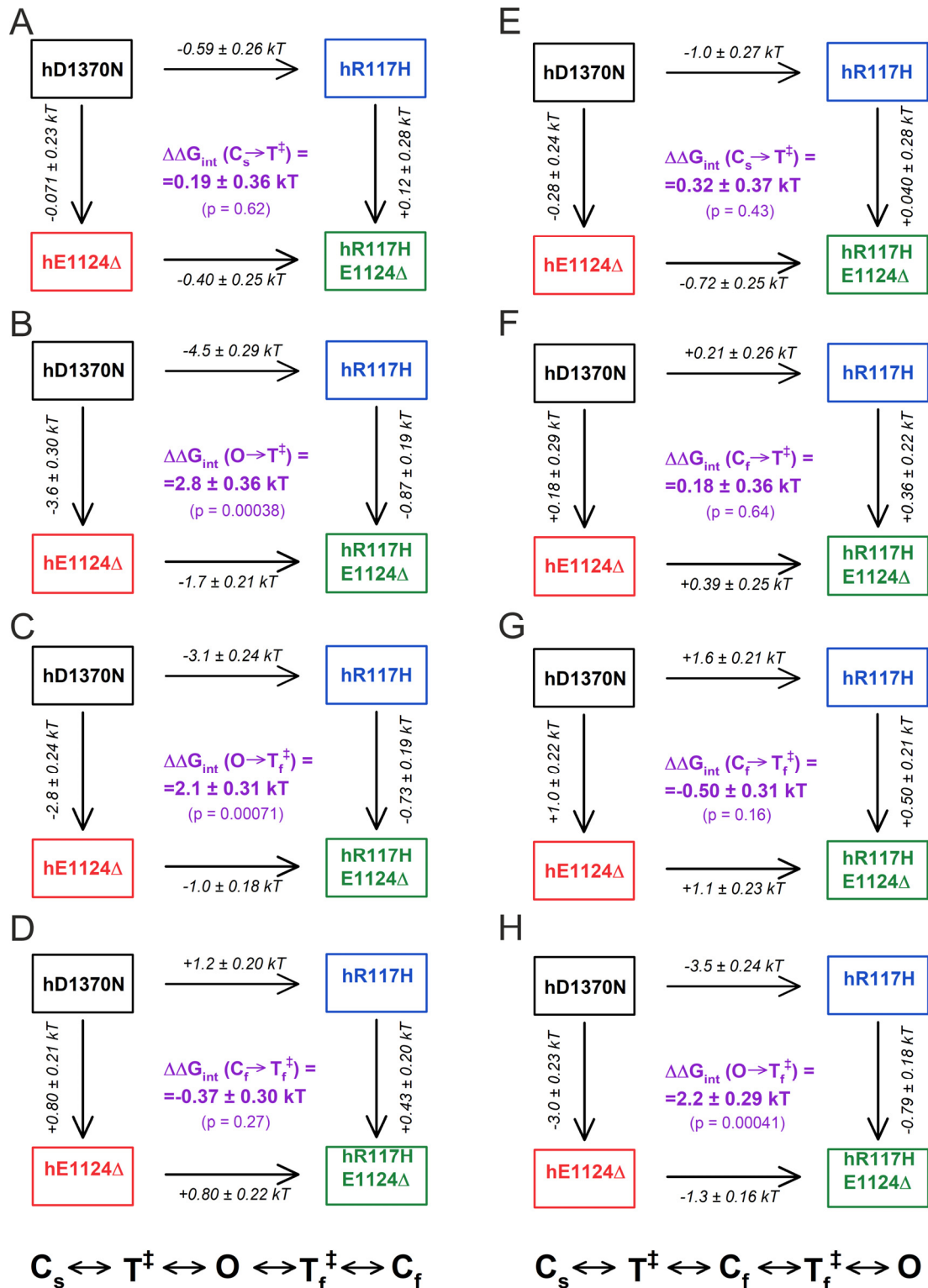
egyenlet révén határoztuk meg, ahol k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet, r'_{12} és r_{12} pedig rendre a mutáns és a háttér konstrukciók sebességi állandói (6. ábra).

A két alapállapot egymáshoz viszonyított stabilitásának egy adott pozíció mutációja okozta változását a

$$\Delta\Delta G_{S_2 \rightarrow S_1}^0 = -kT \ln \left(\frac{K'_{eq}}{K_{eq}} \right) \quad (5. \text{ egyenlet})$$

alkalmazásával határoztuk meg, ahol K'_{eq} és K_{eq} rendre a mutáns és a háttér konstrukció egyensúlyi állandója az $S_1 \leftrightarrow S_2$ lépés során. A kölcsönhatási energia változását az adott kapuzási lépés során ($\Delta\Delta G_{\text{int}}$) a mutáns ciklus két párhuzamos oldalát leíró $\Delta\Delta G^0$ értékek különbsége adja meg. Amennyiben a vizsgált pozíciók között nincs kölcsönhatás, vagy a kölcsönhatás erőssége nem változik az adott kapuzási lépés során, akkor a mutációk hatásai a $\Delta\Delta G^0$ értékére additívak, tehát $\Delta\Delta G_{\text{int}} \sim 0$. Ezzel szemben, a 0-tól szignifikánsan eltérő $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ érték állapotfüggő kölcsönhatást jelez, és egyben számszerűsíti annak erősségét. A $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ értékek hibáját az integrál másodrendű

közelítésével becsültük, feltételezve, hogy r_{ij} és K_{eq} normális eloszlású valószínűségi változók.



6. ábra Mikroszkopikus sebességi együtthatókra épített mutáns ciklusok két különböző kapuzási séma esetén. (A-H) Termodinamikai mutáns ciklusok, amelyek a mutációk szabadentalpiáigátakra gyakorolt hatásait ($\Delta\Delta G^\circ$; számok a nyilakon) szemléltetik a

$C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ (A-D) illetve $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$ (E-H) kapuzási sémák egyes lépéseire (k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet). A mutáns ciklusok sarkai a h117-es és h1124-es pozíciókba bevitt mutációkat szemléltetik, a kölcsönhatási energia változását ($\Delta\Delta G_{int}$) a lila szám adja meg, amelyet a párhuzamos oldalak $\Delta\Delta G^\circ$ értékeinek különbségeként határoztunk meg. Kapuzási lépések: $C_s \rightarrow O$ (A), $O \rightarrow C_s$ (B), $O \rightarrow C_f$ (C), $C_f \rightarrow O$ (D); $C_s \rightarrow C_f$ (E), $C_f \rightarrow C_s$ (F), $C_f \rightarrow O$ (G), $O \rightarrow C_f$ (H).

3.7. A szabadentalpia profilok számítása

A csatorna kapuzását leíró standard szabadentalpia profil létrehozásához az adott alapállapotok közötti $\Delta\Delta G^0$ értékét számoltuk ki. A $C_s - B$ átmenet esetén a

$$\Delta\Delta G_{C_s \rightarrow B}^0 = -kT \ln \left(\frac{\tau_{burst}}{\tau_{interburst}} \right) \quad (6. \text{ egyenlet})$$

6. egyenlet, míg a $C_f - O$ átmenet esetén a

$$\Delta\Delta G_{C_f \rightarrow O}^0 = -kT \ln \left(\frac{\tau_{open}}{\tau_{flicker}} \right) \quad (7. \text{ egyenlet})$$

7. egyenlet alkalmazásával, amelyekben k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet, τ_{burst} , $\tau_{interburst}$, τ_{open} , $\tau_{flicker}$, pedig a meghatározott időparaméterek. Az energiagát magasságának abszolút értékét nem határoztuk meg, az egymáshoz viszonyított magasságukat ugyanakkor arányosan ábrázoltuk a következő módszer alapján. Az egyazon állapotból kivezető két átmeneti állapot magasságbeli különbségét a 8. egyenlet alapján számoltuk ki,

$$\Delta\Delta G_{T_1^\ddagger - T_2^\ddagger}^0 = -kT \ln \left(\frac{r_1}{r_2} \right) \quad (8. \text{ egyenlet})$$

ahol k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet, r_1 és r_2 pedig az adott állapotból kivezető sebességi állandók értékei. Hasonlóan számoltuk a különböző konstrukciók egy adott átmeneti állapothoz tartozó energiagátjainak egymáshoz viszonyított magasságát, ilyenkor r_1 és r_2 rendre a két különböző konstrukció sebességi együtthatója az adott kapuzási lépésre vonatkozóan.

3.8. Szekvencia illesztés

A különböző CFTR ortológok szekvenciáit a BLAST algoritmus alkalmazásával gyűjtöttük össze, adatbázisként a nem redundáns fehérje adatbázist, templátként a humán CFTR fehérje szekvenciáját választva. Az így kapott szekvenciák közül manuális szelekciót alkalmazva eltávolítottuk a duplikátumokat, valamint a

csonka vagy valószerűtlenül hosszúnak vélt ortológokat. Az így kapott minta szekvenciaillesztését ClustalW algoritmussal végeztük (Mega X programcsomag) (60).

3.9. Homológia-modellezés és szerkezetelemzés

Az egyes pontmutációk homológia-modellezéséhez (zR118H, hI119N) a Missense3D programcsomagot választottuk (71), templátként a z/hCFTR IF és OF szerkezeteit (33, 34, 37) alkalmaztuk. A szerkezetek, valamint a kísérletesen meghatározott elektronsűrűség térképek elemzését a Pymol, illetve a Coot programcsomaggal végeztük (72).

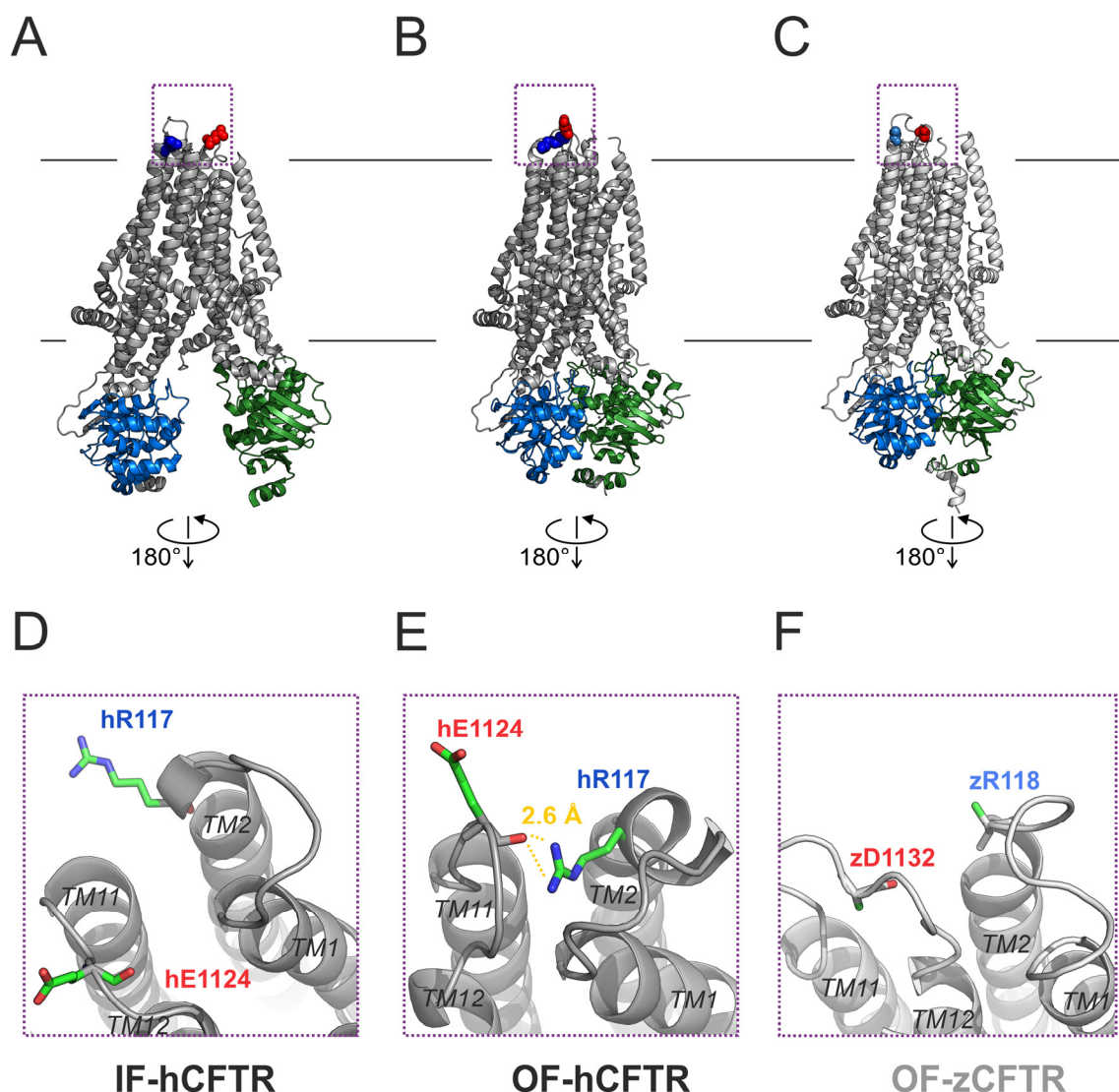
3.10. Statisztika

Az adatokat azok átlaga és az átlag hibája szemlélteti (átlag \pm SEM). Az átlag hibáját minden származtatott paraméter esetén valószínűségi változók hibaterjedése alapján határoztuk meg. Mindegyik meghatározott mennyiség legalább 4 független mérés eredménye. A p érték számítása kétoldali t-próbával történt, a különbséget $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

Ezen fejezetben ismertetjük kutatásunk során elért eredményeinket, elsőként az R117H mutáció kórélettanára (52), majd a humán és a zebrahal ortológok extracelluláris régióinak különbségeire (63) fókuszálva.

4.1. Szerkezeti különbségek a hR117 / zR118 pozíciót illetően a humán és zebrahal ortológokban



7. ábra A hR117 oldallánc és a hE1124 peptidgerinc karbonil-csoport között H-kötés figyelhető meg az OF-hCFTR szerkezetben, amely nem látható sem az IF-hCFTR, sem az IF/OF-zCFTR szerkezetekben. (A-C) A teljes fehérjék, az IF-hCFTR (A, PDB: 5UAK), OF-hCFTR (B, PDB: 6MSM) és az OF-zCFTR (C, PDB: 5W81), térszerkezetei.

Az extracelluláris célpozíciók golyó ábrázolással (kék: hR117 / zR118, piros: hE1124 / zD1132), szinkódolás az 1. ábra alapján. (D-F) Az extracelluláris régió (lila négyzet) közeli, 180°-os elfordítású ábrázolása az IF-hCFTR (D), OF-hCFTR (E) és OF-zCFTR (F) esetén. Szinkódolás az (A-C) panelek, illetve 1. ábra alapján, a megfigyelhető H-kötéseket sárga szaggatott vonalak szemléltetik, az egyes transzmembrán hélixek (TM1/2/11/12) az ábrán jelölve.

Elsőként megvizsgáltuk a közelmúltban krioelektron-mikroszkópiával feltárt szerkezetek extracelluláris régióját (7. ábra). Azt találtuk, hogy az OF-hCFTR szerkezetben (34) az ECL1 hurokban elhelyezkedő hR117 oldallánc H-kötést (2.6 Å) alakít ki az ECL6 hurokban elhelyezkedő hE1124 aminosav peptidgerincen található karbonil-csoportjával (7. ábra). Ezen H-kötés ugyanakkor nem figyelhető meg az IF-hCFTR szerkezetben (37), amelyben a távolság a kötést kialakító partnerek között túl nagy (> 16 Å) egy H-kötés kialakításához (7. ábra). Bár az OF-zCFTR szerkezetben (33) a zR118 oldalláncot egy alanin oldallánc szemlélteti (7. ábra), vélhetően az extracelluláris régió alacsonyabb felbontása és / vagy az arginin oldallánc megnövekedett mozgékonyasága miatt, meglepő módon a Missense3D program által modellezett zR118 oldallánc és a zD1132 peptidgerinc karbonil-csoportja közötti távolság jóval meghaladja (> 8 Å) egy potenciális H-kötés által áthidalható távolságot (7. ábra).

4.2. A hR117H mutáció molekuláris patomechanizmusának vizsgálata

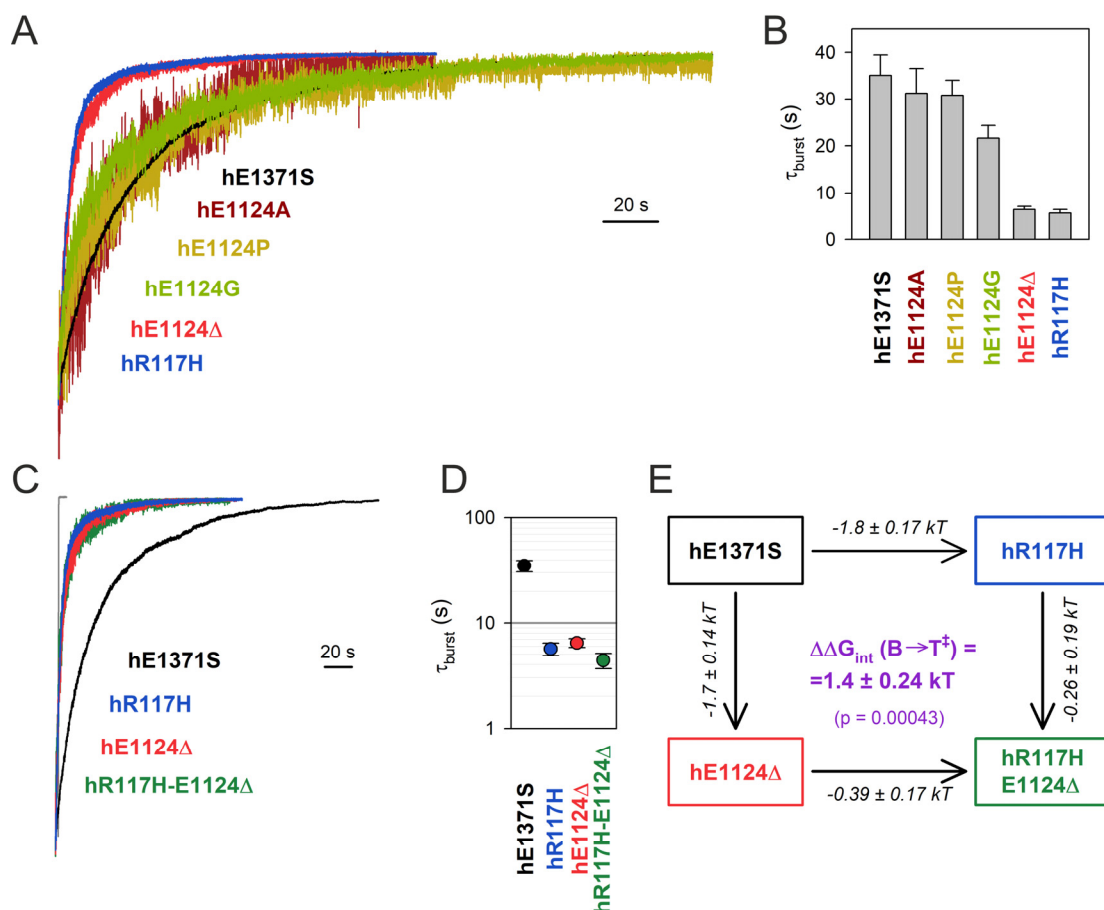
Az előző fejezetben bemutatott megfigyelések alapján azt feltételeztük, hogy a hR117 – hE1124 kölcsönhatás stabilizálja a nyitott konformációt. Minthogy a kísérletesen meghatározott elektronsűrűség térkép az extracelluláris régióban kevésbé részletes, ezen feltevés funkcionális igazolása végett makroszkópikus és mikroszkópikus inside-out patch-clamp méréseket hajtottunk végre, amelyek a következő fejezetekben kerülnek bemutatásra.

4.2.1. A hE1124Δ mutáns hR117H-szerű fenotípussal jellemezhető

A hE1371S nem-hidrolitikus háttérmutáció alkalmazása megakadályozza az ATP hidrolízist, így a csatorna záródása csak a prehidrolitikus NBD dimer spontán

disszociációja révén valósulhat meg, azaz a záródási sebesség csak az NBD-dimer stabilitásától függ (34). Ezen mutáció egyrészt a ciklikus kapuzást egy reverzibilis $C_s - B$ átmenetre egyszerűsíti, másrészt a $\tau_{burst} \sim 100$ -szoros megnyúlását eredményezi, amelynek köszönhetően τ_{burst} , illetve a nem-hidrolitikus záródási sebességi együttható (k_{nh}), értéke a makroszkópos áramregisztrátumokban ATP elvonás esetén megfigyelhető áramrelaxáció exponenciális illesztésével egyszerűen meghatározható (55, 58). Ezt a módszert alkalmazva, megvizsgáltuk a h117-es illetve h1124-es célpozíciókba bevitt mutációk záródási sebességre gyakorolt hatását (8. ábra). A h117-es pozíció esetén a CF-et okozó hR117H mutációt, míg a h1124-es pozíció esetén az oldalláncot, valamint az aminosav teljes delécióját érintő pontmutációkat is teszteltünk a feltételezett kölcsönhatás megzavarása céljából. A hR117H mutáció a háttér konstrukcióhoz képest (hE1371S) jelentősen felgyorsította a csatornák záródását (8. ábra, fekete és kék), azaz lecsökkentette τ_{burst} értékét (8. ábra, fekete és kék), reprodukálva az irodalomban leírtakat (56). Ezzel szemben, a hE1124 oldallánc pontmutációi (hE1124A, hE1124P, hE1124G) nem, vagy csak kis mértékben befolyásolták a csatornák záródási sebességét, azaz τ_{burst} értékét (8. ábra, barna, okkersárga és zöld). Az ECL6 hurok rövidítése (deléciós mutáns, hE1124 Δ) ugyanakkor a hR117H mutációhoz hasonlóan nagy mértékben megnövelte a csatornák záródási sebességét, azaz lecsökkentette τ_{burst} értékét (8. ábra, piros). A feltételezett kölcsönhatásnak a h1124-es pozíció oldaláról történő megzavarására tehát a deléciós mutánst választottuk.

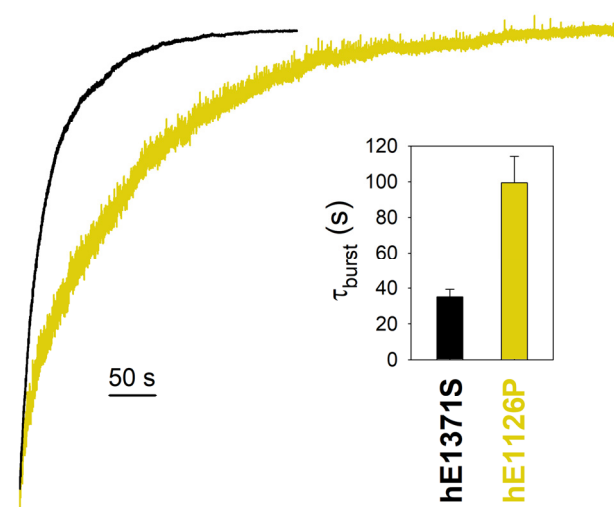
Fontos leszögezni, hogy a fehérjékben egy-egy oldallánc akár több kölcsönhatásban is részt vehet, így egy adott pozíció perturbációja a fehérje teljes intramolekuláris kölcsönhatás-hálózatára hatást gyakorolhat. Termodinamikai mutáns ciklusok alkalmazásával (32, 70) azonban a perturbáció cél-kölcsönhatásra gyakorolt hatása elkülöníthető a többi, cél-kölcsönhatástól független, hatásaitól. A módszer lényege, hogy az adott háttérkonstrukcióban a szimpla mutánsok mellett a mindkét szimpla mutációval rendelkező dupla mutáns létrehozása révén kvantitatív módon vizsgálható a két pozícióba bevitt mutációk hatásainak energetikai additivitása, amelyből meghatározható a célpozíciók kölcsönhatási energiájának változása ($\Delta\Delta G_{int}$) két állapot ($S_1 - S_2$) között (69).



8. ábra A hE1124Δ mutáns a hR117H mutációhoz hasonló fenotípussal jellemezhető. (A, C) ATP elvonás hatására végbemenő makroszkópos áramrelaxációk regisztrátumai, inside-out konfigurációban. A membránpotenciál -20 mV (hE1124A/P/G), -40 mV (hE1371S) illetve -80 mV (hR117H, hE1124Δ, hR117H-hE1124Δ) volt. Az áramgörbék amplitúdóit a $t = 0$ s időpillanatban felvett értékekkel normalizáltuk. Időskála az ábrán található, az egyes konstrukciókat színekkel különbözteti meg. Az oldatcsere sebességét a békapetesejt natív kloridion csatornáinak Ca^{2+} elvonására bekövetkező záródása szemlélteti (C, szürke áramgörbe). (B, D) Az áramrelaxációk egyszerű exponenciális egyenlettel történő illesztésével kapott τ_{burst} értékek oszlopdiagramként (B), valamint logaritmusos skálájú pontdiagramként (D) ábrázolva. Az adatokat átlag \pm SEM értékek jellemzik, amelyek 6-10 mérés eredményei. (E) Termodinamikai mutáns ciklus, amely a $B \rightarrow C_s$ lépés szabadentalpia gát magasságának mutáció- okozta változásait ($\Delta\Delta G^\circ$) szemlélteti ($\Delta\Delta G^\circ_{T^\ddagger-B}$ a számok a nyilakon, k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet). Minden sarok a h117-es illetve h1124-es pozíciók egy-egy mutációját szemlélteti a hE1371S háttérben. $\Delta\Delta G_{\text{int}}(B \rightarrow T^\ddagger)$ értékét (lila szám) a párhuzamos oldalak $\Delta\Delta G^\circ$ értékeinek különbségeként definiáltuk.

Ha a két pozíció közt nincs kölcsönhatás, vagy a kölcsönhatás erőssége nem változik S_1 és S_2 állapot között, akkor a két szimpla mutáció energetikai hatása a duplamutánsban additívan jelentkezik, s így $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ értéke közelít a nullához. Ha

azonban a kölcsönhatás energiája változik S_1 és S_2 állapotok között, akkor egy adott célpozíció mutációjának energetikai hatása nem független a másik célpozíció aktuális kémiai természetétől, azaz a két szimpla mutáció hatása nem lesz energetikailag additív a duplamutánsban. Ezt a gondolatmenetet alkalmazva megvizsgáltuk a duplamutáns (hR117H – hE1124 Δ) makroszkópos relaxációját (8. ábra, zöld mérés), és egyszerű exponenciális illesztés révén meghatároztuk τ_{burst} értékét (8. ábra, zöld). Míg a hE1371S konstrukcióhoz képest a hR117H mutáció τ_{burst} értékét az $\sim 1/5$ -ére csökkentette (8. ábra, kék és fekete), addig az E1124 Δ háttérben ugyanezen mutáció τ_{burst} értékét csupán $\sim 2/3$ -ára csökkentette (8. ábra, piros és zöld), azaz a két szimpla mutáció hatása nem volt energetikailag additív. A kölcsönhatási energia termodinamikai mutáns ciklus alkalmazásával (8. ábra) kiszámolt változása (8. ábra, lila szám) szignifikánsan különbözik a nullától ($p = 0.00043$), és értéke ($\Delta\Delta G_{int}(B \rightarrow T^\ddagger) = 1.4 \pm 0.23$ kT) összehasonlítható egy H-kötés átlagos energiájával (2-3 kT). Ezzel igazoltuk, hogy a B állapotban a hR117 oldallánc H-kötést hoz létre a hE1124 peptid-karbonil-csoportjával, amely a $B \rightarrow C_s$ lépés során a T^\ddagger állapotban felbomlik.



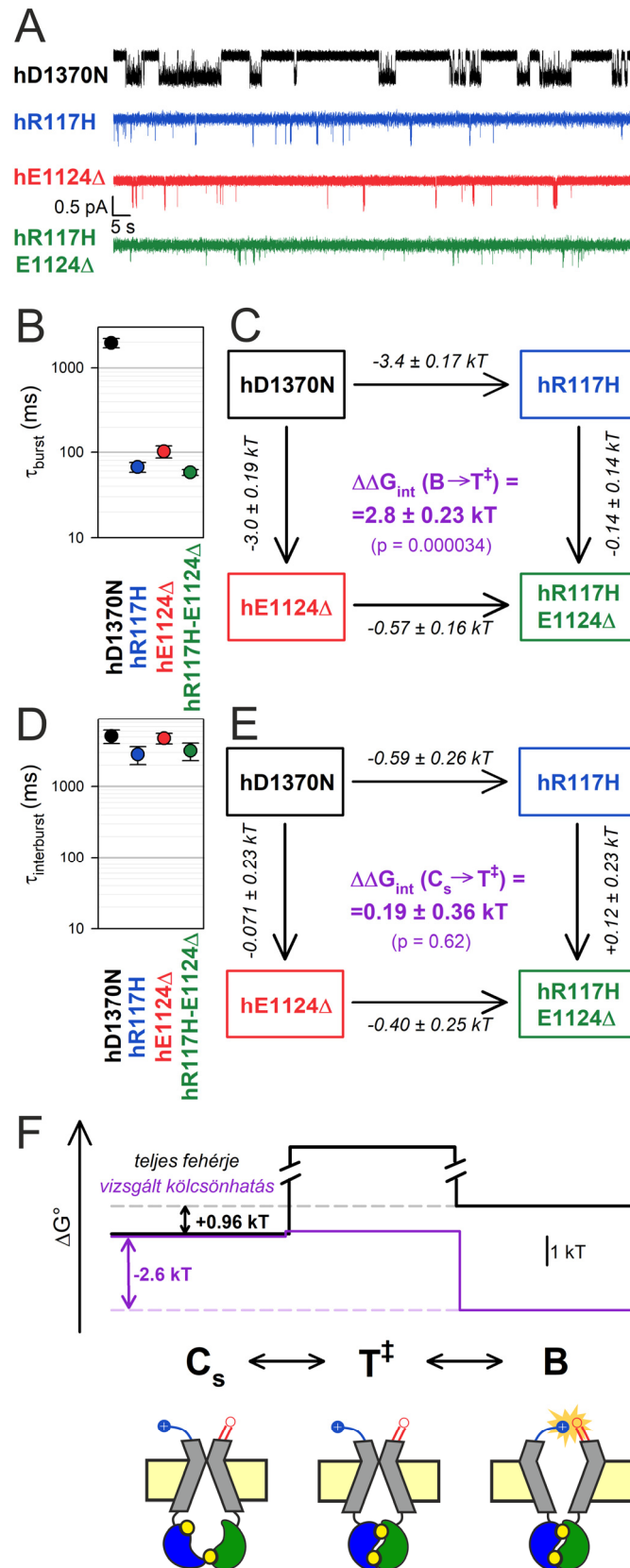
9. ábra A hE1126P mutáció hatása a CFTR ioncsatornák záródási sebességére. ATP elvonás hatására végbemenő makroszkópos áramrelaxáció regisztrátuma inside-out konfigurációban. A membránpotenciál -20 mV (hE1126P) és -40 mV (hE1371S) volt, az áramamplitúdókat a $t = 0$ s időpillanatban felvett értékükkel normalizáltuk. Időskála az ábrán található, az egyes konstrukciókat színekkel különbözteti meg. Az áramrelaxációk exponenciális illesztése révén kapott τ_{burst} értékeket oszlopdiagramként ábrázoltuk. Az adatokat átlag \pm SEM értékek jellemzik, amelyek 5-6 mérés eredményei.

Mivel a perfúziós kamrában az oldatcsere sebessége korlátozhatja a csatornák záródási sebességét, kontrollként megvizsgáltuk a békapetesejt natív Ca^{2+} -aktivált Cl^- ion csatornáinak közismerten gyors záródási sebességét melynek mért értéke alsó becslést ad az oldatcsere sebességére (8. ábra, szürke). Megillesztve a mért áramregisztrátumokat, a natív kloridionáram relaxációs időállandója ~ 100 ms körüli érték volt, ami felülről becsüli az oldatcsere időállandóját. Így a dupla mutáns esetén meghatározott τ_{burst} értéket az oldatcsere sebessége nem torzította.

Egy korábbi tanulmányban arra a következtetésre jutottak, hogy a hR117 oldallánc a hE1126 glutamát oldalláncával hat kölcsön, és ez az ECL1-ECL6 kölcsönhatás stabilizálja az ioncsatorna nyitott állapotát (73). Megvizsgálva e lehetőséget, létrehoztuk a hE1126P mutációt, azonban τ_{burst} értéke nemhogy nem csökkent, de közel háromszorosára nőtt (9. ábra, sárga és fekete). Ez egyértelműen kizárja annak lehetőségét, hogy az E1126 oldallánc legyen a hR117 oldallánc kölcsönható partnere.

4.2.2. A hR117-E1124 kölcsönhatás stabilizálja a B állapotot, de nem jön létre a C_s állapotban

A hR117-E1124 kölcsönhatás tehát létrejön a B állapotban és megszűnik a T^\ddagger állapotban, ugyanakkor azonban eddigi adatainkból nem állapítható meg, hogy a C_s állapotban kialakul-e; azaz, hogy a kölcsönhatás megzavarásával változik-e az interburst átlagos élettartama ($\tau_{\text{interburst}}$) illetve a csatornák nyitási sebessége. Mivel a hE1371S nem-hidrolitikus háttérmutáció igen megnyújtja τ_{burst} értékét, egyedi csatornás steady-state mérésekből reprezentatív számú számú burst-interburst esemény csak rendkívül hosszú mérésekből lenne nyerhető, így a hE1371S konstrukció nem alkalmas $\tau_{\text{interburst}}$ értékének meghatározására. Ezért a kérdés megválaszolásához a hD1370N nem-hidrolitikus háttérmutációt alkalmaztuk (51, 54), amelynek hatására τ_{burst} értéke csak ~ 10 -szeresére nő a WT csatornákéhoz képest.



10. ábra A célpozíciók közti H-kötés csak a B állapotban jön létre. (A) Egyedi csatornás mérések 5 mM ATP alkalmazása mellett az egyes konstrukciók esetén (szinkódolva) a hD1370N háttérben. A membránpotenciál -80 mV volt, idő és amplitúdó skála az ábrán.

(B, D) A tartózkodási idők elemzése révén nyert τ_{burst} és $\tau_{interburst}$ értékek, amelyeket az átlag \pm SEM szemléltet logaritmikus skálán 5-8 független mérés eredményeként. (C, E) Termodinamikai mutáns ciklusok, amelyek (C) a $B \rightarrow C_s$, illetve (E) a $C_s \rightarrow B$ lépés szabadentalpia gát magasságainak mutáció- okozta változásait ($\Delta\Delta G^\circ$) szemléltetik ($\Delta\Delta G^\circ_{T^\ddagger-B}$ illetve $\Delta\Delta G^\circ_{T^\ddagger-C_s}$ a számok a nyilakon, k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet). Minden sarok a h117-es és h1124-es pozíciók egy-egy mutációját szemlélteti a hD1370N háttérben. $\Delta\Delta G_{int}(B \rightarrow T^\ddagger)$ (C) és $\Delta\Delta G_{int}(C_s \rightarrow T^\ddagger)$ (E) értékeit (lila számok) a párhuzamos oldalak $\Delta\Delta G^\circ$ értékeinek különbségeiként definiáltuk. (F) (Felső panel) A teljes fehérje (fekete) valamint a vizsgált kölcsönhatás (lila) szabadentalpia profilja a $C_s \leftrightarrow B$ átmenet során. (Alsó panel) A $C_s \leftrightarrow T^\ddagger \leftrightarrow B$ folyamat egyes állapotainak vázlatos ábrázolása, színkódolás az 1. ábra alapján. A kék és piros részek rendre a hR117 oldalláncot és hE1124 peptid karbonil csoportot szemléltetik. A sárga csillag a B állapotban a kialakult H-hidat jelképezi.

A hR117H mutációt bevezetve a hD1370N konstrukcióba azt tapasztaltuk, hogy τ_{burst} értéke drasztikusan, mintegy $\sim 1/30$ -ára (10. ábra, kék és fekete), miközben $\tau_{interburst}$ értéke csak $\sim 1/2$ -ére (10. ábra, kék és fekete) csökkent. Továbbá, a hE1124 Δ mutáció ebben a háttérben is a hR117H mutációhoz hasonló fenotípust eredményezett (10A, B, C, kék és piros). Ugyanakkor, ha a hR117H mutációt a hE1124 Δ háttérben hoztuk létre, ennek hatására τ_{burst} és $\tau_{interburst}$ értéke is csak $\sim 1/2$ -ére csökkent (10. ábra, piros és zöld). Azaz τ_{burst} esetén erős kapcsoltság figyelhető meg a két pozíció között, míg $\tau_{interburst}$ esetén a két szimpla mutáció hatása energetikailag additív. Termodinamikai mutáns ciklusok alkalmazásával meghatároztuk a kölcsönhatási energia változását $B \rightarrow T^\ddagger$ és $C_s \rightarrow T^\ddagger$ kapuzási lépések során (10. ábra). A $B \rightarrow T^\ddagger$ lépés esetén a kölcsönhatási energia változása ($\Delta\Delta G_{int}(B \rightarrow T^\ddagger) = 2.8 \pm 0.23$ kT) összehasonlítható egy H-kötés átlagos energiájával (10. ábra, lila szám). Ez arra utal, hogy a B állapotban meglévő h117-h1124 H-híd a T^\ddagger állapotban felbomlik – összhangban a hE1371S nem-hidrolitikus háttérmutáció alkalmazásakor kapott eredményekkel. Ezzel szemben a $C_s \rightarrow T^\ddagger$ lépés esetén a számolt érték ($\Delta\Delta G_{int}(C_s \rightarrow T^\ddagger) = 0.19 \pm 0.36$ kT) nem különbözik szignifikánsan a nullától ($p = 0.62$) (10. ábra, lila szám), azaz a h117-h1124 kölcsönhatás erőssége nem változik a C_s és T^\ddagger állapotok között. Mivel a fentiek alapján a T^\ddagger állapotban a kölcsönhatás nem áll fenn, ugyanez kell igaz legyen a C_s állapotban is.

Megjegyzendő, hogy szemben τ_{burst} -tel, $\tau_{interburst}$ értéke csak az aktív csatornák számának pontos ismeretében becsülhető, így az alacsony P_o -t adó konstrukciók esetén a csatornák stimulálásával (P-dATP + ivacaftor) határoztuk meg a csatornaszámot (5. ábra). Minthogy 'N' darab megfigyelt szimultán csatornanyitás esetén sosem zárható

ki 100%-os biztonsággal egy 'N+1'-edik csatorna jelenléte, így $\tau_{\text{interburst}}$ becsült értéke némi bizonytalanságot hordoz (56).

1. táblázat A telítési ATP koncentráció alkalmazásával regisztrált steady-state méréseket leíró modellfüggetlen paraméterek a hD1370N nem-hidrolitikus háttérmutációt tartalmazó konstrukciókban. Az adatokat az átlag \pm SEM reprezentálja, n értékét minden konstrukció esetén a zárójelben található szám szemlélteti.

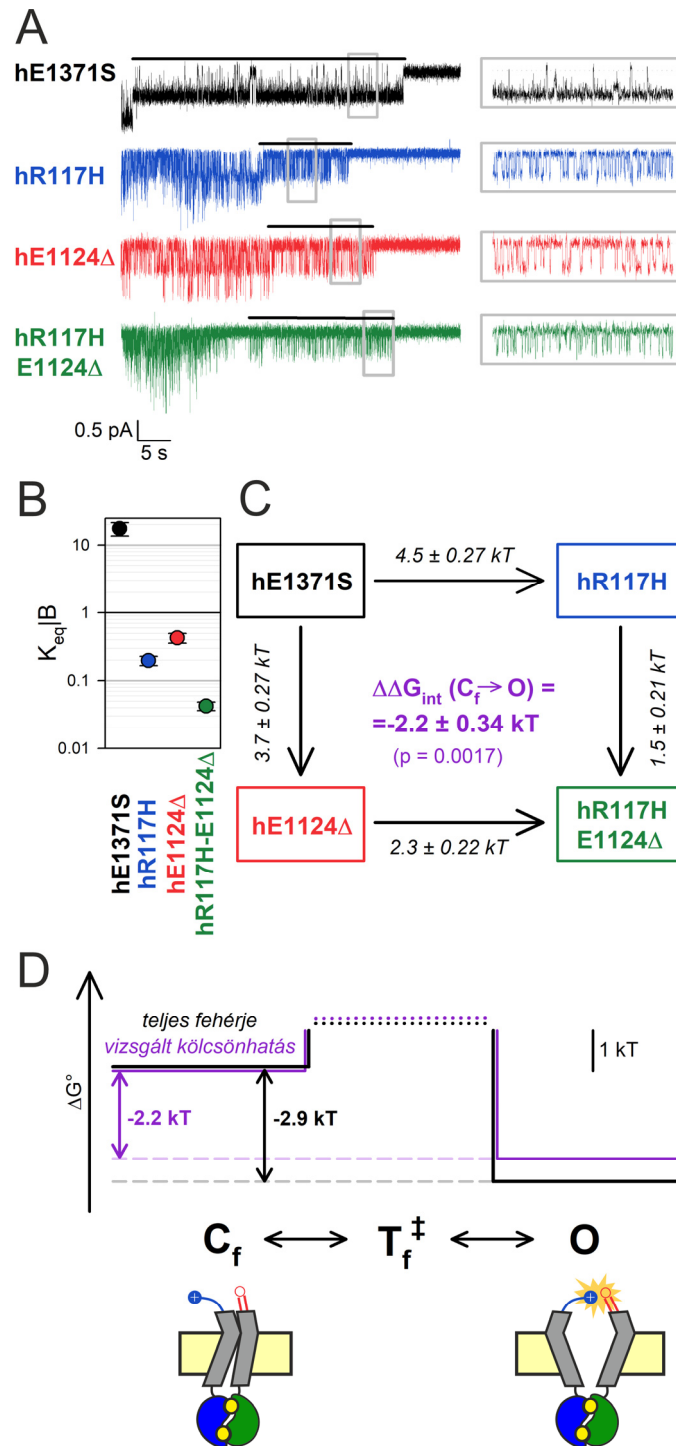
	τ_{burst} (ms)	$\tau_{\text{interburst}}$ (ms)	τ_{flicker} (ms)	τ_{open} (ms)
hD1370N	2000 \pm 250	5100 \pm 1100	10 \pm 1.6	390 \pm 79 (8)
hR117H	67 \pm 8.8	2800 \pm 800	33 \pm 5.0	12 \pm 2.3 (5)
hE1124Δ	100 \pm 16	4800 \pm 810	23 \pm 4.0	19 \pm 3.3 (6)
hR117H-E1124Δ	58 \pm 4.4	3200 \pm 880	50 \pm 7.9	6.6 \pm 1.3 (7)

A kölcsönhatási energiák alapján felépítettük a hR117-E1124 kölcsönhatás szabadentalpia profilját a $C_s \leftrightarrow T^\ddagger \leftrightarrow B$ kapuzási lépések során (10. ábra, lila görbe). Ezt összevetve a teljes CFTR molekula "lassú kapuzásának" ($C_s \leftrightarrow B$) a C_s -B egyensúlyi állandóból ($K_{\text{eq}} = \tau_{\text{burst}} / \tau_{\text{interburst}}$) számított szabadentalpia változásával (10. ábra, fekete görbe) azt találtuk, hogy – bár a teljes csatorna konformációváltozása számos kötés felszakadásával és kialakulásával jár – a fehérje teljes szabadentalpia változása összemérhető a hR117-hE1124 kölcsönhatás szabadentalpia változásával.

Összefoglalva a steady-state mérések eredményét, a hR117-hE1124 kölcsönhatás fennáll a B állapotban, ugyanakkor nem jön létre sem a T^\ddagger , sem a C_s állapotokban.

4.2.3. A B állapoton belül csak az O állapotban jön létre a hR117-hE1124 kölcsönhatás

A B állapot egy kompozit állapot, amely az O és C_f állapotokat foglalja magában. Felmerül tehát a kérdés, hogy a vizsgált kölcsönhatás a C_f alapállapotban is megtalálható, vagy csak az O állapotban fejt ki stabilizáló hatást. Ezen kérdés megválaszolásának céljából úgynevezett 'utolsó aktív csatorna' méréseket végeztünk a hE1371S nem-hidrolitikus háttérmutációt tartalmazó konstrukciókban (51, 56).



11. ábra A hR117-E1124 kölcsönhatás a B állapoton belül csak az O állapotban jön létre. (A) Az ATP elvonását követő utolsó aktív csatorna kapuzásának áramgörbéi a különböző mutánsok (szinkódolva) esetén a hE1371S háttérben. Az áramregisztrátumokon belül az analizált szegmenst fekete vonal szemlélteti. Az ábra jobb oldalán a felnagyított minta szemlélteti, hogy a mutánsokban az intraburst kapuzási egyensúly az O állapottól a C_f állapot felé tolódik. A membránpotenciál -80 mV volt. (B) A burst-ön belüli zárt – nyitott állapotok termodinamikai egyensúlyát az intraburst egyensúlyi állandó ($K_{eq}|B$) értéke szemlélteti, amelyet az átlag \pm SEM reprezentál logaritmikus skálán 5-8 független mérés eredményeként. (C)

Termodinamikai mutáns ciklus, amely a C_f és O alapállapotok szabadentalpia különbségének mutáció-ozokta változásait ($\Delta\Delta G^\circ$) szemlélteti ($\Delta\Delta G^\circ_{O-C_f}$ a számok a nyilakon, k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet). Minden sarok a h117-es és h1124-es pozíciók egy-egy mutációját szemlélteti a hE1371S háttérben. $\Delta\Delta G_{int}(C_f \rightarrow O)$ értékét (lila szám) a párhuzamos oldalak $\Delta\Delta G^\circ$ értékeinek különbségeként definiáltuk. (D) (Felső panel) A teljes fehérje (fekete) valamint a vizsgált kölcsönhatás (lila) szabadentalpia profilja a $C_f \leftrightarrow O$ átmenet során. (Alsó panel) A $C_f \leftrightarrow O$ folyamat egyes állapotainak vázlatos ábrázolása, színkódolás az 1. ábra alapján. A kék és piros részek rendre a hR117 oldalláncot és hE1124 peptid karbonil csoportot szemléltetik. A sárga csillag az O állapotban a kialakult H-hidat jelképezi.

A kiszakított membránfoltban található CFTR ioncsatornákat PKA-C és ATP elegyével foszforiláltuk, majd a kináz és az ATP elvonását követően ATP áramoltatásával és újbóli elvonásával regisztráltuk az utolsó aktív csatorna kapuzását (11. ábra). Mivel ATP hiányában az első C_s eseményt követően a csatorna nem nyit ki többé, illetve a hE1371S mutáció τ_{burst} értékét jelentősen megnyújtja, számos nyitás (O) és flickery záródás (C_f) szelektív megfigyelésére van lehetőség az utolsó aktív csatorna végső záródását megelőzően (C_s). A nagyszámú O és C_f esemény révén definiálható az intraburst egyensúlyi állandó ($K_{eq|B}$), így vizsgálható a kölcsönhatási energia változása a két alapállapot között (2. táblázat).

A hR117H mutáció bevitele a hE1371S háttérbe drasztikusan, mintegy $\sim 1/90$ -ére csökkentette $K_{eq|B}$ értékét (11. ábra, kék és fekete). Ezzel szemben, ha a hR117H mutációt a hasonló fenotípusú hE1124 Δ háttérben (11. ábra, piros) hoztuk létre, akkor $K_{eq|B}$ értéke csupán $\sim 1/10$ -edére csökkent tovább (11. ábra, piros és zöld), azaz a két mutáció energetikai hatása az intraburst egyensúlyi állandóra nem volt energetikailag additív. Termodinamikai mutáns ciklus alkalmazásával meghatároztuk a kölcsönhatási energia változását a C_f és O alapállapotok között, melynek értéke ($\Delta\Delta G_{int}(C_f \rightarrow O) = -2.2 \pm 0,34$ kT) szignifikánsan különbözik a nullától ($p = 0.0017$), s negatív előjele arra utal, hogy a kölcsönhatás fennáll az O állapotban, de nem jön létre a C_f állapotban (11. ábra, lila szám).

Az előzőekhez hasonlóan ismét felépítettük a teljes molekula, valamint a hR117-hE1124 kölcsönhatás szabadentalpia változását a $C_f \rightarrow O$ kapuzási lépés során (11. ábra). Bár a C_f és az O állapot között feltehetően jóval kisebb a konformációs változás, ismét látható, hogy e lépés során a teljes fehérje szabadentalpia változása összemérhető a vizsgált kölcsönhatás szabadentalpia változásával.

2. táblázat Az intraburst kapuzást leíró modellfüggetlen paraméterek a hE1371S nem-hidrolitikus háttérmutációt tartalmazó konstrukcióban. Az adatokat az átlag \pm SEM reprezentálja, n értékét minden konstrukció esetén a zárójelben található szám szemlélteti.

	τ_{flicker} (ms)	τ_{open} (ms)	$K_{\text{eq}} B$
hE1371S	11 \pm 2.3	200 \pm 27	17 \pm 3.9 (5)
hR117H	58 \pm 7.3	11 \pm 1.1	0.20 \pm 0.031 (6)
hE1124Δ	42 \pm 6.0	18 \pm 1.7	0.42 \pm 0.070 (6)
hR117H-E1124Δ	150 \pm 18	6.2 \pm 0.50	0.042 \pm 0.0060 (6)

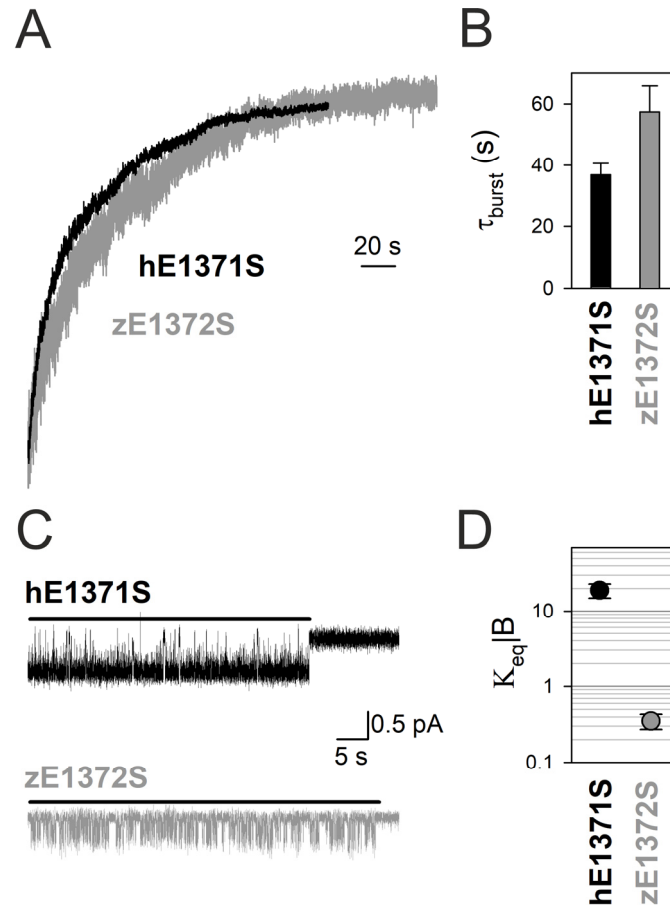
Összefoglalásként elmondható, hogy a hR117 oldallánc egy H-kötést alakít ki a hE1124 pozíció karbonil-csoportjával, amely stabilizálja az O állapotot, de nem jön létre sem a C_s, sem a C_f állapotban. Ezen kölcsönhatás hiánya (hR117H) az O állapot stabilitásának drasztikus csökkenéséhez, és ezáltal CF kialakulásához vezet.

4.3. A zebrahal és a humán ortológ kapuzásának összehasonlítása nem-hidrolitikus háttérben

A hR117 oldallánc és a hE1124 peptidgerinc karbonil-csoport közötti H-kötés tehát stabilizálja az O állapotot a humán ortológban. Mivel ez a H-kötés nem figyelhető meg az OF-zCFTR szerkezetben (33) (7F ábra), feltételeztük, hogy ezen stabilizáló kötés hiánya okozza a két ortológ kapuzásában megfigyelt, korábban közölt különbségeket, azaz a zebrahal ortológnak a humán csatornáéhoz képest csökkent intraburst P_o (és K_{eq}|B) illetve τ_{burst} értékeit a hE1371Q/zE1372Q háttérmutáció jelenlétében (57).

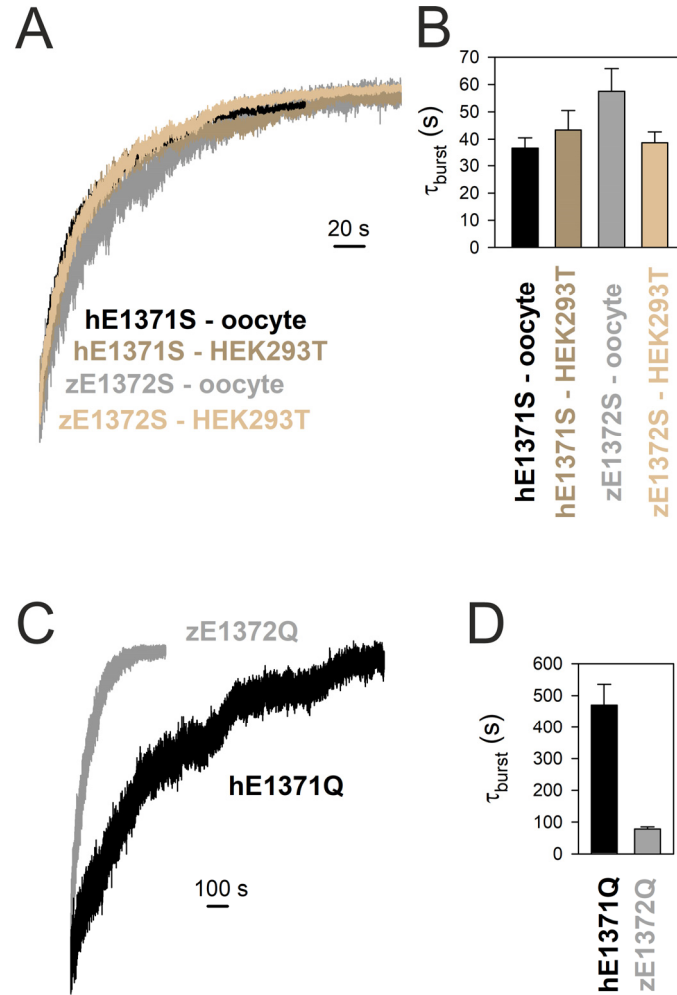
Így az irodalmi adatok megismétlése végett elsőként összehasonlítottuk a két ortológ nem-hidrolitikus τ_{burst} és K_{eq}|B értékeit, a jóval könnyebben kezelhető hE1371S/zE1372S nem-hidrolitikus háttérmutációt alkalmazva. Meglepődve tapasztaltuk, hogy a zE1372S nem-hidrolitikus mutáns τ_{burst} értéke nem volt rövidebb a hE1371S humán ortológénál (12. ábra, fekete és szürke). Ugyanakkor, az irodalmi adatoknak megfelelően (57), a zE1372S csatornák intraburst P_o értéke csak $\sim 1/3$ -a,

$K_{eq|B}$ értéke pedig $\sim 1/55$ -e volt a hE1371S csatornákénak (12. ábra, fekete és szürke). Ebből arra következtettünk, hogy míg a B állapot a két ortológban hasonlóan stabil, az O állapotnak a C_f állapotához viszonyított stabilitása a hCFTR esetén lényegesen magasabb, mint a zCFTR esetén.



12. ábra A zE1372S és hE1371S nem-hidrolitikus mutánsok B állapotainak stabilitása hasonló, míg a $K_{eq|B}$ értéke lényegesen alacsonyabb a zebrahal ortológ esetén. (A) ATP elvonás hatására végbemenő makroszkópos áramrelaxációk regisztrátumai inside-out konfigurációban a hE1371S és zE1372S konstrukciók esetén. A membránpotenciál -20 mV (zE1372S) és -40 mV (hE1371S) volt, az áramamplitúdók a $t = 0$ s időpillanatban felvett értékeikkel normalizáltak. Időskála az ábrán található, az egyes konstrukciókat színek különbözteti meg. (B) Az áramrelaxációk egyszerű exponenciális illesztései révén kapott τ_{burst} értékek oszlopdiagramjai. Az adatokat átlag \pm SEM értékek jellemzi, melyek 7-9 mérés eredményei. (C) Az ATP elvonását követő utolsó aktív csatorna kapuzásának áramgörbéi a hE1371S és zE1372S esetén, a membránpotenciál -80 mV volt. Az áramregisztrátumokon belül az analizált szegmenst fekete vonal szemlélteti. (D) A burst-ön belüli zárt – nyitott állapotok közti termodinamikai egyensúlyt az intraburst egyensúlyi állandó ($K_{eq|B}$) értéke szemlélteti, amelyet az átlag \pm SEM reprezentál logaritmikus skálán 6-12 független mérés eredményeként.

Minthogy az irodalmi adatok emlős (CHO) sejteken végzett kísérletek eredményei (57), az ellentmondás feloldásának céljából először megvizsgáltuk a membránösszetétel τ_{burst} értékére gyakorolt hatását.



13. ábra A nem-hidrolitikus mutációként bevitt oldallánc, valamint a membránösszetétel hatása τ_{burst} értékére. (A,C) ATP elvonás hatására végbemenő makroszkópos áramrelaxációk regisztrátumai inside-out konfigurációban (A) a hE1371S és zE1372S konstrukciók esetén békapetesejt illetve HEK293 expressziós modellrendszerekben, valamint (C) az E-Q nem-hidrolitikus mutáció esetén békapetesejt expressziós rendszerben. A membránpotenciál -20 mV (zE1372S, hE1371Q) illetve -40 mV (hE1371S, hE1371S-HEK293, zE1372S-HEK293) volt, az áramamplitúdók a $t = 0$ s időpillanatban felvett értékeikkel normalizáltak. Időskála az ábrán található, az egyes konstrukciókat színek kódoltan különbözteti meg. (B, D) Az áramrelaxációk egyszerű exponenciális illesztése révén kapott τ_{burst} értékek oszlopdiagramjai. Az adatokat átlag \pm SEM értékek jellemzik, amelyek 4-9 mérés eredményei.

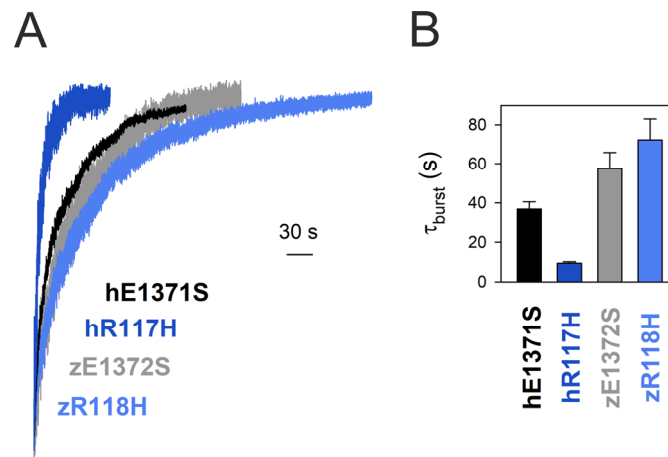
Megismételve a makroszkópos áramrelaxációk regisztrálását HEK293 sejtekből kiszakított membránfoltok alkalmazásával (13. ábra), nem találtunk szignifikáns különbséget a két különböző modellrendszerben (békapete- és HEK293 sejt) mért τ_{burst} értékek között, sem a hE1371S ($p = 0.42$), sem pedig a zE1372S ($p = 0.09$) konstrukció esetén. Ezen adatokból tehát arra következtettünk, hogy a membránösszetétel nem befolyásolja a nem-hidrolitikus záródási sebességet (és τ_{burst} értékét), azaz nincs hatással a B állapot stabilitására.

Mivel az irodalmi adatokat nem az E-S mutáció, hanem az E-Q mutáció alkalmazásával mérték (57), megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy a hE1371/zE1372 pozíció nem-hidrolitikus mutációi (S, Q) oldalláncfüggő módon, ortológ-specifikusan befolyásolják τ_{burst} értékét. E célból a békapetesejtes modellrendszerben létrehoztuk a hE1371Q és zE1372Q mutánsokat, és megvizsgáltuk ezek makroszkópos csatornazáródási sebességeit. Azt tapasztaltuk, hogy a humán ortológban az E-Q mutáns τ_{burst} értéke mintegy ~13-szor hosszabb az E-S mutánséhoz képest (13. ábra, fekete). Ezzel szemben, a zCFTR esetén az E-Q nem-hidrolitikus háttérmutáns τ_{burst} értéke az E-S mutánsénak csupán az ~1.4-szerese (13. ábra, szürke). Feloldva ezzel saját adataink és a zebrahal ortológon végzett korábbi kísérletsorozat közti ellentétet elmondható, hogy míg a hCFTR esetén a glutamin oldallánc nagymértékben stabilizálja a B állapotot a szerin oldallánchoz képest, addig a zCFTR esetén ez a stabilizáló hatás nem jelentkezik, feltehetően az NBD dimerekben fellelhető szerkezeti különbségek okán (33, 34). Minthogy ezen meglepő különbség nem befolyásolja tervezett kísérletsorozatunkat, így a továbbiakban az E-S nem-hidrolitikus háttérmutációt alkalmaztuk mindkét ortológ esetén.

4.4. A zR118H mutáció nem gyorsítja a zebrahal csatornák záródási sebességét

A zCFTR B állapotának stabilitása tehát összehasonlítható a humán ortológ B állapotának stabilitásával. Tekintve, hogy a hR117 oldallánc kulcsfontosságú szerepet tölt be a B állapot stabilitásában, ugyanakkor az OF-zCFTR szerkezetben nem figyelhető meg az ECL1-ECL6 közötti stabilizáló H-kötés (33); két hipotézis merülhet fel. Egyrészt, lehetséges, hogy a zCFTR esetén is létrejön a kölcsönhatás a két aminosav között – ebben az esetben az OF-zCFTR szerkezet nem az O, hanem a C_f állapotot

szemlélteti. Másrészt, ha nem jön létre ez a kölcsönhatás a zebrahal ortológ kapuzása során, akkor feltehetően egy alternatív stratégia révén stabilizálódik a zCFTR B állapota, s ebben az esetben az OF-szerkezet reprezentálhatja akár az O, akár a C_f állapotot.



14. ábra A zR118H mutáció nincs hatással a B állapot stabilitására a zebrahal ortológban. (A) ATP elvonás hatására végbemenő makroszkópos áramrelaxációk regisztrátumai inside-out konfigurációban a hE1371S és zE1372S konstrukciók és mutánsaik esetén. A membránpotenciál -20 mV (zE1372S, zR118H), illetve -40 mV (hE1371S, hR117H) volt, az áramamplitúdók a $t = 0$ s időpillanatban felvett értékeikkel normalizáltak. Időskála az ábrán található, az egyes konstrukciókat szinkód különbözteti meg. (B) Az áramrelaxációk egyszerű exponenciális illesztése révén kapott τ_{burst} értékek oszlopdiagramjai. Az adatokat átlag \pm SEM értékek jellemzik, amelyek 7-9 mérés eredményei.

E kérdés eldöntésének céljából létrehoztuk a zR118H mutációt, az összevethetőség kedvéért a humán szekvenciában is alkalmazott, CF-es betegekben gyakori, R-H mutációt választva. Szemben a humán ortológgal, amelynek záródási sebességét a hR117H mutáció bevezetése drasztikusan növelte, jelezve a B állapot csökkent stabilitását (14. ábra, kék és fekete¹), a zR118H mutáció bevezetése a zE1372S konstrukcióba nem okozott szignifikáns változást τ_{burst} értékében ($p = 0.27$) (14. ábra, halvány kék és szürke). Ebből arra következtethetünk, hogy – bár az arginin oldallánc konzervált a CFTR evolúciós törzsfajlódása folyamán (16. ábra, kék) – a

¹ A 14. ábra humán konstrukcióinak adatai a zebrahal ortológon végzett analóg kísérletekkel párhuzamosan, ugyanazon mérőállomáson, ugyanazon sejtpopulációkon mért adatokat összegzik, így teljesen független adathalmazt képeznek a 8. ábrán korábban bemutatott hasonló adatoktól.

zR118 és zD1132 aminosavak között nem jön létre a B (és O) állapotot stabilizáló H-kötés. Minthogy a két ortológ B állapotainak stabilitása összemérhető (13A-B ábra), a zebrahal ortológ B állapota feltehetően egy alternatív stratégia révén stabilizálódik.

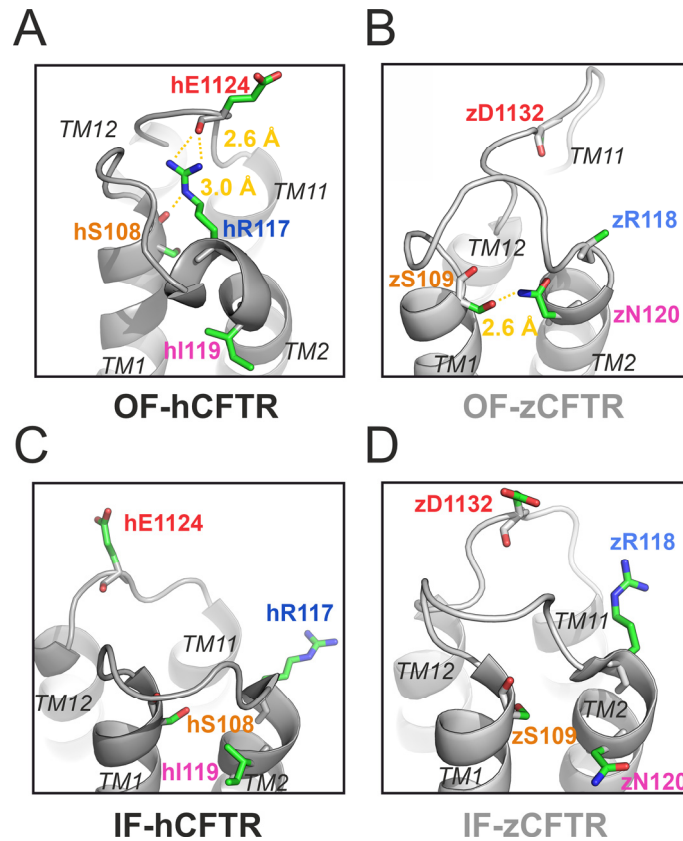
A humán ortológéhoz hasonlóan megkíséreltük feltérképezni a zR118H mutáns intraburst kinetikáját is. Azonban az arginin – hisztidin csere, vélhetően a arginin oldallánc pozitív töltésének elvesztése miatt, a humán ortológéhoz hasonlóan a zCFTR-ben is csökkentette az egyedi csatornák vezetőképességét (~ 0.3 pA -120 mV-on). Az alacsony jel/zaj arányból kifolyólag a zR118H konstrukció intraburst kinetikájával a továbbiakban nem foglalkoztunk.

4.5. Az extracelluláris régió konzervált szerinjének szerepe különböző ortológok esetén

A zCFTR B állapotát stabilizáló alternatív stratégia felderítése céljából megvizsgáltuk az OF-zCFTR szerkezetet egy olyan kölcsönhatás után kutatva, amely sem az IF-zCFTR, sem az IF/OF-hCFTR szerkezetekben nem lelhető fel (33, 34, 37, 61).

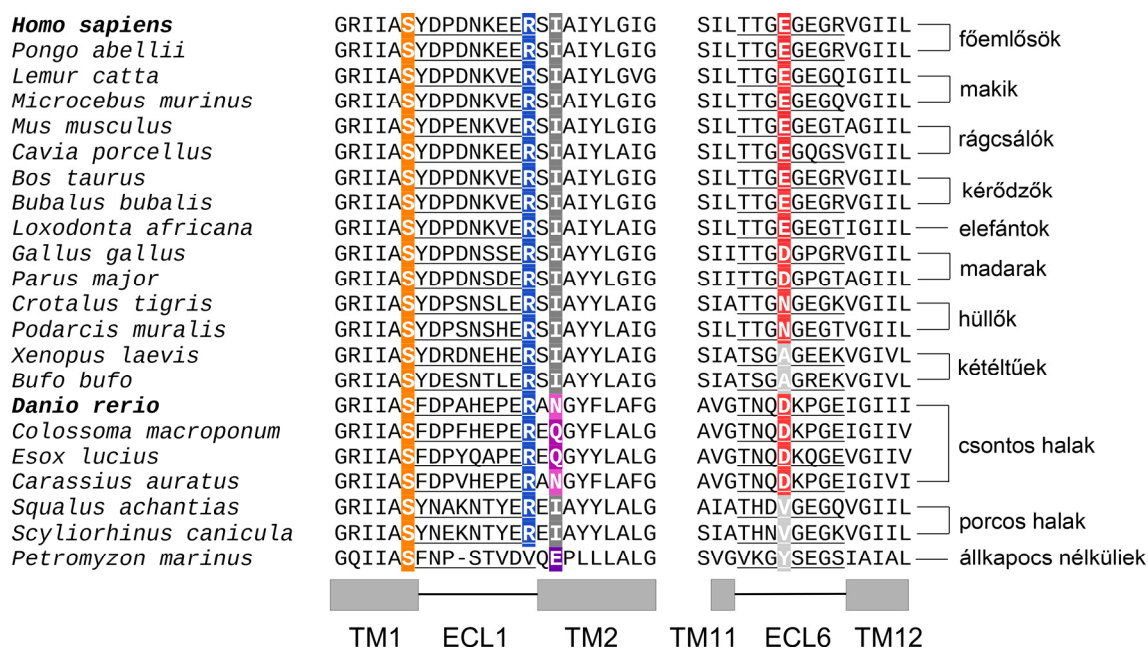
4.5.1. Az OF-zCFTR és OF-hCFTR lehetséges alternatív stabilizáló kölcsönhatásai

Az OF-zCFTR szerkezet extracelluláris régiójában megfigyelhető egy H-kötés a zS109 és zN120 aminosavak oldalláncai között, amely feltehetően a TM1 és TM2 α -hélixeket stabilizálja az extracelluláris oldalon (15. ábra). Ez a kölcsönhatás nem figyelhető meg az IF-zCFTR szerkezetben (15. ábra), mivel a két oldallánc között mérhető távolság (> 8 Å) jóval meghaladja egy H-kötés átlagos hatótávolságát (< 3.5 Å). Továbbá, a hCFTR szerkezetek esetén az aszparagin helyén egy izoleucin aminosav (hI119) található, amelynek oldallánca H-kötés kialakítására nem alkalmas (15. ábra). Említésre méltó, hogy az aszparagin – izoleucin csere trendszerű változást mutat a CFTR ioncsatorna evolúciós törzsfajlódése során: a z120-nak megfelelő pozícióban alacsonyabbrendű gerincesekben jellemzően poláros oldallánc (aszparagin, glutamin vagy glutamát), míg magasabbrendű ortológokban kizárólagosan izoleucin található (16. ábra, bíbor és szürke).



15. ábra Az IF és OF z/hCFTR szerkezetek extracelluláris régióinak vizsgálata. (A-D) Az extracelluláris régió közeli ábrázolása az OF-hCFTR (A), OF-zCFTR (B), IF-hCFTR (C) és IF-zCFTR (D) esetén. Színkódolás a 7. ábra szerint, a szerin és aszparagin színkódja rendre narancs és bíbor.

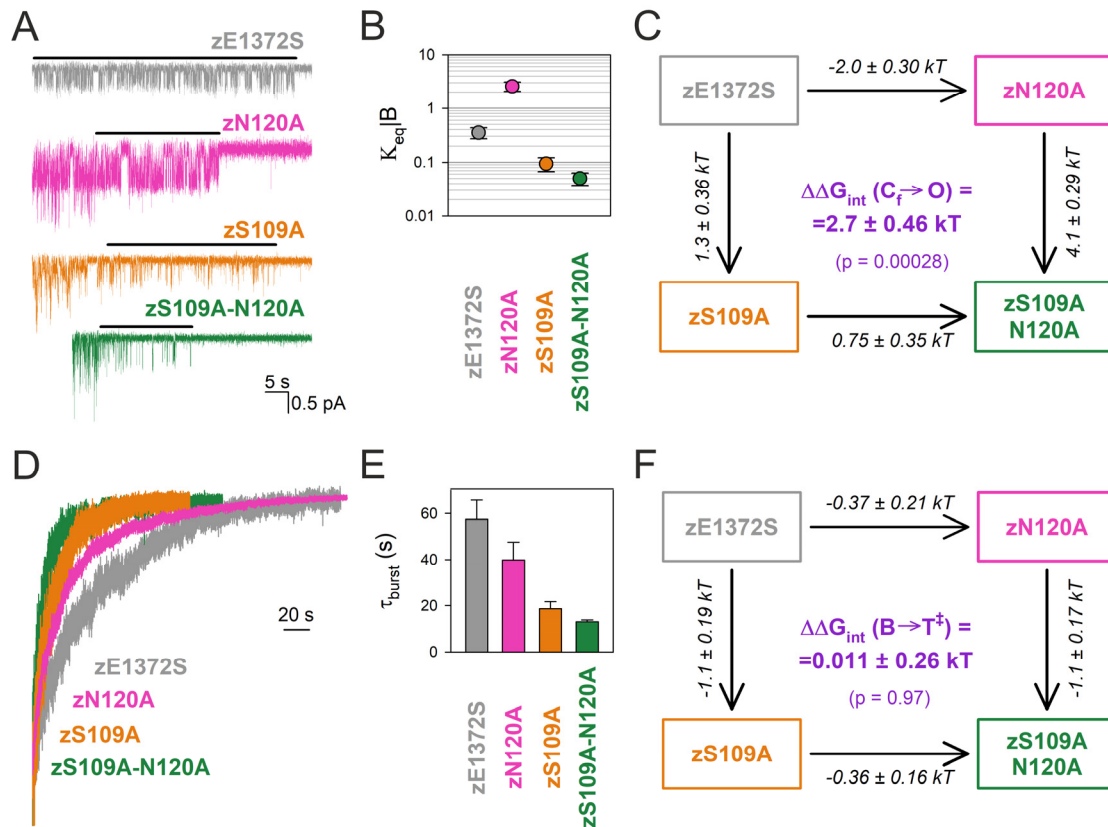
Ezzel szemben, a z109-nek megfelelő pozíció szerin oldallánca (16. ábra, narancs) – hasonlóan a h117-es pozíció arginin oldalláncához (16. ábra, kék) – igen konzervált a CFTR molekuláris evolúciója során. Ennek megfelelően elemeztük a hS108 pozíció lehetséges szerepét a humán ortológ esetén, s azt találtuk, hogy az OF hCFTR szerkezetben a hS108 peptidgerinc karbonil-csoportja a hR117 oldallánc szekunder aminocsoportjával alakíthat ki egy lehetséges H-kötést (15. ábra), míg a szerin oldallánca a TM1 helikális struktúrájának stabilitásában játszhat szerepet. Az OF-hCFTR extracelluláris régiójához hasonlóan az OF-zCFTR ezen régiójáról is elmondható, hogy kísérletesen meghatározott elektronsűrűség térképe alacsony felbontású, így az oldalláncok elrendeződése a szerkezeti modellekben bizonytalan. Ezért célul tűztük ki a zS109-zN120 pozíciók közti lehetséges kapcsolatnak, valamint a hS108 pozíció szerepének funkcionális vizsgálatát elektrofiziológiai módszerekkel.



16. ábra Az ECL1 és ECL6 hurok régiók szekvenciái különböző ortológok esetén. A vizsgált pozíciók színekkel kódolva (szerin: narancs, arginin: kék, aszparagin: bíbor, izoleucin: szürke, 1124-es glutamát: piros), a hurok kialakításában résztvevő aminosavakat aláhúzás jelöli. A szekvenciaillesztés alapján szemlélteti a TM1-ECL1-TM2, valamint a TM11-ECL6-TM12 átmenetet.

4.5.2. A zS109-zN120 kölcsönhatás stabilizálja a C_f állapotot

Mind a zS109, mind pedig a zN120 pozíció megzavarására az alanin mutációt választottuk. Elsőként $K_{eq}|B$ értékét vizsgáltuk meg utolsó aktív csatornás kísérletek alkalmazásával (17. ábra). A zN120A mutáció bevezetése drasztikusan, mintegy ~7.5-szörösére növelte az intraburst egyensúlyi állandót a zE1372S háttérkonstrukció hasonló értékéhez viszonyítva (17. ábra, bíbor és szürke). Ezzel szemben, a másik szimpla mutáns (zS109A) bevitele ellentétes hatást fejtett ki, ~1/3.5-ére csökkentette $K_{eq}|B$ értékét a zE1372S háttérmutációt tartalmazó konstrukcióhoz képest (17. ábra, narancs és szürke). Az energetikai additivitás vizsgálatának céljából létrehoztuk a dupla mutáns konstrukciót, és az előzőekhez hasonlóan vizsgáltuk $K_{eq}|B$ értékét (17. ábra, zöld). Azt találtuk, hogy míg a zE1372S háttérbe bevezetett zN120A mutáció $K_{eq}|B$ értékét növeli, addig a zS109A háttérben létrehozott zN120A mutáció, tovább – mintegy felére – csökkenti $K_{eq}|B$ értékét, azaz a két pozíció mutációinak hatása kifejezetten nem-additív energetikailag.



17. ábra A zS109 és zN120 között H-kötés jön létre a C_f állapotban. (A) Az ATP elvonását követő utolsó aktív csatorna kapuzásának áramgörbéi a különböző mutánsok esetén (szinkódolva) a zE1372S háttérben. A membránpotenciál -120 mV volt, az áramregisztrátumokon belül az analizált szegmenst fekete vonal szemlélteti. (B) A burst-ön belül a zárt – nyitott állapotok közti termodinamikai egyensúlyt az intraburst egyensúlyi állandó ($K_{eq}|B$) értéke szemlélteti, amelyet az átlag \pm SEM reprezentál logaritmikus skálán 5-12 független mérés eredményeként. (C, F) Termodinamikai mutáns ciklusok, amelyek szemléltetik (C) a C_f és O alapállapotok szabadentalpia különbségének, illetve (F) a $B \rightarrow C_s$ lépés szabadentalpia gát magasságának, mutáció- okozta változásait ($\Delta\Delta G^{\circ}_{O-C_f}$ és $\Delta\Delta G^{\circ}_{T^{\ddagger}-B}$ a számok a nyilakon, k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet). Minden sarok a z109-es és z120-as pozíciók egy-egy mutációját szemlélteti a zE1372S háttérben. $\Delta\Delta G_{int}(C_f \rightarrow O)$ (C) és $\Delta\Delta G_{int}(B \rightarrow T^{\ddagger})$ (F) értékeit (lila számok) a párhuzamos oldalak $\Delta\Delta G^{\circ}$ értékeinek különbségeiként definiáltuk. (D) ATP elvonás hatására végbemenő makroszkópos áramrelaxációk regisztrátumai inside-out konfigurációban különböző mutánsok esetén a zE1372S háttérben. A membránpotenciál -20 mV (zE1372S), -40 mV (zS109A, zN120A) és -80 mV (zS109A-N120A) volt, az áramamplitúdók a $t = 0$ s időpillanatban felvett értékeikkel normalizáltak. Időskála az ábrán található, az egyes konstrukciókat szinkód különbözteti meg.. (E) Az áramrelaxációk egyszerű exponenciális illesztése révén kapott τ_{burst} értékek oszlopdiagramjai. Az adatokat átlag \pm SEM értékek jellemzik, amelyek 6-9 mérés eredményei.

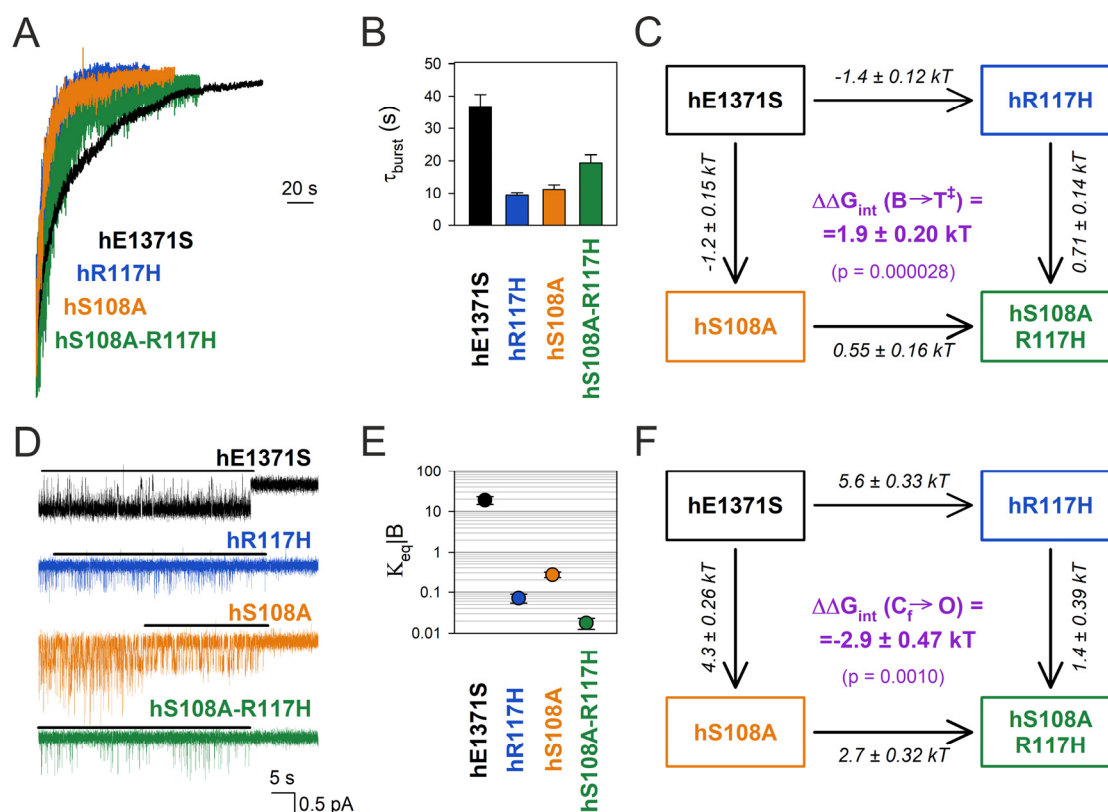
Termodinamikai mutáns ciklus alkalmazásával meghatároztuk a kölcsönhatási energia változását a C_f és O állapotok között, melynek nagysága ($\Delta\Delta G_{\text{int}}(\text{C}_f \rightarrow \text{O}) = 2.7 \pm 0.46$ kT) összehasonlítható egy H-kötés átlagos energiájával, és pozitív előjele arra utal, hogy a feltételezett H-kötés a C_f állapotban kialakul, de az O állapotban nem jön létre (17. ábra).

Két fontos további következtetés is levonható az adatokból. Egyrészt, a két szimpla mutáció által kiváltott ellentétes hatások alapján feltételezhető, hogy a zS109 aminosav oldallánc, a zN120 oldallánccal a C_f állapotban képzett H-kötés mellett, az O állapotban egy másik erős kölcsönhatást alakít ki egy jelenleg ismeretlen aminosavval. Másrészt, mivel az ezúton igazolt zS109-zN120 kölcsönhatás csak a C_f állapotban jön létre, ezért az OF-zCFTR szerkezet szükségszerűen nem az O, hanem a C_f állapotot szemlélteti, s így betekintést enged a C_f állapot lehetséges szerkezetébe (33).

Ezt követően megvizsgáltuk a kölcsönhatási energia változását a B és a T[‡] állapotok között, makroszkópos áramrelaxációk vizsgálatával. A zN120A mutáció hatására τ_{burst} értéke kis mértékben, az eredeti érték mintegy 70%-ára csökkent (17. ábra, szürke és bíbor). A zS109A mutáció ezzel szemben jelentősen, mintegy harmadára csökkentette τ_{burst} értékét, destabilizálva a zE1372S háttérkonstrukció B állapotát (17. ábra, szürke és narancs). Minthogy a duplamutáns esetén mért τ_{burst} érték további, mintegy 30%-kal csökkent (17. ábra, zöld), a két szimpla mutáns hatása jól láthatóan energetikailag additív, amit termodinamikai mutáns ciklus alkalmazásával számszerűsítettünk (17. ábra). Valóban, $\Delta\Delta G_{\text{int}}(\text{B} \rightarrow \text{T}^{\ddagger})$ értéke nullához közeli, azaz a kölcsönhatás energiája nem változik a B állapotból a T[‡] állapotba lépés során. Minthogy a háttérkonstrukcióként használt zE1372S csatorna a burst időtartamának nagyobb részét a C_f állapotban tölti (intraburst P_o ~ 0.26), és így a zS109-N120 kölcsönhatás a B állapotban dominánsan jelen van, ezen H-kötés vélhetően fennáll a T[‡] állapotban is. Tekintve azonban, hogy az IF-zCFTR szerkezetben a kölcsönhatás nem figyelhető meg, feltételezzük, hogy a C_s állapotban nem jön létre.

4.5.3. A hS108 oldallánc a hR117 oldallánccal együtt stabilizálja az O állapotot

A zebrahal ortológban tehát a zS109 szerin oldallánc jelentősen stabilizálja a B állapotot: egyfelől egy H-kötés kialakításán keresztül a C_f állapotban, másfelől egy ismeretlen aminosavval való kölcsönhatás révén az O állapotban.



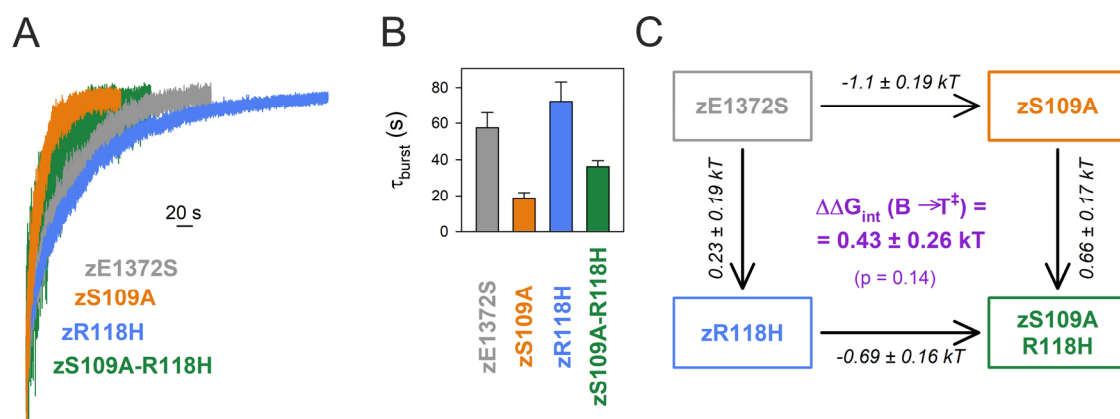
18. ábra A hS108 és a hR117 pozíciók között H-kötés jön létre az O állapotban. (A) ATP elvonás hatására végbemenő makroszkópos áramrelaxációk regisztrátumai inside-out konfigurációban különböző mutánsok esetén a hE1371S háttérben. A membránpotenciál -40 mV (hE1371S, hS108A, hR117H) és -80 mV (hS108A-R117H) volt, az áramamplitúdók a $t = 0$ s időpillanatban felvett értékeikkel normalizáltak. Időskála az ábrán található, az egyes konstrukciókat színekkel különbözteti meg. (B) Az áramrelaxációk egyszerű exponenciális illesztése révén kapott τ_{burst} értékek oszlopdiagramjai. Az adatokat átlag \pm SEM értékek jellemzik, amelyek 7-9 mérés eredményei. (C, F) Termodinamikai mutáns ciklusok, amelyek szemléltetik (C) a $B \rightarrow C_s$ lépés szabadentalpia gát magasságának, illetve (F) a C_f és O alapállapotok szabadentalpia különbségének, mutáció-okozta változásait ($\Delta\Delta G_{int}^{B \rightarrow T^\ddagger}$ és $\Delta\Delta G_{int}^{C_f \rightarrow O}$ a számok a nyilakon, k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet). Minden sarok a h108-as és h117-es pozíciók egy-egy mutációját szemlélteti a hE1371S háttérben. $\Delta\Delta G_{int}(B \rightarrow T^\ddagger)$ (C) és $\Delta\Delta G_{int}(C_f \rightarrow O)$ (F) értékeit (lila számok) a párhuzamos oldalak $\Delta\Delta G^\circ$ értékeinek különbségeiként definiáltuk. (D) Az ATP elvonását követő utolsó aktív csatorna kapuzásának áramgörbéi a különböző mutánsok esetén (színekkel) a hE1371S háttérben. A membránpotenciál -80 mV volt, az áramregisztrátumokon belül az analizált szegmenst fekete vonal szemlélteti. (E) A burst-on belül a zárt – nyitott állapotok közti termodinamikai egyensúlyt az intraburst egyensúlyi állandó ($K_{eq}|B$) értéke szemlélteti, amelyet az átlag \pm SEM reprezentál logaritmikus skálán 6-8 független mérés eredményeként.

A homológ hS108 aminosavnak a hCFTR szerkezetekben megfigyelhető orientációjából, valamint e pozíció evolúciós konzerváltságából kifolyólag

tanulmányoztuk a hS108 pozíció hCFTR kapuzására gyakorolt hatását. A szerkezet megzavarására ismét az alanin mutációt választottuk. Elsőként megvizsgáltuk a hS108A mutáció τ_{burst} -re gyakorolt hatását. Meglepő módon, ez a mutáció mintegy negyedére csökkentette τ_{burst} értékét a hE1371S konstrukcióéhoz képest (18. ábra, narancs és fekete), mely hatás nagyban hasonlít a hR117H mutációéhoz. Ezután létrehoztuk a dupla mutáns konstrukciót (hS108A-R117H), és meghatároztuk a két pozíció közötti kölcsönhatási energia változását a B és T^\ddagger állapotok között (18. ábra). Minthogy a hS108A mutáció bevezetése a hR117H háttérbe ~ 2 -szeresére növelte τ_{burst} értékét (18. ábra, zöld és kék), igen erős energetikai kapcsoltság figyelhető meg e két pozíció között. Termodinamikai mutáns ciklus alkalmazásával a kölcsönhatási energia változása $\Delta\Delta G_{int}(B \rightarrow T^\ddagger) = 1.9 \pm 0.20$ kT (18. ábra, lila szám), amely megfelel egy H-kötés átlagos energiájának, s pozitív előjele alapján a kötés a B állapotban jön létre, hasonlóan a hR117-hE1124 kölcsönhatáshoz.

Kíváncsiak voltunk továbbá arra is, hogyan változik e kölcsönhatás erőssége a C_f és O állapotok között, így utolsó csatornás mérések alkalmazásával vizsgáltuk a hS108A mutáció intraburst egyensúlyra gyakorolt hatását. $K_{eq|B}$ értékét a hS108A mutáció a hE1371S háttérbe bevezetve ~ 70 -edére (18. ábra, narancs és fekete), a hR117H háttérbe bevezetve viszont csupán ~ 4 -edére (18. ábra, kék és zöld) csökkentette, ami erős energetikai kapcsoltságot jelez a hS108 és hR117 pozíciók között. Számszerűsítve a kölcsönhatási energia változását C_f és O állapotok között ($\Delta\Delta G_{int}(C_f \rightarrow O) = -2.9 \pm 0.47$ kT; 18. ábra, lila szám), annak nagysága megfelel egy H-kötés energiájának, negatív előjele pedig arra utal, hogy e kötés az O állapotot stabilizálja.

A hS108-hR117 pozíciók kapcsoltságából kifolyólag megvizsgáltuk egy analóg, zS109 és zR118 pozíciók közötti kölcsönhatás lehetőségét a zebrahal csatornában (19. ábra). Létrehozva a duplamutánst (zS109A-zR118H) célul tűztük ki a kölcsönhatási energia változásának meghatározását B és T^\ddagger állapotok között. A zS109A mutáció a zE1372S háttérben hozzávetőlegesen harmadára, ugyanezen mutáció a zR118H háttérben mintegy felére csökkentette τ_{burst} értékét (19. ábra, narancs és szürke, valamint zöld és halványkék), mely hatások tehát nagymértékben additívak energetikailag. A termodinamikai mutáns ciklus révén meghatározott $\Delta\Delta G_{int}(B \rightarrow T^\ddagger)$ értéke nullához közeli (19. ábra, lila szám), így a zebrahal ortológban feltételezhetően nincs kölcsönhatás a két pozíció között.

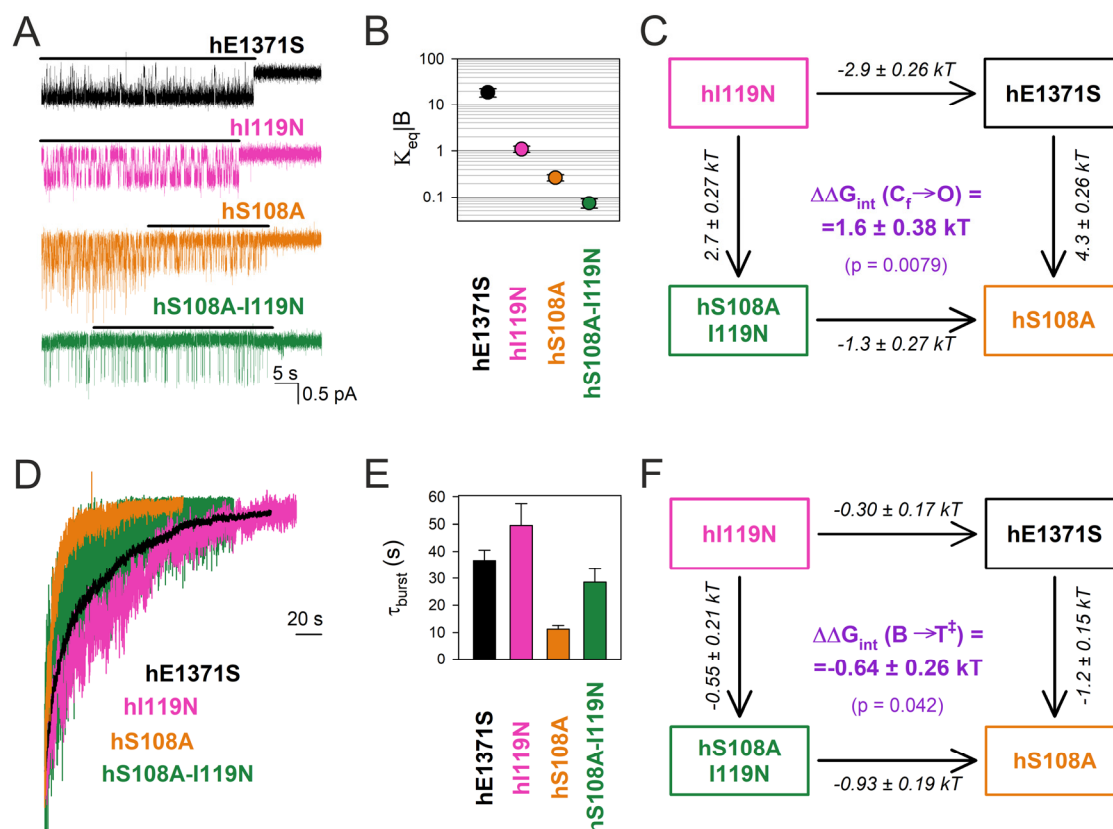


19. ábra A zS109 és zR118 aminosavak közt nincs kölcsönhatás a zebrahal ortológban. (A) ATP elvonás hatására végbemenő makroszkópos áramrelaxációk regisztrátumai inside-out konfigurációban különböző mutánsok esetén a hE1371S háttérben. A membránpotenciál -20 mV (zE1372S, zR118H), -40 mV (zS109A) és -80 mV (zS109A-R118H) volt, az áramamplitúdók a $t = 0$ s időpillanatban felvett értékekkel normalizáltak. Időskála az ábrán található, az egyes konstrukciókat színek kód különbözteti meg. (B) Az áramrelaxációk egyszerű exponenciális illesztése révén kapott τ_{burst} értékek oszlopdiagramjai. Az adatokat átlag \pm SEM értékek jellemzik, amelyek 7-9 mérés eredményei. (C.) Termodinamikai mutáns ciklus, amely a $B \rightarrow C_s$ lépés szabadentalpia gát magasságának változásait ($\Delta\Delta G^\circ$) szemlélteti ($\Delta\Delta G^\circ_{T^\ddagger-B}$ a számok a nyilakon, k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet). Minden sarok a z109-es és z118-as pozíciók egy-egy mutációját szemlélteti a zE1372S háttérben. $\Delta\Delta G_{int}(B \rightarrow T^\ddagger)$ értékét (lila szám) a párhuzamos oldalak $\Delta\Delta G^\circ$ értékeinek különbségeként definiáltuk.

4.5.4. A C_f állapotot stabilizáló ősi kölcsönhatás helyreállítható a humán ortológban

Míg egy kölcsönhatás megzavarása, azaz a kölcsönhatás kialakulásának megakadályozása jól tervezhető megfelelő pontmutációk választásával, addig egy nem létező kölcsönhatás kialakítása, létrehozása körülményesebb és precízebb tervezést kíván. Tekintve, hogy a hCFTR natív formájában a C_f állapotot stabilizáló, h108-h119 pozíciók közötti, ősi H-kötés nem jöhet létre a h119 pozícióban lezajlott aszparagin – izoleucin csere miatt; kíváncsiak voltunk, hogy az aszparagin aminosav visszaállításával kialakulhat-e az ősi stabilizáló kölcsönhatás.

Elsőként a C_f és O állapotok közötti kölcsönhatási energia változását vizsgáltuk. Várakozásainknak megfelelően, a hE1371S háttérben a hI119N mutáció $K_{eq}|B$ értékét mintegy ~ 17 -edére csökkentette (20. ábra, bíbor és fekete).



20. ábra A C_f állapot stabilizálható a humán ortológban az aszparagin aminosav visszavezetésével a 119-es izoleucin pozíciójába. (A) Az ATP elvonását követő utolsó aktív csatorna kapuzásának áramgörbéi a különböző mutánsok esetén (szinkódolva) a zE1372S háttérben. A membránpotenciál -80 mV (hE1371S, hS108A, hI119N) és -120 mV (hS108A-I119N) volt, az áramregisztrátumokon belül az analizált szegmenst fekete vonal szemlélteti. (B) A burst-ön belül a zárt – nyitott állapotok közti termodinamikai egyensúlyt az intraburst egyensúlyi állandó ($K_{eq}|B$) értéke szemlélteti, amelyet az átlag \pm SEM reprezentál logaritmusos skálán 6-9 független mérés eredményeként. (C, F) Termodinamikai mutáns ciklusok, amelyek szemléltetik (C) a C_f és O alapállapotok szabadentalpia különbségének, illetve (F) a $B \rightarrow C_s$ lépés szabadentalpia gát magasságának, mutáció-okozta változásait ($\Delta\Delta G_{int}^{O-C_f}$ és $\Delta\Delta G_{int}^{T^\ddagger-B}$ a számok a nyilakon, k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet). Minden sarok a h108-as és h119-es pozíciók egy-egy mutációját szemlélteti a hE1371S háttérben. $\Delta\Delta G_{int}(C_f \rightarrow O)$ (C) és $\Delta\Delta G_{int}(B \rightarrow T^\ddagger)$ (F) értékeit (lila számok) a párhuzamos oldalak $\Delta\Delta G^\circ$ értékeinek különbségeiként definiáltuk. (D) ATP elvonás hatására végbemenő makroszkópos áramrelaxációk regisztrátumai inside-out konfigurációban különböző mutánsok esetén a zE1372S háttérben. A membránpotenciál -40 mV (hE1371S, hS108A, hI119N) és -80 mV (hS108A-I119N) volt, az áramamplitúdók a $t = 0$ időpillanatban felvett értékeikkel normalizáltak. Időskála az ábrán található, az egyes konstrukciókat szinkódoltan különbözteti meg. (E) Az áramrelaxációk egyszerű exponenciális illesztése révén kapott τ_{burst} értékek oszlopdiagramjai. Az adatokat átlag \pm SEM értékek jellemzik, amelyek 7-9 mérés eredményei.

Ugyanezen mutáció bevitele a hS108A háttérbe azonban csak további ~3.5-szörös csökkenést eredményezett (20. ábra, zöld és narancs), azaz egyértelmű energetikai kapcsoltság áll fenn a két pozíció között, melyet termodinamikai mutáns ciklus alkalmazásával számszerűsítettünk (20. ábra). Minthogy eme mutáns ciklusban a lehetséges H-kötés csak a hI119N háttérben jöhet létre, így ezt a konstrukciót definiálhatjuk a ciklus 'háttéréként' (azaz ez kerül a ciklus bal felső sarkába); a hE1371S és hS108A-I119N konstrukciók a szimpla mutánsoknak (egy mutáció a háttér konstrukcióhoz képest), a hS108A konstrukció pedig a dupla mutánsnak (két mutáció a háttér konstrukcióhoz képest) feleltethető meg. Az így definiált mutáns ciklus során meghatározott kölcsönhatási energia változás nagysága ($\Delta\Delta G_{\text{int}}(\text{C}_f \rightarrow \text{O}) = 1.6 \pm 0.38$ kT) összemérhető egy H-kötés átlagos energiájával (20. ábra, lila szám), s pozitív előjele arra utal, hogy a H-kötés csak a C_f állapotban jön létre.

Ezt követően tanulmányoztuk $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ értékét B és T^\ddagger állapotok között, makroszkópos áramrelaxációk vizsgálatával. A hI119N mutáció bevitele a hE1371S és hS108A háttérbe rendre ~1,4-szeresére és ~2,6-szorosára növelte τ_{burst} értékét, ami kis mértékű kapcsoltságot sejtet (20. ábra, bíbor és fekete, zöld és narancs). A kölcsönhatási energia termodinamikai mutáns ciklus alapján számolt változása kicsi ($\Delta\Delta G_{\text{int}}(\text{B} \rightarrow \text{T}^\ddagger) = -0.64 \pm 0.26$ kT), de nullától szignifikánsan különböző ($p = 0.042$) érték (20. ábra, lila szám). Ezen kicsi, de negatív $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ érték a H-kötés erősségének kis mértékű növekedését szemlélteti, ahogy a hI119N csatornák a B állapotból a T^\ddagger állapotba jutnak. Mivel a B állapotban a H-kötés csak a C_f állapotban jön létre, valamint a hI119N csatornák hozzávetőlegesen a teljes tartózkodási idő felét töltik a C_f állapotban (intaburst $P_o \sim 0.5$; ld. 20.A-B ábra), a kölcsönhatási energia burst-ön belüli időátlagára várhatóan egy H-kötés energiájának a felét közelíti. Így a kismértékű további stabilizáció a $\text{B} \rightarrow \text{T}^\ddagger$ lépés során alátámasztja a H-kötés jelenlétét az átmeneti állapotban.

A $\text{C}_s \rightarrow \text{T}^\ddagger$ lépés során fellépő kölcsönhatási energia változás mérése a hE1371S háttérben a lassú kapuzás miatt technikailag nem kivitelezhető, így ezt kvalitatív módon *in silico* vizsgáltuk. Homológia-modellezés (Missense3D) segítségével létrehoztuk az I119N mutációt az IF-hCFTR szerkezetben. Megvizsgálva a két célpozíció (hS108, hI119N) közötti távolságot azt találtuk, hogy e távolság lényegesen nagyobb (> 8 Å), mint egy H-híd átlagos távolsága. Összefoglalva, a mesterségesen helyreállított 'ősi' hS108-hI119N kölcsönhatás mind a C_f , mind a T^\ddagger állapotokban létrejön, de sem a C_s , sem az O állapotokban nem figyelhető meg.

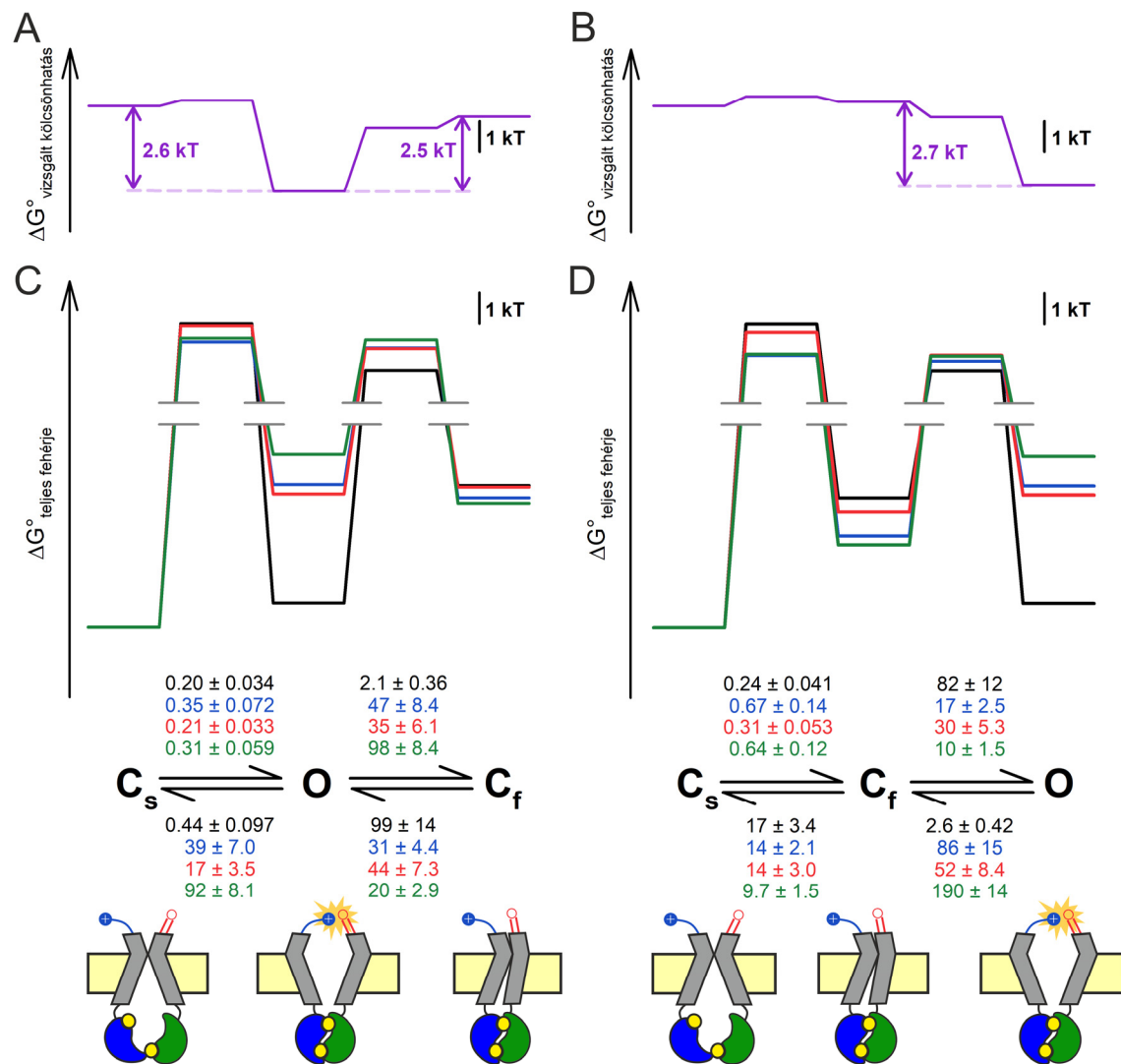
3. táblázat A burst átlagos élettartamát és az intraburst kapuzást leíró modellfüggetlen paraméterek a hE1371S/Q és zE1372S/Q nem-hidrolitikus háttérmutációt tartalmazó konstrukciókban. Az adatokat az átlag \pm SEM reprezentálja, n értékét minden független paraméter esetén a zárójelben található szám szemlélteti, n.d. esetén a paraméter nem került meghatározásra.

<i>zebrahal</i>	τ_{burst} (s)	τ_{open} (ms)	$\tau_{flickery}$ (ms)	$K_{eq B}$
zE1372S	57 \pm 8.3 (9)	19 \pm 3.6	55 \pm 8.0	0.35 \pm 0.079 (12)
zE1372Q	78 \pm 6.7 (6)	n.d.	n.d.	n.d.
zS109A	19 \pm 3.0 (7)	14 \pm 3.3	150 \pm 32	0.094 \pm 0.027 (9)
zN120A	40 \pm 7.7 (6)	37 \pm 6.2	14 \pm 1.5	2.6 \pm 0.51 (5)
zS109A-N120A	13 \pm 0.82 (7)	9.0 \pm 1.5	200 \pm 31	0.045 \pm 0.0094 (12)
zR118H	72 \pm 11 (7)	n.d.	n.d.	n.d.
zS109A-R118H	36 \pm 3.4 (7)	n.d.	n.d.	n.d.
<i>humán</i>				
hE1371S	37 \pm 3.7 (7)	200 \pm 23	10 \pm 2.2	19 \pm 4.1 (6)
hE1371Q	470 \pm 65 (4)	n.d.	n.d.	n.d.
hS108A	11 \pm 1.4 (9)	33 \pm 2.8	120 \pm 16	0.27 \pm 0.041 (7)
hI119N	50 \pm 7.9 (8)	66 \pm 5.8	61 \pm 8.6	1.1 \pm 0.17 (9)
hS108A-I119N	29 \pm 5.0 (8)	19 \pm 3.6	260 \pm 39	0.074 \pm 0.017 (7)
hR117H	9.5 \pm 0.73 (8)	11 \pm 2.1	150 \pm 24	0.072 \pm 0.018 (8)
hS108A-R117H	19 \pm 2.4 (9)	5.4 \pm 1.5	300 \pm 38	0.018 \pm 0.0054 (6)

4.6. Modellfüggő analízis: $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ avagy $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$

A foszforilált CFTR anioncsatornák kapuzásának 'burst' mintázata kinetikai értelemben kétféle lineáris kapuzási mechanizmussal írható le: $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$, illetve $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$ mechanizmussal (66); ugyanakkor egyik séma mellett sem szól elegendő érv, s azt maradéktalanul alátámasztó adat. Korábban megpróbálták különbséget tenni a mikroszkópikus sebességi együtthatók ATP koncentráció-függése (46), valamint a pH (74) és a membránfeszültség kapuzásra (75) gyakorolt hatásai alapján. Kutatásunk során azt feltételeztük, hogy az O illetve C_f állapot szelektív megzavarása esetleg olyan kinetikai illetve energetikai profilt eredményezhet, amely csak az egyik vagy csak a másik modellel magyarázható, ezek bemutatására a következő fejezetben kerül sor.

4.6.1. Az O állapot szelektív destabilizálásával nem tehető különbség a két modell között



21. ábra Mindkét lineáris modell megmagyarázza a hR117-hE1124 kölcsönhatás megzavarása okozta változásokat. (A-D) A hR117-hE1124 kötés (A-B), valamint a teljes fehérje (C-D) szabadentalpia profilja a különböző mutánsok esetén a hD1370N háttérben (mutáció szerint szinkódolva), mind a $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ (A, C), mind a $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$ (B, D) modellt feltételezve. Az (A-B) panelek kölcsönhatási energiaprofiljait a négy kapuzási lépésre kapott $\Delta\Delta G_{int}$ értékekből, a (C-D) panelek szabadentalpia profiljait a modellfüggő mikroszkopikus sebességi állandók (sémák nyilain számok, mutáció szerint szinkódolva) felhasználásával építettük fel. A vázlatos modellek (C, D, alsó panel) a C_s , C_f és O állapotok szerkezeti jellemzőit szemléltetik, szinkódolás a 10. ábra alapján.

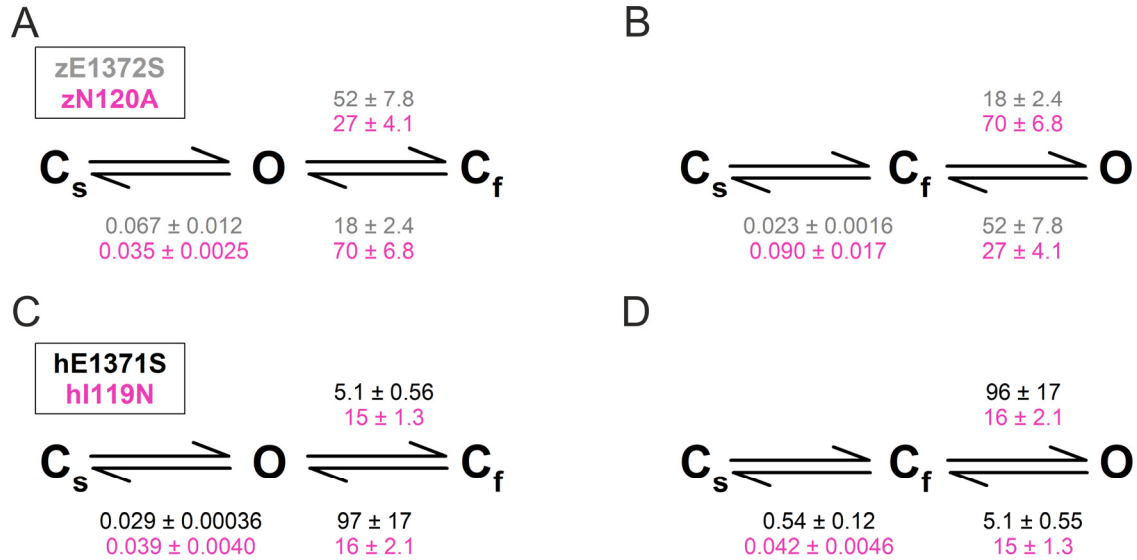
A hD1370N nem-hidrolitikus háttérmutációt tartalmazó háttér, hR117H, hE1124 Δ , és hR117H/hE1124 Δ konstrukciók telítési ATP koncentráció mellett

megfigyelhető kapuzásának (ld. 10A ábra) regisztrációját követően az illesztett sebességi együtthatók, s a belőlük számolt modellfüggetlen paraméterek (τ_{burst} , $\tau_{interburst}$, τ_{open} , A) felhasználásával számoltuk vissza a két lineáris séma szerinti modellfüggő sebességi állandókat ($C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$: $k_{C_s \rightarrow O}$, $k_{O \rightarrow C_s}$, $k_{O \rightarrow C_f}$, $k_{C_f \rightarrow O}$; $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$: $k_{C_s \rightarrow C_f}$, $k_{C_f \rightarrow C_s}$, $k_{C_f \rightarrow O}$, $k_{O \rightarrow C_f}$). Ezt követően mind a négy együtthatóra termodinamikai mutáns ciklust építve meghatároztuk a hR117-hE1124 kötés kölcsönhatási energiájának változását a 3 alap- és 2 átmeneti állapot között (6. ábra), majd ezt felhasználva építettük fel a kötés energetikai profilját mindkét séma esetén (21. ábra). Továbbá, a sebességi állandók abszolút értékeiből mind a négy konstrukcióra vonatkozóan kiszámoltuk a teljes csatorna kapuzási szabadentalpia profilját is (21. ábra, konstrukciók szinkódolva). Ez utóbbiról elmondható, hogy – bármelyik sémát fogadjuk is el valósnak – a kötést megzavaró pontmutációk az O állapot szelektív destabilizációját eredményezik. Másfelől, fontos szem előtt tartani, hogy a hR117-hE1124 kötés kölcsönhatási energia változása (21. ábra) a $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ séma esetén annak mindkét kapuzási lépése során ugyanannak a H-hídnek a kialakulását / felbomlását kell tükrözze. Ezért, amennyiben $\Delta\Delta G_{int}$ számolt értéke az $O \rightarrow C_s$ és $O \rightarrow C_f$ között nem lenne hasonló, ez kizárná ezt a sémát a lehetőségek köréből. Minthogy azonban a kötés energiájának változása a $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ mechanizmus e két lépése során gyakorlatilag megegyezik (21. ábra), adataink alapján a két modell között nem lehet különbséget tenni az O állapot szelektív megzavarásával.

4.6.2. A C_f állapot szelektív destabilizálásával sem tehető különbség a két modell között

Mivel a hE1371S / zE1372S nem-hidrolitikus háttérmutációk alkalmazása során $\tau_{interburst}$ értéke a lassú kapuzás miatt technikailag meghatározhatatlan, továbbá a zS109 és a hS108 aminosavak az O állapotban is kötést létesítenek, így alternatív stratégiát alkalmaztunk. A hE1371S – hI119N és a zE1372S – zN120A konstrukciók esetén a mérhető adatok (τ_{burst} , τ_{open} , $\tau_{flicker}$) felhasználásával kiszámoltuk a három becsülhető modellfüggő sebességi együtthatót ($C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$: $k_{O \rightarrow C_s}$, $k_{O \rightarrow C_f}$, $k_{C_f \rightarrow O}$; $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$: $k_{C_f \rightarrow C_s}$, $k_{C_f \rightarrow O}$, $k_{O \rightarrow C_f}$) (22. ábra) (68). A $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ mechanizmus esetén feltételezhető, hogy a C_f állapot szelektív megzavarásának hatására az $O \rightarrow C_s$ lépést leíró sebességi együttható ($k_{O \rightarrow C_s}$) változatlan marad – ellenkező tapasztalat a $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ mechanizmust valószínűtlenné tenné. Mivel azonban sem a zebrahal (22. ábra), sem a

humán (22. ábra) ortológ esetén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két összevetett konstrukció (szürke és bíbor) $k_{O \rightarrow C_s}$ sebességi állandói között, az adatok mindkét modellel leírhatók.



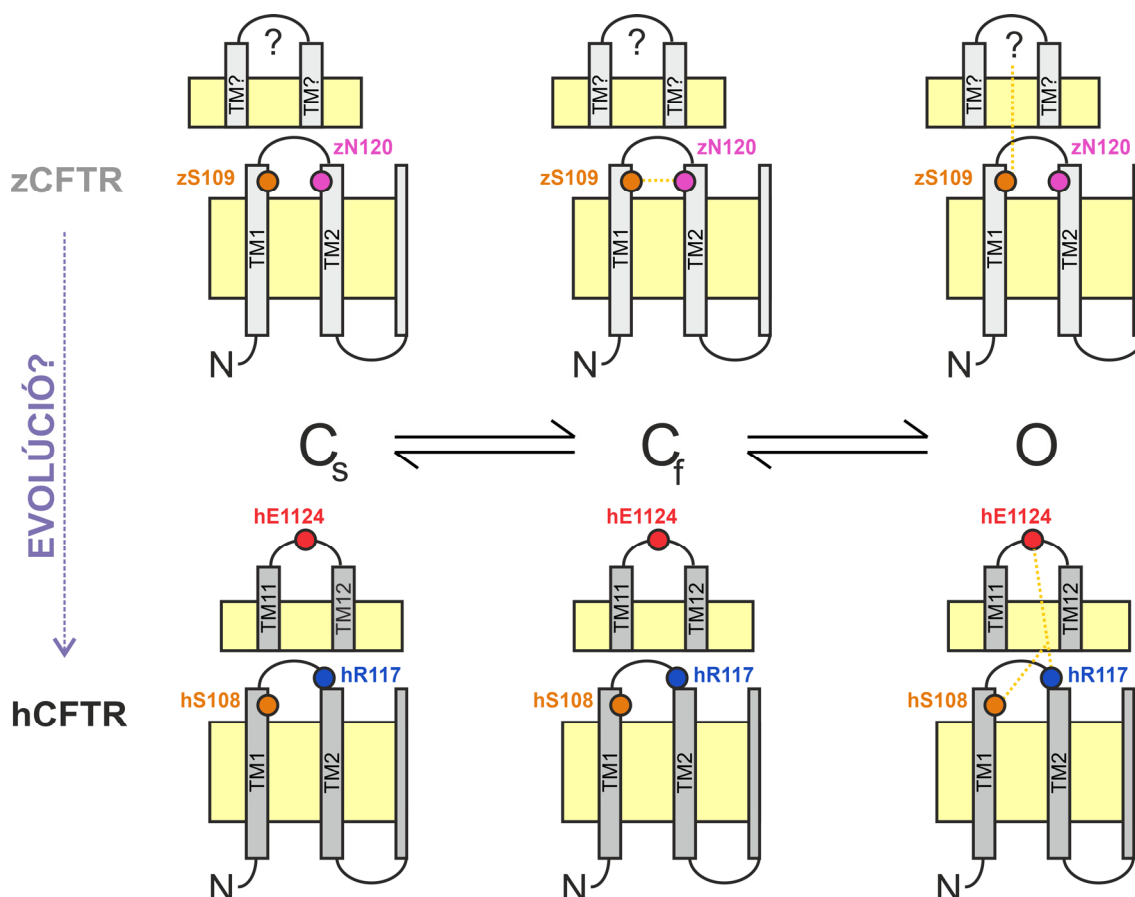
22. ábra Mindkét lineáris séma jól magyarázza a hI119N és a zN120A mutációk kapuzásra gyakorolt hatásait. (A-D) A sebességi együtthatókat τ_{burst} , τ_{open} , és $\tau_{flicker}$ felhasználásával számoltuk a két lineáris modell szerint a zebrahal (A, B) és a humán (C, D) ortológ esetén. Az adatokat az átlag \pm SEM reprezentálja, a SEM-et valószínűségi változók hibaterjedése révén határoztunk meg.

5. Megbeszélés

Munkánk egyik alapkövetkeztetése, hogy a hR117 oldallánc és a hE1124 peptid-karbonil csoportja között, kizárólagosan az O állapotban, H-kötés alakul ki amely stabilizálja az O állapotot (23. ábra). A hR117H mutáció ezen kötés megszüntetésével destabilizálja az O állapotot, s a P_o drasztikus csökkenéséhez vezet, amely CF kialakulását eredményezheti. Bár elérhető kísérletes módszer hiányában (76) e kölcsönhatásban részt vevő kémiai csoportok azonossága közvetlenül, a h1124-es karbonil csoport kiiktatásával, nem bizonyítható, fenti következtetésünket a mutáns ciklusok (10-11. ábrák) eredményén felül több további érv is alátámasztja. Egyrészt, míg a hR117 oldallánc számos mutációja (C, G, L, P) CF kialakulásához vezethet, addig a hE1124 pozíció esetén nincs regisztrált CF-et okozó mutáció. Másrészt, míg az arginin oldallánc igen konzervált az evolúciós törzsfajlás folyamán, a hE1124-nek megfelelő pozícióban bizonyos fajokban eltérő oldallánc található (16. ábra). Harmadrészt, a hE1124 oldallánc mutációja nem eredményezett hR117H-szerű fenotípust, azaz az oldallánc feltehetően nem játszik szerepet a stabilizáló kötés kialakításában (8A-B ábra). Említésre méltó, hogy míg a hE1124G mutáció növelte, addig a hE1126P csökkentette a csatornák záródási sebességét (8B ill. 9. ábra), ami feltehetően az ECL6 mozgékonyágának növelésére illetve csökkentésére vezethető vissza. Tekintettel arra, hogy a hE1124 peptid-karbonil csoport részvétele csupán implicit módon, a hE1124 Δ mutánson keresztül bizonyítható; nem kizárható, hogy a H-kötés kialakításában valójában egy másik ECL6 peptid-karbonil csoport vesz részt, e valódi kölcsönható partner pozíciója azonban a hE1124 Δ deléción révén megrövidült ECL6-ban megváltozik, ellehetetlenítve a H-kötés kialakítását.

Egy fehérje konformáció változás során számos már meglévő kötés szakad fel, s új kötések jönnek létre az újonnan felvett orientáció stabilizálása céljából (33, 34, 37, 61). Ahhoz azonban, hogy egy konformáció változás termodinamikai értelemben reverzibilis lehessen, elengedhetetlen, hogy ezen változások egyensúlyozva legyenek, azaz, hogy a teljes molekula szabadentalpia változása ne legyen távol a nullától. Jól látható, hogy a nagy átrendeződéssel járó C_s \leftrightarrow B átmenet során a teljes molekula szabadentalpia változása összemérhető egyetlen H-kötés kötési energiájával (~1 kT és ~2.8 kT; 10F ábra). Ezzel magyarázható, hogy egyetlen kötés megzavarása is képes drasztikus hatást gyakorolni a teljes fehérje kapuzására, jelentősen eltolva az

egyensúlyt a C_s állapot felé. Bár feltételezhetően a $C_f \leftrightarrow O$ átmenet során csekélyebb átrendeződés játszódik le a fehérjében, a teljes molekula és a hR117-hE1124 H-kötés ezen lépéshez kapcsolt szabadentalpia változásai is összehasonlíthatók (11D ábra), így vélhetően ez a kölcsönhatás az intraburst kapuzásban is kulcsfontosságú szerepet tölt be.



23. ábra A zebrahal és a humán ortológ extracelluláris régióinak vázlatos modellje, amely összefoglalja az ECL1-ECL6 szegmensek vizsgált kölcsönhatásainak alakulását a C_s , C_f és O állapotokban. Szinkód az 1. ábra és a 15. ábra alapján. A zCFTR esetén a kérdőjel az ismeretlen aminosavat jelképezi, amely a zS109 oldallánccal kölcsönhatásba lépve stabilizálja a nyitott állapotot.

Meglepő módon, a h117-es pozícióban található arginin oldallánc – a CFTR molekuláris evolúciója során megfigyelhető nagyfokú konzerváltsága ellenére – a zebrahal ortológban nem képez H-hidat (15. ábra), és nem járul hozzá az O állapot, illetve tágabb értelemben a B állapot, stabilitásához. E tény két megfigyelésünk

szemlélteti. Egyrészt, míg a B állapot (azaz az NBD dimer) stabilitása a két ortológ esetén összemérhető (12A-B ábra), addig a két ioncsatorna iontranszportra vonatkozó hatékonysága különböző: az intraburst P_o a hCFTR esetén közel 1, ugyanakkor a zCFTR esetén csak ~ 0.3 (12C-D ábra). Másrészt, a zCFTR csatornában a zR118 oldallánc mutációja nem csökkenti a B állapot stabilitását (14. ábra).

Munkánk másik alapkövetkeztetése, hogy a zebrahal és más alacsonyabb rendű gerinces fajok CFTR csatornáiban a z109-es pozíció konzervált szerin oldallánca (zS109) tölt be univerzális stabilizáló szerepet a burst során (23. ábra). Egyrészt, a burst események C_f állapotban töltött időhányada során a központi szerepet betöltő zS109 oldallánc a zN120 oldallánccal kölcsönhatva stabilizálja a B állapotot (17. ábra). E kölcsönhatás általános szerepét a korai gerincesekben valószínűsíti, hogy a homológ pozícióban a halakban (N, Q), sőt feltételezhetően még a jelenleg legősibb ortológként számon tartott tengeri ingolában (E) is, poláris oldallánc van jelen. Megjegyzendő, hogy e kölcsönhatás nem állhat fenn a porcos halak CFTR csatornáiban, mivel ezekben – a magasabb rendű gerincesekhez hasonlóan – izoleucin található a zN120-nak megfelelő pozícióban (16. ábra). Másrészt, a szerin oldallánc (zS109) egy jelenleg ismeretlen aminosavval kölcsönhatva stabilizálja az O állapotot is (vö., 17A ábra). Ez utóbbi mechanizmus az ősi gerinceseknek, a hR117-hE1124 kölcsönhatáshoz hasonló, alternatív stabilizáló stratégiája lehet (23. ábra, fent).

Mindazonáltal, az evolúció egy ponton a már jelen lévő arginin oldallánc (hR117, valamint homológjai) felhasználásával optimalta a B állapotot stabilizáló stratégiát, egy olyan kölcsönhatás kialakítása révén, amely szelektíven az O állapotot stabilizálja (23. ábra, lent). Ezen törzsfjlődési mérföldkő meghatározása nagy mennyiségű CFTR ortológ klónozását és tanulmányozását igényelné, és túlmutat a jelen munka keretein. A természet ugyanakkor igen takarékos, hiszen a szerin (hS108) a magasabb rendű gerincesekben továbbra is szükséges az O állapot stabilizálásához (vö., 18D-E ábra), mégpedig feltételezhetően a hR117 oldallánc megfelelő pozícionálása révén (15A ábra, vö. 18C, F ábra). Azaz, a törzsfjlődés megtartotta a konzervált szerint egyfajta O állapot 'ko-stabilizátorként'. Meglepő, hogy a szerin oldallánc csonkolása megzavarja ezt a kölcsönhatást, tekintve, hogy azt a szerkezet alapján a hS108 peptidgerinc karbonil-csoportja hozza létre a hR117 oldallánccal. Feltehetőleg az oldallánc kiemelkedően fontos szerepet játszik a peptidgerinc karbonil-csoport pozícionálásában, ugyanakkor elérhető molekuláris technikák hiányában ezen felvetés nem bizonyítható.

Van-e tehát kórélettani jelentősége a szerin oldalláncnak, regisztrálták-e CF-es betegben ezen pozíció mutációját? A www.cftr2.org adatbázis szerint mindeddig nem dokumentáltak olyan CF-es beteget, aki bármelyik allélen hS108 mutációval rendelkezne, aminek több oka lehet. Egyrészt lehetséges, hogy ezen oldallánc mutációi embrionálisan halálosak. Másrészt a szerin aminosav számos, hat kodonnal rendelkezik, melynek köszönhetően a mutációk egy része csendes marad. Végezetül, a szerin aminosav átlagos oldallánc mérete és poláris jellege miatt számos egyéb aminosavval (pl. treonin, aszparagin) helyettesíthető funkcionálisan, míg a szintén hat kodon által kódolt arginin helyettesítése az oldallánc által kialakított lehetséges H-kötés erősségének egyértelmű csökkenéséhez vezet.

Bár vizsgálataink nem erre a kérdésre irányultak, a kísérleteink során nyert adatok érdekes információkat nyújtottak a WT hCFTR csatornák nem-hidrolitikus záródási sebességére vonatkozóan is. Tekintve, hogy különböző nem-hidrolitikus mutációk (hE1371S, hE1371Q, hD1370N) különböző τ_{burst} értéket, ezáltal különböző záródási sebességi együtthatót ($k_{nh} = 1/\tau_{burst}$) eredményeznek, így felmerülhet a kérdés: mekkora valószínűségben a nem-hidrolitikus záródási sebesség? Minthogy a WT csatornák nem-hidrolitikus záródási sebességének az ATP-hidrolízis sebességétől való elkülönítésére jelenleg kísérleti megoldás nem ismert, így k_{nh} értékéről jelenleg csak annyit lehet sejteni, hogy az a hD1370N ($k_{nh} \sim 0.5 \text{ s}^{-1}$) és a hE1371Q ($k_{nh} \sim 0.0021 \text{ s}^{-1}$) mutánsok záródási sebességi együtthatói közé esik.

A katalitikus glutamát oldallánc különféle nem-hidrolitikus mutációinak (E ↔ S / Q) eltérő hatása a humán és zebrahal ortológban tovább fokozza az alkalmazott nem-hidrolitikus mutáció jelentőségét. Míg az E-S mutáns esetén a hCFTR és zCFTR nem-hidrolitikus záródási sebességi együtthatója igen hasonló (0.027 s^{-1} és 0.018 s^{-1}), addig az E-Q mutáns esetén jelentős különbség állapítható meg (0.0021 s^{-1} és 0.013 s^{-1}). Ezen eltérést az OF-z/hCFTR szerkezetek NBD kölcsönhatási felszíneinek különbségei kell, hogy magyarázzák. Érdekes, hogy míg az OF-hCFTR esetén a hE1371Q oldallánc egy lehetséges H-kötést sejtet a hG576 peptidgerinc karbonil-csoportjával, addig az OF-zCFTR esetén ezzel analóg kölcsönhatás nem figyelhető meg. Ugyanakkor a valós mechanisztikus okok tisztázása további kísérleteket igényelne.

További fontos tapasztalatunk, hogy az egyes mutációk hatása is függ az alkalmazott nem-hidrolitikus háttérmutációtól: a hR117H mutáció τ_{burst} értékét rendre ~ 30 -adára és ~ 5 -ödére csökkenti a hD1370N és a hE1371S konstrukciókban (10B és

8D ábrák), azaz a h117-h1124 kötés kölcsönhatási energia változása a $B \rightarrow T^\ddagger$ átmenet során különböző (2.8 kT és 1.4 kT; 10E és 8E ábrák). Ebből arra következtethetünk, hogy a B állapotban az ECL hurkok elrendeződése nem teljesen azonos a két háttérmutáció esetén; azaz a h117 és h1124 pozíciók közti távolság, s így a köztük kialakuló H-kötés energiája is különbözik. Ismét felmerülhet a kérdés, melyik érték áll közelebb a WT CFTR-ben kialakuló H-kötés energiájához? Egy korábbi tanulmány alapján (56) a burst \rightarrow interburst átmenet sebességi állandója (k_{záródás}) WT csatornák esetén a hR117H mutáció hatására $\sim 3.5 \text{ s}^{-1}$ -ről mintegy $\sim 11 \text{ s}^{-1}$ -ra nőtt. Minthogy a poszthidrolitikus B állapot élettartama igen rövid (51), ezen sebességi együtthatók a prehidrolitikus B állapot élettartamát tükrözik (a WT és mutáns csatornák esetén), s közelíthetők az ATP hidrolízis (k_h), valamint a nem-hidrolitikus záródás (k_{nh}) sebességi együtthatók összegével ($k_{záródás} \sim k_h + k_{nh}$). Mivel a WT csatornában $k_{nh} \ll k_h$, de legalábbis $k_{nh} < 0.5 \text{ s}^{-1}$ (hD1370N) (51), ezért $k_h > 3 \text{ s}^{-1}$. Feltételezve, hogy a hR117H mutáció nem befolyásolja k_h értékét ($k_h \sim 3 \text{ s}^{-1}$), a hR117H csatornák esetén k_{nh} értéke $\sim 8 \text{ s}^{-1}$ kell legyen, tehát a becslés alapján a WT csatornák k_{nh} értékét a hR117H mutáció legalább 16-szorosára növeli, ami inkább a hD1370N háttérben mért adatokkal van összhangban.

Bár az adatok alapján a modellfüggő analízis révén a két lehetséges lineáris séma között nem tehető különbség; néhány kvalitatív jellegű érv mégis a $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$ mechanizmust támogatja inkább. Egyrészt, a kizárólagosan az O állapotban fennálló hR117-hE1124 kötés a $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ séma esetén két alapvetően eltérő konformáció változás ($C_s \leftrightarrow O$ és $C_f \leftrightarrow O$) során is kialakulna / felszakadna, míg a $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$ séma esetén a kötés kialakulására / felszakadására csak a $C_f \leftrightarrow O$ lépés során kerülne sor. Ilyen értelemben ez utóbbi mechanizmus egyszerűbb magyarázatot kínál a csatorna kapuzására ('argument of parsimony').

Másrészt, a zS109-zN120 és a hS108-hI119N kölcsönhatások mind a C_f állapotban, mind a burst-interburst átmenet aktivált (T^\ddagger) állapotában létrejönnek, de nem alakulnak ki sem az O, sem a C_s állapotokban (17. ill. 20. ábra). A $C_s \leftrightarrow T^\ddagger \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$ mechanizmust feltételezve tehát a kötés két egymástól kinetikailag szeparált állapotban állna fenn, azaz kialakulása / felszakadása három különböző konformáció változás ($C_s \leftrightarrow T^\ddagger$, $O \leftrightarrow T^\ddagger$, $C_f \leftrightarrow O$) során is végbemenne. Ezzel szemben, a $C_s \leftrightarrow T^\ddagger \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$ séma esetén a kötés két egymással kinetikailag összefüggő állapotban állna fenn, azaz kialakulása / felszakadása csak két konformáció változással ($C_s \leftrightarrow T^\ddagger$, $C_f \leftrightarrow O$) járna

együtt. Így ismét ez utóbbi mechanizmus magyarázza egyszerűbben a kölcsönhatási energiák tapasztalt változásait.

Mindazonáltal, miután az irodalmi adatok és az általunk mért összes adat mindkét lineáris modellel összefér, lehetséges, hogy a kiindulási, axiomatikus feltételezés, miszerint a C_s , C_f és O állapotoknak szükségszerűen egy lineáris sémába kell rendeződnie, helytelen. Ebből következne, hogy mindhárom állapot között lehetséges közvetlen átjárás, azaz a valóságot egy ciklikus séma írja le, amelyet hat sebességi állandó jellemez. Minthogy azonban a kísérleti adatokból csak négy paraméter nyerhető ki, a ciklikus modell sebességi állandóinak meghatározása nem lehetséges.

6. Következtetések

- Termodinamikai mutáns ciklus alkalmazásával igazoltuk, hogy a hR117 oldallánc és a hE1124 peptidgerinc karbonil-csoportja H-kötést hoz létre, amely stabilizálja a 'burst' állapotot.
- A hR117 aminosav különböző mutációi esetén ezen kötés hiánya vezet cisztás fibrózis kialakulásához.
- A hR117-E1124 aminosavak között kialakuló H-kötés csak a nyitott állapotban jön létre; sem a hosszú 'interburst', sem a rövid 'flickery' zárt állapotban nem alakul ki.
- A zebrahal ortológ burst állapotának stabilitása a humán CFTR csatornákéhoz hasonló, ugyanakkor a csatorna 'intraburst' nyitvatartási valószínűsége alacsonyabb, mint a humán ortológé.
- Míg a humán ortológban az E1371Q és E1371S nem-hidrolitikus mutációk eltérő módon befolyásolják a csatorna nem-hidrolitikus záródási sebességét, addig a zebrahal CFTR esetén az E1372Q és E1372S nem-hidrolitikus mutációk fenotípusai hasonlóak.
- A zebrahal CFTR esetén a zR118H mutáció nincs hatással a csatorna nem-hidrolitikus záródási sebességére, azaz az arginin oldallánc a zebrahal ortológban nem stabilizálja a burst állapotot.
- A zebrahal CFTR-ben található zS109 aminosav központi szerepet játszik. Egyrészt a zN120 aminosav oldalláncával H-kötést képez, amely stabilizálja a flickery zárt állapotot. Továbbá egy jelenleg ismeretlen aminosavval kölcsönhatva stabilizálja a nyitott állapotot. Feltehetően a zCFTR csatornában ezen alternatív stratégia helyettesíti a humán ortológ hR117-hE1124 kölcsönhatása okozta stabilizációt.
- Az OF-zCFTR szerkezet nem a nyitott, hanem a flickery zárt állapotot jeleníti meg, szemben az OF-hCFTR szerkezettel, amely a nyitott konformációt közelíti.
- Bár a zN120 pozícióban található aszparagin aminosav a törzsfejlődés során egy izoleucinra cserélődött a magasabb rendű gerincesekben, a zS109 pozíció szerinje megőrizte stabilizáló szerepét. Direkt kölcsönhatás révén a hS108 aminosav a hR117 oldallánccal együtt stabilizálja a nyitott állapotot.

- Az adatokból számolt modellfüggő sebességi állandókkal minden megfigyelésünk leírható, akár a $C_s \leftrightarrow O \leftrightarrow C_f$, akár a $C_s \leftrightarrow C_f \leftrightarrow O$ lineáris kapuzási séma feltételezése mellett, ez utóbbiak közti választás tehát kvantitatív érveléssel nem támasztható alá.

7. Összefoglalás

A CFTR anioncsatorna mutációi egy halálos, gyógyíthatatlan betegség, a cisztás fibrózis (CF) kialakulásához vezethetnek. A foszforilált CFTR kapuzása – amelyet a nukleotidkötő doménekben zajló ATP kötődés és hidrolízis hajt – ‘bursting’ viselkedéssel jellemezhető; a csoportos, rövid záródásokkal (C_f állapot) elválasztott, csatorna nyitások (O állapot) ‘burst’-öket (B állapot) alkotnak, amelyeket egymástól hosszabb zárt események (C_s állapot) választanak el. A humán (hCFTR) és zebrahal (zCFTR) ortológok a CFTR molekuláris evolúció mintegy két végpontját képviselik, közöttük számos szerkezeti és kapuzásbeli különbség figyelhető meg. A CF-et okozó hR117H mutáció csökkenti a vezetőképességet és gyorsítja a záródási sebességet, de nincs hatással a nyitási sebességre, mely arra utalt, hogy e pozíció stabilizálja a B állapotot. Az ATP-t kötött foszforilált CFTR szerkezetben a hR117 oldallánc a hE1124 peptidgerinc karbonil-csoportjával H-kötést képez, amely nem figyelhető meg az ATP-t nem kötött, nem foszforilált szerkezetben.

Feltételezve, hogy a hR117–hE1124 kölcsönhatás stabilizálja az O állapotot, nem-hidrolitikus háttérmutációk alkalmazásával, egycsatornás és makroszkópikus ‘inside-out patch clamp’ mérések segítségével vizsgáltuk az említett kölcsönhatás megzavarásának funkcionális következményeit, majd termodinamikai mutáns ciklusok révén meghatároztuk a kölcsönhatási szabadentalpiaváltozást. Azt találtuk, hogy a hE1124 Δ mutáció a hR117H mutációhoz hasonlóan felgyorsítja a záródási sebességet és csökkenti a burst-ön belüli nyitott időhányadot, a hR117H-hE1124 Δ dupla mutáció esetében azonban nem figyeltünk meg additivitást. Ezek alapján kijelenthető, hogy a hR117–hE1124 kölcsönhatás stabilizálja az O állapotot. Az ATP-t kötött foszforilált zCFTR szerkezetben ez a H-kötés nem figyelhető meg, valamint a zR118H mutáció nem befolyásolja a csatorna kapuzását. Ehelyett, az ATP-kötött foszforilált zCFTR szerkezet egy H-kötést sejtet a zS109 és zN120 oldalláncok között. Funkcionális mérésekkel igazoltuk, hogy a feltételezett H-kötés kizárólag a C_f állapotban jön létre. Bár a hCFTR analog pozíciójában izoleucin található, meglepő módon a hS108A mutáció hR117H-szerű fenotípust eredményez, és e két mutáció hatása nem additív. Összefoglalva, a zCFTR-ben a zS109-zN120 kölcsönhatás stabilizálja a C_f állapotot, míg a hCFTR-ben a hS108-hR117-hE1124 kölcsönhatások együttesen stabilizálják az O állapotot.

8. Summary

CFTR anion channel mutations cause the lethal and incurable disease cystic fibrosis (CF). Gating of phosphorylated CFTR is driven by ATP binding/hydrolysis at two nucleotide-binding domains, and exhibits ‘bursting’ behavior: groups of openings (state O) separated by short ‘flickery’ closures (state C_f) form ‘bursts’ (state B) that are flanked by long ‘interburst’ closures (state C_s). The human (hCFTR) and zebrafish (zCFTR) orthologues represent roughly the two ends of CFTR molecular evolution, and possess different gating properties and differences in their structures. CF mutation hR117H decreases anion conductance and accelerates pore closure but does not affect opening rate. This suggests that position 117 moves late during the interburst-burst conformational change, and that the hR117 side chain stabilizes the B state. In the ATP-bound phosphorylated CFTR structure the hR117 side chain forms a strong H-bond with the hE1124 backbone carbonyl group, but that bond is absent in the ATP-unbound, unphosphorylated structure.

We aimed to investigate whether the hR117–hE1124 interaction stabilizes the O state. In non-hydrolytic backgrounds single-channel and macroscopic inside-out patch-clamp recordings allowed quantitation of gating-associated changes in interaction energy between the target positions through thermodynamic mutant cycles. We found that mutation hE1124 Δ accelerates closing rate and decreases intraburst open probability similarly to mutation hR117H, but no additivity was observed in the hR117H-E1124 Δ mutant. These findings reveal that the hR117/hE1124 interaction stabilizes exclusively the O state. In the outward-facing zCFTR structure that H-bond is not observed, and we found that zR118H mutation in zCFTR has no functional effect. Instead, we discovered a H-bond between the zN120 and zS109 side chains of ATP-bound phosphorylated-, but not ATP-free unphosphorylated zCFTR. Using functional experiments we confirmed that zS109 indeed forms a H-bond with zN120, but the bond is formed exclusively in the C_f state. In hCFTR a bond between the analogous positions cannot form, as an isoleucine (hI119) replaces the asparagine. Surprisingly, mutation hS108A produces a strong hR117H-like phenotype, and the effects of these two mutations are not additive. In conclusion, in zCFTR the zS109-zN120 interaction stabilizes the C_f state, whereas in hCFTR the hS108-hR117-hE1124 interactions cooperate to stabilize the O state.

9. Irodalomjegyzék

1. O'Sullivan BP, Freedman SD. (2009) Cystic fibrosis. *Lancet*, 373: 1891-1904.
2. Quinton PM, Bijman J. (1983) Higher Bioelectric Potentials Due to Decreased Chloride Absorption in the Sweat Glands of Patients with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 308: 1185-1189.
3. Widdicombe JH, Welsh MJ, Finkbeiner WE. (1985) Cystic fibrosis decreases the apical membrane chloride permeability of monolayers cultured from cells of tracheal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 6167-6171.
4. Shah VS, Ernst S, Tang XX, Karp PH, Parker CP, Ostedgaard LS, Welsh MJ. (2016) Relationships among CFTR expression, HCO₃⁻ secretion, and host defense may inform gene- and cell-based cystic fibrosis therapies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113: 5382-5387.
5. Csanady L, Vergani P, Gadsby DC. (2019) Structure, Gating, and Regulation of the Cfr Anion Channel. *Physiol Rev*, 99: 707-738.
6. Guggino WB. (1999) Cystic Fibrosis and the Salt Controversy. *Cell*, 96: 607-610.
7. Elborn JS. (2016) Cystic fibrosis. *The Lancet*, 388: 2519-2531.
8. Goodman BE, Percy WH. (2005) CFTR in cystic fibrosis and cholera: from membrane transport to clinical practice. *Advances in Physiology Education*, 29: 75-82.
9. De Boeck K, Amaral MD. (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*, 4: 662-674.
10. Zielenski J, Tsui L-C. (1995) CYSTIC FIBROSIS: GENOTYPIC AND PHENOTYPIC VARIATIONS. *Annual Review of Genetics*, 29: 777-807.
11. Lukacs GL, Verkman AS. (2012) CFTR: folding, misfolding and correcting the ΔF508 conformational defect. *Trends in Molecular Medicine*, 18: 81-91.
12. Bompadre SG, Li M, Hwang T-C. (2008) Mechanism of G551D-CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) Potentiation by a High Affinity ATP Analog*. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 5364-5369.
13. Heijerman HGM, McKone EF, Downey DG, Van Braeckel E, Rowe SM, Tullis E, Mall MA, Welter JJ, Ramsey BW, McKee CM, Marigowda G, Moskowitz

- SM, Waltz D, Sosnay PR, Simard C, Ahluwalia N, Xuan F, Zhang Y, Taylor-Cousar JL, McCoy KS, Group VXT. (2019) Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet*, 394: 1940-1948.
14. Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, Lands LC, McKone EF, Polineni D, Ramsey BW, Taylor-Cousar JL, Tullis E, Vermeulen F, Marigowda G, McKee CM, Moskowitz SM, Nair N, Savage J, Simard C, Tian S, Waltz D, Xuan F, Rowe SM, Jain R. (2019) Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *New England Journal of Medicine*, 381: 1809-1819.
 15. Sutharsan S, McKone EF, Downey DG, Duckers J, MacGregor G, Tullis E, Van Braeckel E, Wainwright CE, Watson D, Ahluwalia N, Bruinsma BG, Harris C, Lam AP, Lou Y, Moskowitz SM, Tian S, Yuan J, Waltz D, Mall MA, group VXs. (2022) Efficacy and safety of elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor versus tezacaftor plus ivacaftor in people with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a 24-week, multicentre, randomised, double-blind, active-controlled, phase 3b trial. *Lancet Respir Med*, 10: 267-277.
 16. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS. (2011) A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *New England Journal of Medicine*, 365: 1663-1672.
 17. Veit G, Vaccarin C, Lukacs GL. (2021) Elexacaftor co-potentiates the activity of F508del and gating mutants of CFTR. *Journal of Cystic Fibrosis*, 20: 895-898.
 18. Van Goor F, Yu H, Burton B, Hoffman BJ. (2014) Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. *J Cyst Fibros*, 13: 29-36.
 19. Dean M, White MB, Amos J, Gerrard B, Stewart C, Khaw K-T, Leppert M. (1990) Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell*, 61: 863-870.
 20. Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, Tsui L-C, Corey M, Levison H, Durie PR. (1995) Correlation of sweat chloride concentration with classes of

- the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *The Journal of Pediatrics*, 127: 705-710.
21. Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. (1993) Mutations in CFTR associated with mild-disease-form CI- channels with altered pore properties. *Nature*, 362: 160-164.
 22. Zhou J-J, Fatehi M, Linsdell P. (2008) Identification of positive charges situated at the outer mouth of the CFTR chloride channel pore. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 457: 351.
 23. Locher KP. (2016) Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23: 487-493.
 24. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C. (1989) Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science*, 245: 1066-1073.
 25. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, 1: 945-951.
 26. Ramjeesingh M, Li C, Garami E, Huan L-J, Galley K, Wang Y, Bear CE. (1999) Walker Mutations Reveal Loose Relationship between Catalytic and Channel-Gating Activities of Purified CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). *Biochemistry*, 38: 1463-1468.
 27. Gunderson KL, Kopito RR. (1995) Conformational states of CFTR associated with channel gating: The role of ATP binding and hydrolysis. *Cell*, 82: 231-239.
 28. Hung L-W, Wang IX, Nikaido K, Liu P-Q, Ames GF-L, Kim S-H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, 396: 703-707.
 29. Rai V, Gaur M, Shukla S, Shukla S, Ambudkar SV, Komath SS, Prasad R. (2006) Conserved Asp327 of Walker B Motif in the N-Terminal Nucleotide Binding Domain (NBD-1) of Cdr1p of *Candida albicans* Has Acquired a New Role in ATP Hydrolysis. *Biochemistry*, 45: 14726-14739.

30. Oldham ML, Chen J. (2011) Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 15152-15156.
31. Orelle C, Dalmas O, Gros P, Di Pietro A, Jault J-M. (2003) The Conserved Glutamate Residue Adjacent to the Walker-B Motif Is the Catalytic Base for ATP Hydrolysis in the ATP-binding Cassette Transporter BmrA*. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 47002-47008.
32. Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC. (2005) CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature*, 433: 876-880.
33. Zhang Z, Liu F, Chen J. (2017) Conformational Changes of CFTR upon Phosphorylation and ATP Binding. *Cell*, 170: 483-491 e488.
34. Zhang Z, Liu F, Chen J. (2018) Molecular structure of the ATP-bound, phosphorylated human CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: 12757-12762.
35. Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang X-b, Riordan JR. (2002) The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover*. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 15419-15425.
36. Basso C, Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC. (2003) Prolonged Nonhydrolytic Interaction of Nucleotide with CFTR's NH₂-terminal Nucleotide Binding Domain and its Role in Channel Gating. *Journal of General Physiology*, 122: 333-348.
37. Liu F, Zhang Z, Csanady L, Gadsby DC, Chen J. (2017) Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell*, 169: 85-95 e88.
38. He L, Aleksandrov AA, Serohijos AWR, Hegedüs T, Aleksandrov LA, Cui L, Dokholyan NV, Riordan JR. (2008) Multiple Membrane-Cytoplasmic Domain Contacts in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Mediate Regulation of Channel Gating*. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 26383-26390.
39. El Hiani Y, Linsdell P. (2015) Functional Architecture of the Cytoplasmic Entrance to the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channel Pore. *J Biol Chem*, 290: 15855-15865.
40. El Hiani Y, Negoda A, Linsdell P. (2016) Cytoplasmic pathway followed by chloride ions to enter the CFTR channel pore. *Cell Mol Life Sci*, 73: 1917-1925.

41. Gao X, Hwang T-C. (2015) Localizing a gate in CFTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 2461-2466.
42. Tabcharani JA, Linsdell P, Hanrahan JW. (1997) Halide Permeation in Wild-Type and Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channels. *Journal of General Physiology*, 110: 341-354.
43. Saint-Criq V, Gray MA. (2017) Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci*, 74: 93-115.
44. Mihalyi C, Iordanov I, Torocsik B, Csanady L. (2020) Simple binding of protein kinase A prior to phosphorylation allows CFTR anion channels to be opened by nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117: 21740-21746.
45. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. (1991) Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, 66: 1027-1036.
46. Winter MC, Sheppard DN, Carson MR, Welsh MJ. (1994) Effect of ATP concentration on CFTR Cl⁻ channels: a kinetic analysis of channel regulation. *Biophysical Journal*, 66: 1398-1403.
47. Tsai M-F, Li M, Hwang T-C. (2010) Stable ATP binding mediated by a partial NBD dimer of the CFTR chloride channel. *Journal of General Physiology*, 135: 399-414.
48. Chaves LAP, Gadsby DC. (2015) Cysteine accessibility probes timing and extent of NBD separation along the dimer interface in gating CFTR channels. *Journal of General Physiology*, 145: 261-283.
49. Bai Y, Li M, Hwang TC. (2011) Structural basis for the channel function of a degraded ABC transporter, CFTR (ABCC7). *J Gen Physiol*, 138: 495-507.
50. Wang W, Roessler BC, Kirk KL. (2014) An electrostatic interaction at the tetrahelix bundle promotes phosphorylation-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel opening. *J Biol Chem*, 289: 30364-30378.
51. Csanady L, Vergani P, Gadsby DC. (2010) Strict coupling between CFTR's catalytic cycle and gating of its Cl⁻ ion pore revealed by distributions of open channel burst durations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 1241-1246.
52. Simon MA, Csanády L. (2021) Molecular pathology of the R117H cystic fibrosis mutation is explained by loss of a hydrogen bond. *eLife*, 10: e74693.

53. Csanady L. (2009) Application of rate-equilibrium free energy relationship analysis to nonequilibrium ion channel gating mechanisms. *J Gen Physiol*, 134: 129-136.
54. Sorum B, Czege D, Csanady L. (2015) Timing of CFTR pore opening and structure of its transition state. *Cell*, 163: 724-733.
55. Csanady L, Mihalyi C, Szollosi A, Torocsik B, Vergani P. (2013) Conformational changes in the catalytically inactive nucleotide-binding site of CFTR. *J Gen Physiol*, 142: 61-73.
56. Yu YC, Sohma Y, Hwang TC. (2016) On the mechanism of gating defects caused by the R117H mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Physiol*, 594: 3227-3244.
57. Zhang J, Yu YC, Yeh JT, Hwang TC. (2018) Functional characterization reveals that zebrafish CFTR prefers to occupy closed channel conformations. *PLoS One*, 13: e0209862.
58. Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC. (2002) On the Mechanism of MgATP-dependent Gating of CFTR Cl⁻ Channels. *Journal of General Physiology*, 121: 17-36.
59. Cui G, Hong J, Chung-Davidson Y-W, Infield D, Xu X, Li J, Simhaev L, Khazanov N, Stauffer B, Imhoff B, Cottrill K, Blalock JE, Li W, Senderowitz H, Sorscher E, McCarty NA, Gaggar A. (2019) An Ancient CFTR Ortholog Informs Molecular Evolution in ABC Transporters. *Developmental Cell*, 51: 421-430.e423.
60. Infield DT, Strickland KM, Gaggar A, McCarty NA. (2021) The molecular evolution of function in the CFTR chloride channel. *J Gen Physiol*, 153: e202012625.
61. Zhang Z, Chen J. (2016) Atomic Structure of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Cell*, 167: 1586-1597.e1589.
62. Sorum B, Torocsik B, Csanady L. (2017) Asymmetry of movements in CFTR's two ATP sites during pore opening serves their distinct functions. *Elife*, 6: e29013.
63. Simon MA, Csanády L. (2023) Optimization of CFTR gating through the evolution of its extracellular loops. *J. Gen. Physiol*, 155: e202213264.

64. Csanady L, Vergani P, Gulyas-Kovacs A, Gadsby DC. (2011) Electrophysiological, biochemical, and bioinformatic methods for studying CFTR channel gating and its regulation. *Methods Mol Biol*, 741: 443-469.
65. Bartók Á, Csanády L. (2022) Dual amplification strategy turns TRPM2 channels into supersensitive central heat detectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119: e2212378119.
66. Csanády L. (2000) Rapid Kinetic Analysis of Multichannel Records by a Simultaneous Fit to All Dwell-Time Histograms. *Biophysical Journal*, 78: 785-799.
67. Csanády L, Chan KW, Seto-Young D, Kopsco DC, Nairn AC, Gadsby DC. (2000) Severed Channels Probe Regulation of Gating of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by Its Cytoplasmic Domains. *Journal of General Physiology*, 116: 477-500.
68. Colquhoun D, Sigworth FJ. Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records. In: Sakmann B, Neher E (szerk.), *Single-Channel Recording*, doi:10.1007/978-1-4419-1229-9_19. Springer US, Boston, MA, 1995: 483-587.
69. Horovitz A. (1996) Double-mutant cycles: a powerful tool for analyzing protein structure and function. *Folding and Design*, 1: R121-R126.
70. Mihalyi C, Torocsik B, Csanady L. (2016) Obligate coupling of CFTR pore opening to tight nucleotide-binding domain dimerization. *Elife*, 5.
71. Ittisoponpisan S, Islam SA, Khanna T, Alhuzimi E, David A, Sternberg MJE. (2019) Can Predicted Protein 3D Structures Provide Reliable Insights into whether Missense Variants Are Disease Associated? *J Mol Biol*, 431: 2197-2212.
72. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66: 486-501.
73. Cui G, Rahman KS, Infield DT, Kuang C, Prince CZ, McCarty NA. (2014) Three charged amino acids in extracellular loop 1 are involved in maintaining the outer pore architecture of CFTR. *J Gen Physiol*, 144: 159-179.
74. Chen JH, Xu W, Sheppard DN. (2017) Altering intracellular pH reveals the kinetic basis of intraburst gating in the CFTR Cl(-) channel. *J Physiol*, 595: 1059-1076.

75. Cai Z, Scott-Ward TS, Sheppard DN. (2003) Voltage-dependent gating of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel. *J Gen Physiol*, 122: 605-620.
76. Pless SA, Ahern CA. (2013) Unnatural amino acids as probes of ligand-receptor interactions and their conformational consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53: 211-229.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Márton A. Simon, László Csanády (2021) Molecular pathology of the R117H cystic fibrosis mutation is explained by loss of a hydrogen bond. *Elife*, 10:e74693. DOI: 10.7554/eLife.74693

IF: 8.713

Márton A. Simon, László Csanády (2023) Optimization of CFTR gating through evolution of its extracellular loops. *J Gen Physiol*, 55(4): e202213264. DOI: 10.1085/jgp.202213264

IF: 4.086

Egyéb közlemények:

Márton A Simon, Éva Bartus, Beáta Mag, Eszter Boros, Lea Roszjár, Gergő Gógl, Gilles Travé, Tamás A Martinek, László Nyitray (2022) Promiscuity mapping of the S100 protein family using a high-throughput holdup assay. *Scientific Reports*, 12(1): 1-11. DOI: 10.1038/s41598-022-09574-2

Márton A. Simon, László Nyitray (2021) Dynamic Control of Signaling by Phosphorylation of PDZ Binding Motifs. *Methods in Molecular Biology*, 2256: 179-192. DOI: 10.1007/978-1-0716-1166-1_11

Márton A. Simon, Péter Ecsédi, Gábor M. Kovács, Ádám L. Póti, Attila Reményi, József Kardos, Gergő Gógl and László Nyitray (2020) High throughput competitive fluorescence polarization assay reveals functional redundancy in the S100 protein family, *FEBS J*, 287: 2834-2846. DOI: 10.1111/febs.15175

Attila Tököli, Beáta Mag, Éva Bartus, Edit Wéber, Gerda Szakonyi, **Márton A Simon**, Ágnes Czibula, Éva Monostori, László Nyitray, Tamás A Martinek (2020)

Proteomimetic surface fragments distinguish targets by function, *Chemical Science*, 11(38): 10390-10398. DOI: 10.1039/D0SC03525D

Bence Kiss, Péter Ecsédi, **Márton Simon**, László Nyitray (2019) Isolation and Characterization of S100 Protein-Protein Complexes, *Methods in Molecular Biology*, 1929: 325-338, DOI: 10.1007/978-1-4939-9030-6_21

Gergő Gógl, Beata Biri-Kovacs, Fabien Durbesson, Pau Jane, Yves Nomine, Camille Kostmann, Viktoria Bilics, **Márton Simon**, Attila Remenyi, Renaud Vincentelli, Gilles Trave, Laszlo Nyitray (2019) Rewiring of RSK–PDZ Interactome by Linear Motif Phosphorylation, *Journal of Molecular biology*, 431: 1234-1249 DOI: 10.1016/j.jmb.2019.01.038

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék elsőként köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Csanády Lászlónak, aki mentoromként lehetővé tette számomra a laboratóriumi kutatómunkát, segítette szakmai fejlődésem mind elméleti, mind gyakorlati síkon, valamint nagylelkűen támogatta számos nemzetközi konferencián való részvételemet. Segítségével elsajátíthattam az elektrofiziológia alapjait, elmélyíthettem tudományos gondolkodásmódomat, továbbá élesíthettem kritikus látásmódomat.

Köszönettel tartozom munkatársaim, Dr. Szöllősi András, Dr. Iordan Iordanov, Dr. Tóth Balázs, Dr. Bartók Ádám, Dr. Mihályi Csaba és Závoti Olivér munkám során nyújtott segítségéért, kérdéseimre adott alapos válaszaikért, hasznos tanácsaikért.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Törőcsik Beátának, akinek révén elsajátíthattam a molekuláris biológiai műveleteket.

Köszönettel tartozom Dr. Nyitray Lászlónak, korábbi mentoromnak, akinek révén vegyészként elsajátíthattam a biokémia és szerkezeti biológia alapjait.

Köszönöm szüleim, András és Mónika; testvéreim, Réka és Gergely állhatatos támogatását, biztatását, mely révén nagymértékben hozzájárultak eme értekezés elkészítéséhez.

Kiemelt köszönet illeti feleségemet, Rékát; aki időt és energiát nem spórolva nap mint nap közvetve és közvetlenül segítette kutatómunkám, meghallgatta kétségeim, és kiutat mutatott a hullámvölgyekből.

Végezetül köszönöm fiam, Vilmos segítségét, aki bár semmilyen értelmezhető módon nem járult hozzá ezen értekezés elkészítéséhez, sőt bizonyos értelemben nem elhanyagolható akadályt is gördített elé; jelenléte, mosolya és egész lénye mégis az értekezés mielőbbi elkészítésére sarkalt.