

**A CFTR anioncsatorna extracelluláris régiójának a csatorna
működésére gyakorolt hatása**

Doktori Tézisek

Simon Márton András

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Csanády László
MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Varga Zoltán
MTA doktora, egyetemi docens
Dr. Hegedűs Tamás
Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

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

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

Budapest

2023

Bevezetés

A gerinces-specifikus cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) klorid ioncsatorna a döntően aktív transzportereket magába foglaló adenosin-trifoszfát (ATP) – kötő kazetta (ABC) fehérjék szupercsaládjába tartozik. A CFTR epitél sejtek apikális membránjában lokalizálódva a légutak, bél, máj és hasnyálmirigy só-víz transzportfolyamataiban játszik szekréciós szerepet. Mutációi egy halálos, jelenleg gyógyíthatatlan betegség, a cisztás fibrózis (CF) kialakulásához vezethetnek. A CF-et okozó hR117H mutáció drámaian gyorsítja a csatornák záródását és csökkenti az ionpermeáció sebességét a nyitott póruson keresztül.

Az egyetlen polipeptid láncból álló fehérje két – a csatorna pórusát képező – transzmembrán domént (TMD1/2) és két – az ATP kötéséért és hidrolíziséért felelős – nukleotidkötő domént (NBD1/2) foglal magába. A homológ molekulafeleket (TMD1-NBD1 és TMD2-NBD2) egy szabályozó szerepet betöltő domén (R domén) köti össze.

Az R domén protein kináz A (PKA) általi foszforilációját követően a citoszolikus NBD domének két ATP molekula megkötésével intramolekuláris dimert képeznek, melynek

hatására a TMD-k a befelé néző ('inward facing', IF) konformációból a kifelé néző ('outward facing', OF) konformációba rendeződnek, lehetővé téve az ioncsatorna pórusának megnyílását.

Nagyfelbontású egyedi csatornás áramregisztrátumokon a foszforilált CFTR kapuzása 'bursting' viselkedéssel jellemezhető; a csoportos csatorna nyitásokat ('burst') rövid záródások ('flickery closure') választják el egymástól, míg e 'burst'-öket egymástól hosszabb zárt szakaszok ('interburst') választják el. Ez alapján foszforilált csatornák esetén megkülönböztethető az interburst (C_s) és burst (B) állapot. Míg az előbbi IF konformációjú, valamint az NBD dimer részlegesen disszociált, addig az utóbbi (B) egy kompozit állapot, amely magába foglalja a nyitott (O) és flickery zárt (C_f) állapotokat. Míg a B állapotra általánosan jellemző a szoros, ATP-kötött NBD dimer, az ionok vándorlása csak az O állapotban lehetséges. Az igen stabil B állapot az ATP hidrolízise révén ér véget, s a nukleotid cserét (ADP-ATP) követően a csatorna visszatér a C_s állapotba.

A nagyfokú szekvencia homológia ellenére, a humán (hCFTR) és a zebraahal (zCFTR) ortológok jelentős szerkezeti és funkcionális különbségeket mutatnak. Bár a két ortológ IF

konfigurációjú szerkezetei megfeleltethetők egymásnak, az OF hCFTR szerkezet majdnem nyitott (azaz egy dehidratált klorid ion transzportja lehetséges), míg a zCFTR pórusa egyértelműen zárt; továbbá a zCFTR esetén kevésbé szoros NBD dimer, valamint a TMD-k megváltozott konformációja figyelhető meg a hCFTR-hez képest. Funkcionális mérések alapján a két ortológ 'burst'-jeinek átlagos hosszúsága hasonló, ugyanakkor a zCFTR nyitvatartási valószínűsége (P_o) jóval alacsonyabb, valamint vezetőképessége is kisebb a hCFTR-éhez képest.

Célkitűzés

Mivel szokatlan, hogy egy extracelluláris pozíció mutációja markáns kapuzási defektust okozzon és befolyásolja a B állapot stabilitását, e jelenség megértése végett célul tűztem ki a hR117H mutáció molekuláris kórélettanának felderítését, mely a mechanizmus megértésén túl orvosbiológiai alkalmazásokra is jelentős hatással lehet.

Amennyiben a hR117 pozíció közvetlenül befolyásolja a humán ortológ B állapotának stabilitását, akkor – a zebrahal és a humán ortológ extracelluláris régiói közti szerkezeti különbségek ismeretében – lehetséges, hogy összefüggés mutatkozik a hR117 / zR118 oldalláncok eltérő konformációi valamint a funkcionális különbségek között. Ez utóbbi összefüggés vizsgálata a CFTR kapuzási energetikájának pontosabb megértésén túl annak molekuláris evolúciójával kapcsolatban is értékes információt adhat.

Módszerek

Molekuláris Biológia. A zCFTR és hCFTR konstrukciókat békapetesejt (pGEMHE) és emlős sejt (pCDNA) expressziós vektorokba klónoztuk. A pontmutációkat 'Quick change' mutagenézis révén hoztuk létre, és dezoxiribonukleinsav (DNS) teljes szekvenálásával ellenőriztük. A fehérjét kódoló ribonukleinsavat (RNS) a kódoló DNS *in vitro* átírásával állítottuk elő.

Xenopus laevis petesejtek preparálása és injektálása. A petesejteket a béka petefészek lebenyéből mechanikai disszociáció és kollagenázos emésztés révén izoláltuk. Az egyedi csatornás vagy makroszkópikus mérésekhez 0.1-10 ng CFTR RNS-t injektáltunk, a sejteket 18°C-on inkubáltuk. A méréseket az injekció után 1-3 nappal végeztük.

Izolált membrános 'inside-out' 'patch clamp' mérések. A mérésekhez használt pipetta oldat N-metil-D-glukamint (NMDG), MgCl₂-t és HEPES-t tartalmazott (pH 7.4). A patch pipetta hegyét a membránfolt kiszakítását követően a folyamatosan áramló kádolatba merítettük. A kádolat a pipettaoldathoz képest EGTA-t is tartalmazott (pH 7.1).

Számítógép-vezérelt szelepek segítségével a kádolat összetételét ~100 ms-os időállanóval tudtuk lecserélni. Méréseinket 25 °C-on végeztük. Az áramokat 2 kHz-en szűrtük és 10 kHz-en digitalizáltuk. Az egyedi-csatornás méréseket -80 mV / -120 mV-os, a makroszkopikus szegmenseket -20 / -40 / -60 / -80 mV-os membránpotenciálokon mértük.

Nem-hidrolitikus mutánsok makroszkopikus áramrelaxációinak illesztése. A kiszakított membránfoltban lévő csatornákat először foszforiláltuk (ATP + PKA), majd a csatornák zárását követően az áramot ATP alkalmazásával újraaktiváltuk, és regisztráltuk az ATP elvonására bekövetkező áramrelaxációt. Az áramregisztrátumot 100 Hz frekvencián szűrtük, az áramrelaxációját egyszerű exponenciális egyenlettel illesztettük, melynek időállanója megadta a nem-hidrolitikus burst átlagos hosszát (τ_{burst}), valamint a nem-hidrolitikus záródás sebességi állanóját ($k_{nh}=1/\tau_{burst}$).

Az intraburst egyensúlyi állanó (K_{eq}/B) meghatározása. Ezen analízis során a makroszkópos relaxációknál leírt protokollt alkalmaztuk. Az analízis az áramregisztrátum ATP elvonást követő azon szakaszára korlátozódott, amelyben már csak egy aktív csatorna kapuzott. A kiválasztott áramregisztrátumokat 100

Hz frekvencián szűrtük, majd automatikus alapvonal korrekciót követően félamplitúdó módszerrel idealizáltuk, mely során a kapuzási események időben rendezett listáját állítjuk elő. Az átlagos nyitott állapotban eltöltött időt (τ_{open}) és az átlagos flickery zárt állapotban eltöltött időt (τ_{flicker}) a nyitott illetve zárt állapotban eltöltött tartózkodási idők egyszerű aritmetikai átlagaiként számoltuk, $K_{\text{eq}}|B$ -t τ_{open} és τ_{flicker} hányadosaként definiáltuk.

Az egycsatornás mérések elemzése telítési ATP koncentráció mellett. A kiszakított membránfoltban található csatornák pefoszforilációját követően a csatornák kapuzását regisztráltuk telítési (5 mM) ATP koncentráció mellett. A szegmenseket 100 Hz-en történő szűrést és alapvonal korrekciót követően a félamplitúdó módszerrel idealizáltuk. A kapott eseménylistát különböző modellel illesztettük maximum likelihood módszerrel, majd a (modellfüggő) sebességi együtthatók felhasználásával kiszámoltuk a modellfüggetlen időparamétereket. A modellfüggetlen nyitási és záródási sebességi együtthatókat rendre $1 / \tau_{\text{interburst}}$ és $1 / \tau_{\text{burst}}$ formában határoztuk meg.

Termodinamikai mutáns ciklus. Egy vizsgált pozíciópár kölcsönhatási energiájának a különféle kapuzási állapotok közötti változását termodinamikai mutáns ciklusok alkalmazásával határoztuk meg. A háttérkonstrukció, a két vizsgált célpozíció mutánsai, valamint a duplamutáns felhasználásával meghatároztuk a kölcsönhatási energia változását két állapot között ($\Delta\Delta G_{\text{int}}$). Amennyiben a vizsgált pozíciók között nincs kölcsönhatás, vagy a kölcsönhatás erőssége nem változik az adott kapuzási lépés során, akkor $\Delta\Delta G_{\text{int}} \sim 0$. Ezzel szemben, a 0-tól szignifikánsan eltérő $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ érték állapotfüggő kölcsönhatást jelez, és egyben számszerűsíti annak erősségét.

Statisztika. Az adatok legalább 4 mérés átlagát és sztenderd hibáját mutatják. A statisztikai szignifikancia meghatározása Student t-teszt alkalmazásával történt.

Eredmények

A hR117H mutáció tanulmányozása végett elsőként megvizsgáltuk az IF és OF szerkezeteket a humán és zebra hal ortológ esetén. Azt találtuk, hogy az OF hCFTR szerkezetben a hR117 oldallánc egy lehetséges H-kötést alakít ki a hE1124-es pozíció peptidgerinc karbonilcsoportjával. Ezen kölcsönhatás nem figyelhető meg az IF hCFTR szerkezetben, így azt feltételeztük, hogy ez a kölcsönhatás a B állapot stabilizálásában játszik közre. Érdekes módon, e kötés nem figyelhető meg az OF (és IF) zCFTR-ben sem.

Ezt követően 'inside-out' konfigurációban makroszkópos relaxációk vizsgálatával meghatároztuk τ_{burst} értékét ún. nem-hidrolitikus háttérmutációk jelenlétében, amelyek a CFTR ciklikus kapuzását egy reverzibilis interburst – burst átmenetre egyszerűsítik (ily módon vizsgálható közvetlenül a B állapot stabilitása). Míg a hR117H mutáció nagymértékben csökkentette τ_{burst} értékét, addig a hE1124 pozíció oldallánc-mutációi (A, P, G) nem, vagy csak kis mértékben befolyásolták azt. Ezzel szemben a hE1124 deléción (hE1124 Δ) markáns, hR117H-szerű fenotípust okozott. Termodinamikai mutáns ciklus alkalmazásával ellenőriztük a pozíció pár közti kapcsoltságot. A

két szimpla mutáció hatásai a dupla mutánsban nem voltak additívak, a számolt $\Delta\Delta G_{\text{int}}(\text{B} \rightarrow \text{T}^\ddagger)$ értéke ~ 1.4 kT (k, Boltzmann állandó; T abszolút hőmérséklet) volt, mely összehasonlítható egy H-kötés átlagos energiájával (2-3 kT). Így kijelenthető, hogy a hR117H és hE1124 pozíciók közötti feltételezett H-híd a B állapotban létrejön, azonban a C_s állapot felé vezető átmeneti állapotban (T^\ddagger) megszűnik.

A mutáció 'interburst' (valamint 'burst') időtartamra gyakorolt hatását 'steady-state' mérések révén vizsgáltuk, telítési ATP koncentráció mellett. Azt találtuk, hogy a szimpla mutációk hatásai az interburst időtartamra additívan jelentkeznek a duplamutánsban ($(\Delta\Delta G_{\text{int}}(\text{C}_s \rightarrow \text{T}^\ddagger) \sim 0)$), ugyanakkor a bursthosszra gyakorolt hatások esetén ismét egyértelmű energetikai kapcsoltság figyelhető meg, $\Delta\Delta G_{\text{int}}(\text{B} \rightarrow \text{T}^\ddagger) \sim 2.8$ kT. Ezek alapján leszögezhető, hogy a kölcsönhatás a B állapotban kialakul, de nem jön létre sem a C_s sem a T^\ddagger állapotban.

Mínthogy a B állapot kompozit állapot (O és C_f állapotok), utolsó csatornás mérések révén meghatároztuk a célpozíciók mutációinak $K_{\text{eq}}|B$ értékére gyakorolt hatásait, illetve ezekből $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ értékét a két állapot között. Azt találtuk, hogy a két szimpla mutáció hatásai nem additívak a duplamutánsban, így

$\Delta\Delta G_{\text{int}}(\text{C}_f \rightarrow \text{O})$ értéke ~ 2.2 kT. Ennek alapján kijelenthető, hogy az hR117-E1124 kölcsönhatás kizárólag az O állapotban jön létre, és nem alakul ki sem a C_s , sem a C_f állapotokban.

Ezt követően kíváncsiak voltunk, van-e összefüggés a hR117 / zR118 oldalláncok különböző konformációja és a h/zCFTR ortológok eltérő kapuzása között. Első lépésként megvizsgáltuk a nem-hidrolitikus zCFTR τ_{burst} valamint $K_{\text{eq}}|B$ értékét. Azt tapasztaltuk, hogy τ_{burst} értéke (azaz a B állapot stabilitása) hasonló a hCFTR esetén mért értékhez, míg $K_{\text{eq}}|B$ értéke $\sim 1/55$ -öde a hCFTR ugyanazon értékének, mely konzisztens az irodalomban leírtakkal.

Megvizsgáltuk a zebra hal ortológban a zR118H mutáció hatását. Míg a hCFTR esetén a hR117H mutáció bevezetése jelentősen lecsökkentette τ_{burst} értékét, addig a zCFTR esetén a zR118H mutáció nem befolyásolta τ_{burst} értékét. Ugyanakkor, a zCFTR B állapotának stabilitása a hCFTR B-állapotának stabilitásával összemérhető, így feltételeztük hogy a zCFTR esetén egy alternatív stabilizációs stratégia érvényesül.

Ismét megvizsgálva az OF / IF z/hCFTR szerkezetek extracelluláris régióit, az OF zCFTR szerkezetben egy lehetséges

H-hidat fedeztünk fel a zS109 és zN120 pozíciópár között, amely nem figyelhető meg az IF zCFTR szerkezetben. Továbbá, a humán ortológban az aszparagin helyett egy izoleucin (hI119) található, és ez a szubsztitúció trendszerű evolúciós eloszlást mutat. Érdekes módon az OF szerkezet alapján direkt kapcsolat figyelhető meg a hS109 és hR117 pozíciók közt, így célul tűztük ki a potenciális zS109-zN120 és hS108-hR117 H-kötések vizsgálatát.

A zS109 és zN120 pozíciók esetén makroszkópos áramrelaxációk illesztése, valamint utolsó csatornás szegmensek elemzése révén meghatároztuk τ_{burst} és $K_{eq|B}$ értékét mind a négy konstrukció (háttér, szimpla mutánsok, duplamutáns) esetén. Azt tapasztaltuk, hogy a szimpla mutációk hatásai $K_{eq|B}$ -re nem additívak a duplamutánsban, ugyanakkor a τ_{burst} -re gyakorolt hatások additívak. Termodinamikai mutáns ciklusok alkalmazásával meghatároztuk $\Delta\Delta G_{int}$ értékeit, amelyek alapján a zS109-zN120 kölcsönhatás csak a C_f (valamint a C_s és B állapot közötti T^\ddagger) állapotban jön létre, de sem az O, sem a C_s állapotban nem alakul ki. Fontos azonban, hogy míg $K_{eq|B}$ értékét a zN120A mutáció növelte, addig a zS109A mutáció csökkentette, mely azzal magyarázható, hogy a zS109 oldallánc a C_f állapotot

stabilizáló fenti H-kötésén túl egy igen erős kölcsönhatást hoz létre az O állapotban egy másik – jelenleg ismeretlen – aminosavval.

A hCFTR esetén a hS108 oldallánc csonkolásának mind τ_{burst} , mind $K_{\text{eq}}|B$ értékére gyakorolt hatása hasonló a hR117H mutáció hatásaihoz, így a duplamutáns létrehozásával vizsgáltuk a két pozíció közötti energetikai kapcsoltságot. Azt találtuk, hogy a szimpla mutációknak sem τ_{burst} -re, sem $K_{\text{eq}}|B$ -re gyakorolt hatásai nem additívak a duplamutánsban, $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ értéke minden esetben 0-tól különböző és egy H-híd átlagos energiájával összehasonlítható ($\Delta\Delta G_{\text{int}}(B \rightarrow T^{\ddagger}) \sim 1.9$ kT és $\Delta\Delta G_{\text{int}}(C_f \rightarrow O) \sim 2.9$ kT). Ez egyértelmű kapcsoltságot bizonyít a két pozíció között, így kijelenthető, hogy a hS108-hR117 kölcsönhatás, a hR117-hE1124 kölcsönhatáshoz hasonlóan, csak az O állapotban valósul meg.

Végezetül, kíváncsiak voltunk, helyreállítható-e az ősi C_f állapotot stabilizáló H-híd, ezért létrehoztuk a hI119N pontmutációt, és vizsgáltuk e lehetséges kölcsönhatás energetikáját. Azt találtuk, hogy $K_{\text{eq}}|B$ esetén a szimpla mutációk hatásai nem additívak a dupla mutánsban, s a termodinamikai mutáns ciklusok révén meghatározott $\Delta\Delta G_{\text{int}}(C_f \rightarrow O)$ érték ~ 1.6

kT, azaz a hS108-hI119N kölcsönhatás a C_f állapotban létrejön, de nem alakul ki az O állapotban.

Következtetések

Legfontosabb következtetésünk, hogy termodinamikai mutáns ciklus alkalmazásával igazoltuk a szerkezet alapján feltételezett H-kötés meglétét a hR117 oldallánc és a hE1124 peptidgerinc karbonil-csoportja között, és igazoltuk, hogy az szelektíven a B állapotot stabilizálja. A hR117 aminosav különböző mutációi esetén ezen kötés hiánya vezet CF kialakulásához. A hR117-hE1124 aminosavak között kialakuló H-kötés csak az O állapotban jön létre; sem a hosszú C_s, sem a rövid C_f zárt állapotban nem alakul ki.

A zebrahal ortológ burst állapotának stabilitása a humán CFTR csatornáéhoz hasonló, ugyanakkor a csatorna intraburst nyitvatartási valószínűsége alacsonyabb, mint a humán ortológé.

A zebrahal CFTR esetén a zR118H mutáció nincs hatással a csatornák nem-hidrolitikus záródási sebességére, azaz az arginin oldallánc a zebrahal ortológban nem stabilizálja a B állapotot.

A zebrahal CFTR-ben található zS109 aminosav központi szerepet játszik. Egyrészt a zN120 aminosav oldalláncával H-kötést képez, amely stabilizálja a C_f állapotot. Másrészt, egy jelenleg ismeretlen aminosavval kölcsönhatva stabilizálja az O

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. A hCFTR-ben a hS108 aminosav direkt kölcsönhatás révén a hR117 oldallánccal együtt stabilizálja az O állapotot.

Saját publikációk

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*, 2023 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