

A CFTR kloridcsatorna vizsgálata molekula dinamikai szimulációk segítségével

PhD Disszertáció



Farkas Bianka Vivien

Témavezetők:

Hegedűs Tamás, PhD

Gáspári Zoltán, PhD

Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai és Bionikai Kar
Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

Budapest

2022

Kivonat

A cisztás fibrózis (CF) betegség kialakulása a CFTR/ABCC7 kloridcsatorna génjében bekövetkező mutációkra vezethető vissza. A cisztás fibrózis hátterében álló mutációk hatásmechanizmusának felderítése jelentős mértékben hozzájárulhat célzott terápiás vegyületek tervezéséhez. A hatóanyagok fejlesztési folyamatát nagymértékben elősegítik a CFTR kloridcsatorna atomi szintű szerkezeti és dinamikai vizsgálatából nyert információk.

A cisztás fibrózist okozó mutációk megzavarják a CFTR biogenezis egy vagy több lépését, illetve gátolják az ioncsatorna működését, ezért a kloridútvonal atomi szintű jellemzése és a kloridkonduktancia hatásmechanizmusának megismerése nagy jelentőséggel bír. A szerkezetvizsgáló módszerek fejlődése lehetővé tette nagy, membránba ágyazott fehérjék, mint amilyen a CFTR kloridcsatorna, atomi felbontású szerkezetének meghatározását. A krio-elektronmikroszkópia (krio-EM) segítségével megoldott szerkezetek lehetőséget teremtettek a CFTR ioncsatorna működésének, a CFTR-kloridvezetés szerkezeti hátterének *in silico* módszerekkel történő vizsgálatára. Az itt bemutatott munka során molekula dinamikai szimulációk segítségével meghatároztuk a CFTR ioncsatorna kloridion áteresztésére alkalmas útvonalait. Továbbá vizsgáltuk a CFTR krio-EM szerkezetekben megfigyelhető atipikus szerkezeti elem, a 8-as transzmembrán hélix (TM8) megtörésének hatását.

A CFTR fehérje első nukleotidkötő doménjét (NBD1) érintő, leggyakoribb cisztás fibrózist okozó mutáció az 508-as fenilalanin deléciója ($\Delta F508/F508del$). A $\Delta F508$ megakadályozza az NBD1 helyes feltekeredését (*fold*ing), ami egyrészt korai degradációhoz vezet, másrészt a sejtek plazmamembránjába kijutó $\Delta F508$ -CFTR fehérjék működését is gátolja, és ezek szerkezeti stabilitását csökkenti. A mutációk ezen típusa esetén a fehérje feltekeredésébe beavatkozva, a helyes szerkezetkialakítás támogatásán keresztül lehetne fokozni a terápiás hatékonyságot. Azért, hogy a mutáns NBD1 szerkezetének korrekciós mechanizmusát és stabilizálásának lehetőségeit feltárjuk, megvizsgáltuk az NBD1 letekeredési lépéseit és annak köztes szerkezeti állapotait. Egyedi molekula erőspektroszkópia kísérletekkel (AFM) tanulmányoztuk az NBD1 letekeredését. A kísérletek mellett a letekeredés atomi szintű jellemzését szimulációs módszerek alkalmazásával valósítottuk meg.

Szimulációs eredményeink olyan folyamatok atomi szintű leírását tették lehetővé, melyeket kísérleti módszerekkel nem, illetve csak rendkívül alacsony felbontással lehetséges vizsgálni. A dolgozatomban leírt eredmények rámutatnak arra, hogy a szimulációk és kísérleti módszerek kombinálása, összehasonlítása nagyban hozzájárulhat molekuláris szintű biológiai folyamatok megértéséhez.

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the gene of the chloride channel CFTR/ABCC7. Elucidating the mechanism of action of the mutations underlying cystic fibrosis could contribute significantly to the design of targeted therapeutic compounds. For the development of effective therapeutic agents, atomic-level structural and dynamic studies of the CFTR chloride channel are essential.

Mutations causing cystic fibrosis disrupt one or more steps of CFTR biogenesis or impair the function of the ion channel. Consequently, it is important to characterize the chloride pathway at the atomic level and to understand the mechanism of action of chloride conduction. Advances in structure determination methods have enabled atomic-resolution structural characterization of large membrane proteins, such as CFTR. The structures solved by cryo-electron microscopy (cryo-EM) provided an excellent opportunity to study the function of this ion channel, to investigate the structural background of CFTR chloride conduction using *in silico* methods. We described the chloride conducting pathways using molecular dynamics (MD) simulations and analyzed the effect of the atypical broken transmembrane helix 8 (TM8) characteristic to most of the cryo-EM CFTR structures.

The most frequent cystic fibrosis mutation affecting the first nucleotide-binding domain (NBD1) of the CFTR chloride channel is the deletion of phenylalanine in the position 508 ($\Delta F508/F508del$). This mutation prevents the correct folding of NBD1, leading to a premature degradation of the CFTR protein. Besides, the $\Delta F508$ -CFTR proteins that can reach the plasma membrane do not function properly and are characterized by reduced structural stability as well. For this type of mutation, therapeutic efficacy could be enhanced marginally by interfering with the protein folding to promote the formation of correct structures. To explore the mechanism of correction and stabilization of mutant NBD1 structure, our objective was to investigate the unfolding steps and intermediate states of NBD1. Therefore, we investigated the unfolding of NBD1 using single molecule force spectroscopy (AFM) experiments. In addition to the experiments, we characterized the unfolding at the atomic level using MD simulations.

Our simulation results allowed us to describe these processes at the atomic level that are not feasible with acceptable resolution using experiments alone. Furthermore, the methods and results described in my thesis show that the combination and comparison of simulation and experimental methods are important for testing the validity of the methods and contribute greatly to the understanding of biological processes at the molecular level.

Tartalomjegyzék

Kivonat.....	ii
Abstract.....	iii
Rövidítések jegyzéke	6
1. A CFTR kloridcsatorna vizsgálatának jelentősége	9
1.1. Cisztás fibrózis és annak molekuláris háttere	9
1.2. A CFTR fehérje szerkezete és működése	10
1.3. Klinikailag jóváhagyott hatóanyagok a cisztás fibrózis kezelésére	14
1.4. Az NBD1 feltekeredése és a $\Delta F508$ mutáció korrekciójának lehetőségei.....	16
1.5. Fehérjék működésének és feltekeredésének molekuláris szintű vizsgálata MD módszerek alkalmazásával.....	19
2. Motiváció és célok	22
3. A CFTR kloridion-útvonal azonosítása és az ioncsatorna-működés szerkezeti hátterének feltérképezése.....	23
3.1. A tanulmány motivációja és célkitűzései.....	23
3.2. Alkalmazott módszerek	24
3.2.1. Konformációs sokaság előállítása.....	24
3.2.2. Kloridcsatorna detektálása a generált szerkezeti sokaságban	25
3.2.3. Az azonosított kloridcsatorna jellemzése.....	26
3.2.4. Kloridionok vizsgálata a szimuláció során	27
3.2.5. TM8 kiegyenesítése és kloridionok ioncsatornán keresztüli átjutásának vizsgálata	29
3.2.6. Az adatok elemzéséhez és vizualizálásához felhasznált programok.....	29
3.3. Eredmények ismertetése	30
3.3.1. A CFTR kloridion-csatorna két citoszolikus bemeneti pórussal és egy, a membránrégió extracelluláris oldalán elhelyezkedő szűk keresztmetszeti régióval jellemezhető.....	30
3.3.2. A nyitott és zárt szerkezeteket eltérő kölcsönhatások jellemzik.....	35
3.3.3. A CFTR ioncsatorna két potenciális szelektivitási lépcsővel is rendelkezik.....	37
3.3.4. A szűk keresztmetszeti régión keresztül lehetséges a kloridion-transzlokáció.....	40
3.3.5. A megtört TM8 csökkenti az ioncsatorna nyitásának valószínűségét	43
3.4. Diskusszió	45
3.5. Összefoglalás	48

4. A CFTR kloridcsatorna NBD1 domén mechanikai letekeredésének vizsgálata.....	49
4.1. A tanulmány motivációja és célkitűzései.....	49
4.2. Alkalmazott módszerek	53
4.2.1. Az NBD1 és az <i>S6-a-S8 core</i> régió letekeredését reprezentáló szerkezeti sokaság előállítására szimulációs módszerekkel	53
4.2.2. Letekeredési útvonalak és köztes szerkezeti állapotok meghatározása	55
4.2.3. Intermedier szerkezetek jellemző kölcsönhatásainak vizsgálata	59
4.2.4. Kísérleti eredmények összehasonlítása a HA-MD szimulációkból nyert adatokkal	60
4.2.5. Adatok elemzéséhez és vizualizálásához felhasznált eszközök.....	64
4.3. Eredmények ismertetése	64
4.3.1. A G α szimulációk lehetővé tették az NBD1 letekeredési útvonalak feltérképezését hozzájárulva az AFM kísérleteink elemzéséhez.....	64
4.3.2. Egyes másodlagos szerkezeti elemek kötődése gyengébb a $\Delta F508$ mutáns esetén.....	66
4.3.3. A letekeredés utolsó szakaszán kialakuló intermedier szerkezetekre emelkedett számú nem-natív kölcsönhatás jellemző a vad típus esetén	70
4.3.4. Az F508 aminosav és környezetének nem-natív kölcsönhatásai fontos szerepet tölthetnek be az NBD1 feltekeredése során.....	74
4.3.5. A $\Delta F508$ mutáció elsősorban megakadályozza a fehérje helyes feltekeredését	76
4.4. Diskusszió	81
4.5. Összefoglalás	84
5. Tudományos eredmények összegzése.....	85
Publikációk jegyzéke	89
Köszönetnyilvánítás.....	91
Irodalomjegyzék	92
Függelék.....	101

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol kifejezés	Magyar megfeleltetés/magyarázat
AA-MD	All-Atom Molecular Dynamics	Minden atomra kiterjedő molekuladinamika
ABC	ATP-Binding Cassette	ATP-kötő kazetta
AFM	Atomic Force Microscopy	Atomerő-mikroszkópia
ATP	Adenosine Triphosphate	Adenozin-trifoszfát
BIA	5-bromoindole-3-acetic acid	5-bromoindol-3-ecetsav
cAMP	cyclic Adenosine MonoPhosphate	Ciklikus adenozin-monofoszfát
CD	Circular Dicroism spectroscopy	Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia
CHARMM36m	Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics 36 modified forcefield	Atomisztikus erőter MD szimulációkhoz
CF	Cystic Fibrosis	Cisztás fibrózis
CFTR	Cystic Fibrosis Conductance Regulator	Cisztás Fibrózis Konduktancia Regulátor
CH[1-4] / CL[1-4]	Coupling Helix (/Loop) [1-4]	Intracelluláris hurok [1-4]
COM	Center of Mass	Tömegközéppont
CV	Collective Variable	Kollektív változó
ΔF508/F508del	Deletion of Phenylalanine 508	Fenilalanin deléció az 508. pozícióban
ΔRI	Deletion of Regulatory Insertion	Regulátor inszerció deléciója
DBSCAN	Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise	Sűrűség alapú klaszterező algoritmus
DMD	Discrete Molecular Dynamics	Diszkrét molekula dinamikai (szimulációk)
EC	Extracellular	Extracelluláris
F508	Phenylalanine 508	Fenilalanin az 508. pozícióban
FES	Free Energy Surface	Szabadenergia-felszín
FRET	Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer	Förster-féle / fluoreszcencia rezonancia energia transzfer
H[1-7]	α -Helix [1-7]	α -hélix [1-7]

GROMACS	GRoningen MACHine for Chemical Simulation	MD szimulációk számítására fejlesztett szoftver
HA-Gō	Heavy-Atom Gō model	Nehéz atomokra kiterjedő Gō modell
HA-MD	Heavy-Atom Molecular Dynamics	Nehéz atomokra kiterjedő molekuladinamika
HDX-MS	Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry	Hidrogén-deutérium-csere tömegspektrometria
IC	Intracellular	Intracelluláris/citoszolikus
KDE	Kernel Density Estimate	Az eloszlás simítására alkalmazott módszer a vizualizálás során
krio-EM	cryo-EM, cryo-electronmicroscopy	Krio-elektronmikroszkópia
LINCS	LINear Constraint Solver	Kötéshosszok korlátozására fejlesztett algoritmus
MD	Molecular Dynamics	Molekula dinamikai (szimulációk)
MRP1	Multidrug Resistance Protein 1	Multidrog rezisztencia protein 1
NBD[1, 2]	Nucleotide-Binding Domain [1,2]	Nukleotidkötő domén [1, 2]
NPT	constant number (N), constant-pressure (P), and constant-temperature (T) ensemble	Állandó részecskeszámú, nyomású, és hőmérsékletű sokaság
NVT	constant number (N), constant-volume (V), and constant-temperature (T) ensemble	Állandó részecskeszámú, térfogatú, és hőmérsékletű sokaság
OPM	Orientations of Proteins in Membranes database	Adatbázis fehérjeszerkezetek membránon belüli térbeli elhelyezkedésére vonatkozó információval
PBC	Periodic Boundary Condition	Periodikus peremfeltétel
PDB	Protein Data Bank	Fehérjék térszerkezeti adatbázisa
PLUMED	A portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics	Plugin MD számításokat végző programokhoz
PME	Particle Mesh Ewald	Elektrosztatikus kölcsönhatások számításához fejlesztett algoritmus
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidyl-Cholin	Palmitoil-oleoil-foszfokolin
POPS	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidyl-Serine	Palmitoil-oleoil-foszfoserin
PyMOL	„Python for MOLecules”	Molekulaszerkezet-megjelenítő program
RD	Regulatory Domain	Regulátor domén
REX	Replica-Exchange	Replika-csere mintavételezés
RI	Regulatory Insertion	Regulátor inszerció

RMSD	Root-Mean-Square Deviation	Átlagos négyzetes eltérés
S[1-10]	β -Strand [1-10]	β -redő [1-10]
SCAM	Substituted Cysteine Accessibility Mutagenesis	Helyettesített cisztein-hozzáférhetőségi mutagenézis
SMOG2	Structure-based Models for Biomolecules	A szerkezet alapú modellekhez fejlesztett programcsomag
SUMO	Small Ubiquitin-like MOdifier	Az NBD1 expresszió hatékonyságának növelése céljából alkalmazott fehérje
TIP3P	Transferable Intermolecular Potential with 3 Points	3 kölcsönhatási ponttal rendelkező explicit vízmodell
TM	TransMembrane	Transzmembrán
TM[1-12]	TransMembrane (Helix) [1-12]	Transzmembrán hélix [1-12]
TMD[1, 2]	TransMembrane Domain [1,2]	Transzmembrán domén [1, 2]
VMD	Visual Molecular Dynamics	Molekulaszerkezet-megjelenítő program
WLC	Worm-Like Chain model	Biopolimerek entrópikus rugalmasságát jellemző modell
WT	Wild Type	Vad típus

1. A CFTR kloridcsatorna vizsgálatának jelentősége

1.1. Cisztás fibrózis és annak molekuláris háttere

A cisztás fibrózis (CF) egy súlyos lefolyású, autoszomális, recesszív módon öröklődő genetikai betegség, amely a leggyakoribb monogénes rendellenesség a kaukázusi populációban. Kialakulásáért az ABC (ATP-kötő kazetta) membránfehérje szupercsaládba tartozó CFTR/ABCC7 (Cisztás Fibrózis Transzmembrán Konduktancia Regulátor) fehérje génjét érintő mutációk felelősek. A CFTR a humán szervezet számos szervében megtalálható anioncsatorna, elsősorban kloridcsatorna, mely hámsejtek apikális plazmamembránjában helyezkedik el. Jelen van a légutakban, a gasztrointesztinális traktusban, a reproduktív rendszerben, valamint a verejték-, és nyálmirigyekben. A CFTR fehérje számos élettani folyamat szempontjából kulcsfontosságú. Jelentős szerepe van a hámsejtek só-, és folyadéktranszport szabályozásában azáltal, hogy ioncsatornaként működik, valamint más ioncsatornákat és transzportereket szabályoz. Mutációk jelenlétében a normál működésű CFTR fehérje funkcionális expressziója zavart szenvedhet, ami kiegyensúlyozatlan só-, és vízhomeosztázist eredményez. A súlyos megbetegedések és a halálozás fő oka a légzőfelület nagymértékű károsodásának tudható be. A kóros CFTR működésének következtében a légutak felszínét borító nyálka besűrűsödik, ami kedvez a kórokozók megtelepedésének, ami pedig tartós gyulladáshoz, végül pedig légzési elégtelenség kialakulásához vezet. [1]–[3]

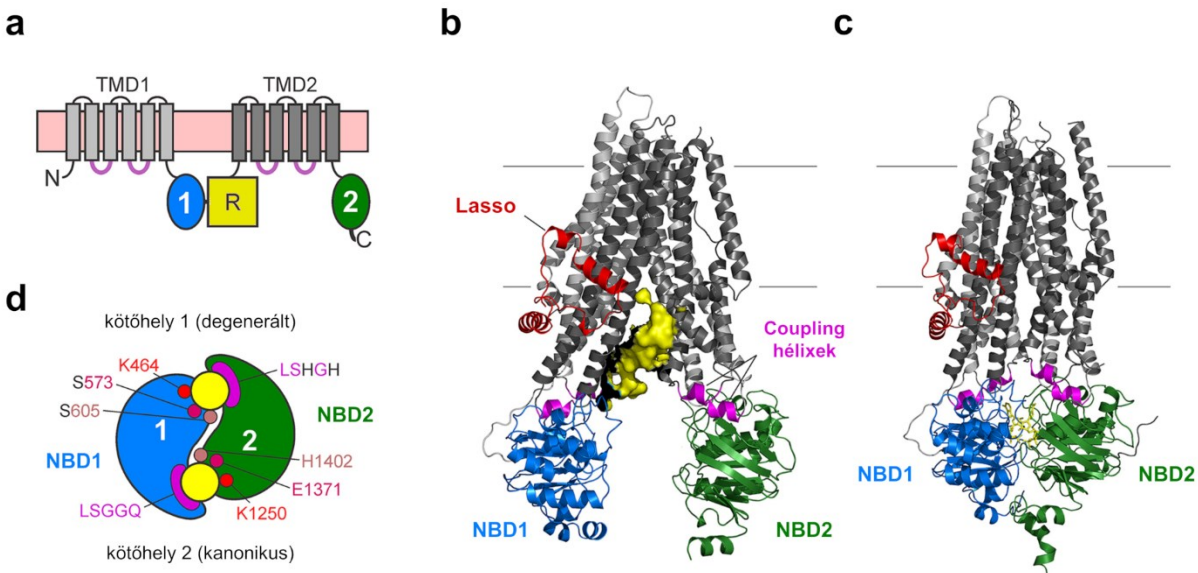
Számos, eddig összesen 401 cisztás fibrózis mutációt azonosítottak. (<https://cftr2.org/> 2022 április 29.) Ezek a mutációk a CFTR biogenezis egy vagy több lépését zavarják meg. Csoportosításuk is aszerint történik, hogyan károsítja az adott mutáció a fehérje előállítását (I: szintézis, és II: érés defektusa; V: lecsökkent fehérje mennyiség, VII: mRNS hiánya), a működését (III: kapuzás, és IV: konduktancia defektusa) vagy a stabilitását (VI. osztály) [4], [5]. A leggyakoribb cisztás fibrózis mutáció három nukleotid kiesése, ami az 508-as pozíciójú fenilalanin deléciójához ($\Delta F508/F508del$) vezet. A cisztás fibrózis hátterében a $\Delta F508$ mutáció áll az esetek 70%-ában. A következő leggyakoribb öt mutáció esetén 3%, vagy annál alacsonyabb az előfordulási gyakoriság (G542X: 3%, G551D: 2%, N1303K 2%, R117H: 1%, W1282X: 1%), míg a többi mutáció esetén ez már az 1%-ot sem éri el (<https://cftr2.org/> 2022 április 29.). A $\Delta F508$ mutáció hatását tekintve nem kategorizálható egyszerűen, mivel az F508 aminosav hiánya több hibát is eredményez. Ez a mutáció megakadályozza a CFTR helyes feltekeredését a fehérje érési defektusát okozva, ami korai degradációhoz vezet. Azonban azok a $\Delta F508$ -CFTR fehérjék, amelyek átjutnak az endoplazmatikus retikulum (ER) minőségi kontrollján, és kijutnak a sejtek plazmamembránjába, nem mutatnak megfelelő működést, illetve csökkent szerkezeti stabilitás jellemző rájuk [5].

1.2. A CFTR fehérje szerkezete és működése

A CFTR az ABC transzporter szupercsalád, azon belül is az ABCC exporter alcsalád tagja (ABCC7). Az ABC fehérjékre jellemzően két transzmembrán doménből (TMD1/2) és két nukleotidkötő doménből (NBD1/2) épül fel (1.1. ábra). A transzmembrán domének 6-6 transzmembrán (TM) hélixből állnak, ezek alakítják ki a sejtmembránon keresztüli iontranszport útvonalát. A nukleotidkötő domének ATP megkötésén keresztül alakítanak ki tranziens kölcsönhatást (dimerizálódnak), ami előidézi a nyitáshoz szükséges konformációváltozást és lehetővé teszi a kloridionok elektrokémiai gradiens mentén történő áramlását a TMD-ken keresztül [6]–[8].

Klinikai jelentősége miatt számos, a CFTR szerkezetét leíró, működésének megértésére irányuló tanulmányt végeztek. Először a szolubilis, transzmembrán doménektől szeparált nukleotidkötő domének szerkezetét vizsgálták kristályosítás és NMR spektroszkópia segítségével, ezért sokáig csupán az NBD1 szerkezete volt elérhető [9]. A krio-elektronmikroszkópia (krio-EM) lehetővé tette membránba ágyazott, teljes hosszúságú ABC fehérjeszerkezetek megoldását is. Az első ABC fehérje szerkezetének publikálása [10] után több CFTR homológiamodell is készült [11]–[14]. Ezek főbb jellemzőit megerősítették a legújabb teljes hosszúságú CFTR krio-EM szerkezetek (PDB ID: 5uak, 5uar, 5w81, 6msm, 6o1v, 6o2p, 6d3r, 6d3s) és részletesebb jellemzőikre molekula dinamikai (MD) szimulációk is rámutattak. Ez amellett érvel, hogy mind a krio-EM szerkezeteket, mind pedig az MD szimulációkat érdemes figyelembe venni a CFTR szerkezetének és működésének megértéséhez [15], [16].

A nukleotidkötő domének (NBD1/2) az ABC fehérjékre jellemző, mind szekvencia, mind pedig szerkezet tekintetében rendkívül konzervált ATP-áz alegységek. Két aldoménből épülnek fel, egy nukleotidkötő/katalitikus aldoménből (*catalytic core*, α/β -*core*) és az α -hélixekből álló α -alegységből (*ABC α -subdomain*). A katalitikus domén tartalmazza a magnézium és az ATP molekulák kötéséhez fontos, konzervált Walker A (konszenzus GXXXXGKS/T) és B (konszenzus $\Phi\Phi\Phi\Phi$ DE, Φ hidrofób) motívumokat, az α -alegység pedig az *ABC signature* (konszenzus LSGGQ) motívumot. A katalitikus domén vesz részt az ATP-kötőhely kialakításában, illetve rendelkezik ATP-áz aktivitással. A két ATP-kötőhely a két NBD között jön létre, az egyik NBD Walker A, B motívumai, valamint a másik NBD *ABC signature* motívuma alakítja ki. A katalitikus aktivitásban részt vevő aminosavakat a konzervált *switch* hisztidin tartja össze. A CFTR esetén a két kötőhelyet tekintve aszimmetria áll fenn. Az NBD1 Walker A, B motívummal rendelkező kötőhelyén (kötőhely 1) a katalitikus glutamát és a *switch* hisztidin helyett szerinek találhatók (NBD2: E1371, H1402 és NBD1: S573, S605), illetve az *ABC signature* motívum is atipikus (konszenzus LSGGQ helyett LSHGH). Ezen mutációk következtében ez a kötőhely degenerált, ugyan megköti az ATP molekulát, azonban nem képes hidrolizálni azt. [7] (1.1. ábra).



1.1. ábra – A CFTR domének elrendeződése és szerkezeti modellje. (a) A CFTR topológiája. TMD1 (világosszürke), TMD2 (sötétszürke), NBD1 (kék), NBD2 (zöld), R domén/RD (sárga), intracelluláris hurkok (lila) és membrán régió (lazac). A (b) foszforilálatlan, ATP nélküli, alul nyitott humán CFTR szerkezete (PDB ID: 5uak) és a (c) foszforilált, ATP-kötött, alul zárt zebrahal CFTR szerkezet (PDB ID: 5w81). Az ATP molekulák sárga pálcika jelöléssel vannak feltüntetve, a Lasso motívum (piros) és a coupling hélixek (magenta) színes cartoon reprezentációban láthatóak. A krio-EM elektronsűrűség térképeken megfigyelt, feltehetőleg az RD-hez tartozó elektronsűrűséget sárga felszín reprezentáció jelöli. (d) Az ATP-kötött NBD1/NBD2 heterodimer elrendeződésének szemléltetése: NBD1 (kék), NBD2 (zöld), ATP molekulák (sárga), Walker A motívum konzervált lizinek (K464 és K1250; piros) és ABC signature motívum (LSGGQ; magenta). A 2-es kötőhely esetén minden katalitikusan fontos oldallánc érintetlen (Walker B utáni konzervált glutamát (E1371, rózsaszín), konzervált switch hisztidin (H1402, lazac szín)), míg az 1-es kötőhely nem hidrolitikus (konzervált glutamát és switch hisztidin szerinekre történő szubsztitúciója (S573, S605)). Az NBD2 ABC signature motívuma atipikus (LSHGH).

Kép forrása: Csanády et al. *Structure, Gating, and Regulation of the CFTR Anion Channel*, *Physiological Reviews*, 2019.

Az NBD1 további érdekes tulajdonsága, hogy két β -redő (S1, S2) között egy ~40 aminosav hosszú regulátor inszerció (RI) található [17], ami destabilizálja az NBD1-et [18]. Mivel rendkívül flexibilis, így ez a fehérje szakasz nem látható a szerkezetekben. A nukleotidkötő domének konformációváltozásait az úgynevezett intracelluláris hurkok továbbítják a transzmembrán domének felé. Ezek a hurkok két szomszédos transzmembrán hélix (TM2/3, TM4/5, TM8/9 és TM10/11) intracelluláris folytatásaként jönnek létre, amelyeket egy-egy kis hélix köt össze (*coupling* hélixek/intracelluláris hurkok, CH1-4 vagy CL1-4 jelölés) [11] (1.1. ábra).

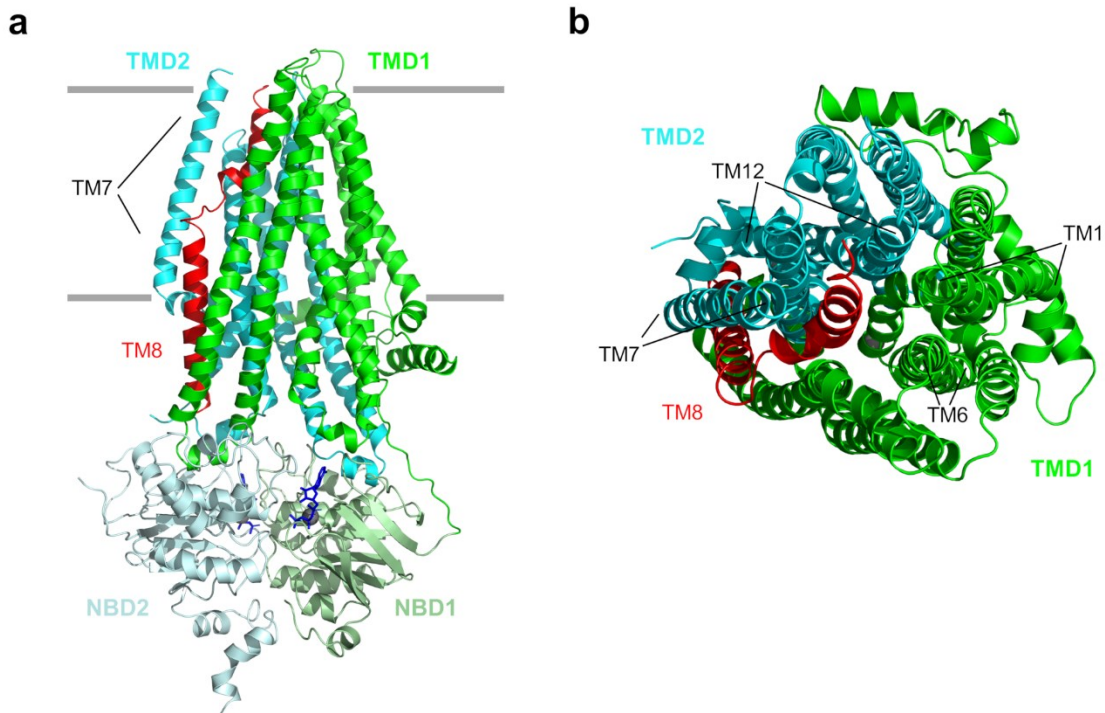
Az ABCC alcsaládra jellemző L0 motívumhoz hasonlóan a CFTR is rendelkezik egy N-terminális, Lasso/L0 motívummal, amely egy két hélixből álló peptidlánc [19] (1.1. ábra). Az egyik egy a membránnal párhuzamosan elhelyezkedő, amfipatikus hélix, mely szerepet játszik a CFTR szabályozásában [7], [20], [21]. Ezen kívül a CFTR az ABC szuperfamilia egyetlen képviselőjeként rendelkezik egy az NBD1 és a

TMD2 között elhelyezkedő, ~200 aminosav hosszú rendezetlen régióval, a regulátor doménnel (RD) (1.1. ábra). Az RD több foszforilációs helyet is tartalmaz, amelyek cAMP-függő protein kináz A (PKA) általi foszforilációja elengedhetetlen az ioncsatorna nyitásához [6], [7], [22]. A CFTR szerkezet meghatározásakor az elektronsűrűség térképeken alacsony felbontású elektronsűrűség indikálta a regulátor domén (RD) elhelyezkedését. Foszforiláció hiányában az RD a két nukleotidkötő domén közé ékelődött be és nyúlt fel a transzmembrán domének közé (PDB ID: 5uar [23], 5uak [24], 6d3r [25]). Foszforilációt követően az RD jelenléte nem volt megfigyelhető a szerkezetben (PDB ID: 5w81 [26], 6d3s [25]), illetve egy később publikált szerkezet esetén az RD-nek megfeleltethető, gyenge elektronsűrűséget figyeltek meg az NBD1-gyel kölcsönhatásban (foszforilált, ATP-kötött humán szerkezet, PDB ID: 6msm [27] és ez a szerkezet két vegyület jelenlétében, PDB ID: 6o2p, 6o1v [28]).

Az aktív módon működő ABC transzporterekben a szubsztrát transzlokációs útvonalán két kapu is található. Az extracelluláris oldali a kifelé nyitott (az alul zárt), míg az intracelluláris oldali a befelé nyitott (alul nyitott) állapotban nyílik meg. Ezzel szemben a CFTR fehérjében a nyitott ioncsatorna egy folytonos vizes pórust biztosít lehetővé téve az anionok membránon keresztül történő átáramlását [7]. Kísérleti tanulmányok, modellezés és a meghatározott szerkezetek alapján az intracelluláris oldali bemeneti pórus a TM4 és TM6 között helyezkedhet el, ahol egy laterális pórus köti össze a citoszolt a CFTR belső üregével. Ennek környékét pozitív töltésű aminosavak veszik körül, melyeknek az anionok pórushoz vonzásában lehet szerepe [7]. Az ABC fehérjékben jelenlévő, extracelluláris oldali kapunak megfeleltethető régió a CFTR egy beszűkülő szakaszán helyezkedhet el, mely közel van a külső membránfelszínhez a TM6 338–341 aminosavainak magasságában [7], [29], [30]. A foszforilált, ATP-kötött CFTR zebrahal szerkezetben (PDB ID: 5w81) ezen a szakaszon (TM6, TM1 és TM11 hélixek között) valamelyest kitágul a pórus, azonban az extracelluláris tér felé még mindig nem átjárható az ioncsatorna. A CFTR szerkezetek többségében jelenlévő megtört TM8 extracelluláris oldali szegmense és a TM12 lezárja a pórust, ezek lokális átrendeződése szükséges az extracelluláris oldali átjárhatóvá válásához [26]. Bár a CFTR szerkezeteket különböző konformációkban is meghatározták krio-EM segítségével, a CFTR kloridcsatorna pontos működési mechanizmusa még mindig nem tisztázott. Továbbá az aktív állapotú (foszforilált, ATP-kötött) szerkezetek sem tartalmaznak nyitott ioncsatornát, így a kloridion transzlokációs útvonala sem ismert.

A kísérleti úton meghatározott krio-EM szerkezetek többségében a TM8 hélix a membrán régióban egy szakaszon széttekeredett, megtört (kivéve PDB ID: 6d3r, 6d3s) (1.2. ábra). A TM8 megtörése több kérdést is felvet. Az α -hélixek megtörése a membrán régióban nem jellemző az ABC fehérjékre, így ezt a szerkezeti tulajdonságot homológiamodellezéssel sem lehetett előre jelezni. Továbbá, a TM hélixek pszeudoszimmetriáját is megzavarja a TM8 folytonosságának megszakadása. Ez azzal jár, hogy az ABC fehérjékre jellemző helyéről kimozdítja a TM7-et (1.2. ábra). Ennek következtében a központi üreg

nagyrészt a TM1-TM6 (TMD1) és TM8-TM12 (TMD2) által közrefogott [7]. Azonban a kísérleti úton meghatározott szerkezetek többségével szemben ugyan, de a csirkéből származó CFTR krio-EM szerkezetekben nem törik meg a TM8 (PDB ID: 6d3s és 6d3r). A TM8 szokatlan megtörése miatt szerkezetének és lehetséges szerepének vizsgálata a középpontba került. Szerkezeti megfigyelések alapján feltételezik, hogy a TM8-nak fontos szerepe van az ioncsatorna nyitásában [23], [24], [26], [31]. Corradi és munkatársai megfigyelték, hogy a megtört TM8 helyzete stabil hosszú szimulációkban, akár az ATP nélküli, akár az ATP-kötött konformációt vizsgálták. Emellett kimutatták, hogy a TM8 olyan kölcsönhatásokat létesített szimulációkban, melyek arra utalnak, hogy a TM8-nak szerkezeti szerepe lehet a pórus funkcionális architektúrájának fenntartásában. A szimulációk során a TM8 körüli kettősrétegben membránperturbációkat is megfigyeltek [32]. Chin és munkatársai szintén molekula dinamikai szimulációk segítségével lipid kölcsönhatásokat észlelt a külső membránrégióban a TM7 és TM9 közötti résben, a TM8 törése közelében [33]. Korábban kísérleti úton már igazolták, hogy a CFTR funkcióját lipid molekulák fokozhatják [33], [34], ezen megfigyelések összessége alapján arra következtettek, hogy a TM8 törése környékén lehet egy olyan régió, aminek konformációs szabályozását a lipidek befolyásolhatják vagy közvetíthetik [32], [33]. A TM8-on megfigyelhető rendezetlen szakasz (hélix megtörése) közel helyezkedik el az ioncsatorna nyitásában szerepet játszó transzmembrán régióhoz, valamint kis molekulás partnerek (ivacaftor, GLPG1837) jelentésében meghatározott szerkezetekben (PDB ID: 6o2p, 6o1v) ezek a vegyületek a TM8 megtört szakaszánál kötődnek a fehérjéhez. Habár ezek a kis molekulák fokozzák a CFTR funkciót növelve a nyitási valószínűséget, azonban kötődésük nem váltott ki a krio-EM szerkezetekben szignifikáns strukturális eltérést a vegyületek nélkül meghatározott szerkezethez képest (PDB ID: 6msm, RMSD=0.14 Å), és ezekben a szerkezetekben szintén zárt az ioncsatorna [28]. Így továbbra is kérdéses, hogy egy tényleges kötőhelyet takar-e a TM8 megtörése.



1.2. ábra – A *TM8* megtört állapotú a publikált *CFTR* szerkezetek többségében. A foszforilált, ATP-kötött, alul zárt (PDB ID: 5w81) *CFTR* szerkezet (a) a membrán síkjából és (b) arra merőlegesen, az extracelluláris oldal felőli nézetben az *NBD1-2* megjelenítése nélkül. A *TM8* felső szegmense a *CFTR* belseje felé néz, a *TM12* közreműködésével elzárják a pórust az extracelluláris oldalon. A *TMD1* (zöld), *NBD1* (halványzöld), *TMD2* (cián), *NBD2* (halványcián), és a *TM8* (piros). Az ATP molekulák (kék) pálcika megjelenítéssel látszódnak.

1.3. Klinikailag jóváhagyott hatóanyagok a cisztás fibrózis kezelésére

Számos tanulmány több hatóanyagot, illetve ezek kombinációját mutatja be, amelyek a *CFTR* biogenezisének, sejtmembránba szállításának és működésének bizonyos lépéseire hatnak [35], [36]. Ezek a kis molekulák a *CFTR* modulátorok, amelyek minőségileg és mennyiségileg növelik a *CFTR* fehérje aktivitását. A korrektorok a mutáns *CFTR* feltekeredésének (*fold*ing) és plazmamembránba jutásának javítására kifejlesztett vegyületek, illetve a potenciátorok a már plazmamembránba kijutott fehérjék működésének fokozására alkalmazható hatóanyagok csoportja.

Jelenleg négy, klinikailag jóváhagyott terápiás vegyület áll rendelkezésre. Az ivacaftor (VX-770; Kalydeco) egy potenciátor vegyület, melyet a G551D, az ionszatorna nyitását gátló (*gating*) mutáció kompenzálására fejlesztették ki. Korrektorok a lumacaftor (VX-809), ennek származéka a tezacaftor (VX-661), illetve az elexacaftor (VX-445) ([16], <https://www.cff.org/> 2022.08.05.). A korrektorok több csoportba sorolhatók hatásmechanizmusuk alapján. A különböző csoportokba tartozó hatóanyagok némelyike kombinálható, ami növeli hatásuk mértékét [37], [38]. Mivel a $\Delta F508$ mutáció mind a fehérje

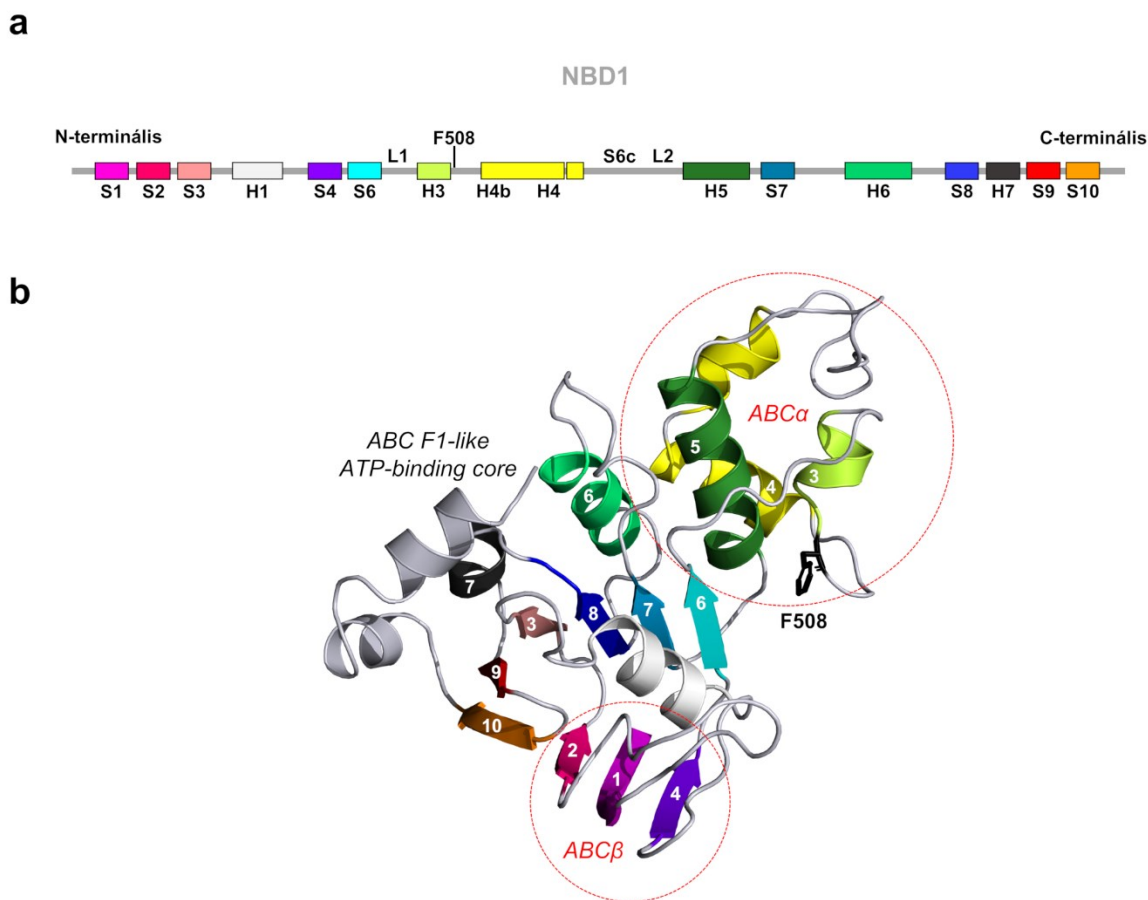
feltekeredését, mind pedig a működését károsítja, ezért a működés helyreállításához több vegyület kombinációját is alkalmazzák (lumacaftor + ivacaftor: Orkambi és tezacaftor + ivacaftor: Symdeko/Symkevi) [5]. Ezen terápiás módszerek alacsony hatékonysága miatt egy nemrég engedélyezett kezelés, a Trikafta vette át a korábbiak helyét. Ennek során a tezacaftor korrektort kombinálják egy további korrektor, az elexacaftor, valamint a potenciátor ivacaftor együttes alkalmazásával [38], [39].

Ezek a különböző vegyületek kombinációját alkalmazó terápiás módszerek javították a cisztás fibrózisban szenvedők várható élettartamát, azonban egyik kezelés sem jelent teljes gyógyulást [16]. Jelenleg a G551D, és ehhez hasonló *gating* (kapuzást befolyásoló) mutációk kezelése a legeredményesebb, míg a homozigóta $\Delta F508$ mutáció esetén csupán mérsékelt javulás érhető el [35]. Fontos lenne a kombinált terápia hatékonyságának javítása, mivel a hosszú távú ivacaftor kezeléshez hasonlóan a Trikafta alkalmazása is csupán részlegesen állítja helyre a CFTR funkciót. Emellett egyelőre az sem tisztázott, hogy a kloridcsatorna működésének részleges helyreállítása hosszú távon elegendő-e a tüdőfunkció romlásának megakadályozására [35], [38]–[41]. Továbbá kérdéses a hatóanyagok életem tartó alkalmazásának biztonságossága is, ugyanis a hatóanyagok súlyosabb mellékhatásairól is beszámolnak. Például a lumacaftor kezeléshez számos esetben nehézlégzés köthető, aminek következtében a kezelés felfüggesztésére volt szükség. Ezen tünetek molekuláris háttere még szintén nem tisztázott [35]. További probléma, hogy habár nagy arányban a $\Delta F508$ mutáció áll a cisztás fibrózis hátterében, azonban számos mutáció esetén még nem létezik részleges funkcióhelyreállítás sem [35].

Számos tanulmány vizsgálja az alkalmazott hatóanyagok korrekciós mechanizmusát. Egy krio-EM vizsgálat eredményei szerint a lumacaftor és a tezacaftor azonos hidrofób zsebbe kötődik (TMD1) a vad típusú CFTR szerkezetben, ahol négy hélixet (TM1,2,3 és 6) kapcsol össze és stabilizálhat ezáltal. Ez a szerzők szerint összhangban van más kutatások eredményeivel, miszerint a lumacaftor az izolált TMD1 feltekeredését segíti, ellenben más doménre nincs hatással [42]. Veit és munkatársai a Trikafta esetén allosztérikus korrekcióról számoltak be, mivel a $\Delta F508$ mellett más ritka mutációk részleges helyreállítását is megfigyelték sejtvonalakban [38]. Azonban még pontosan nem ismert, hogyan is hatnak ezek a vegyületek.

1.4. Az NBD1 feltekeredése és a $\Delta F508$ mutáció korrekciójának lehetőségei

Az 508-as fenilalanin, melynek deléciója ($\Delta F508$) a leggyakoribb cisztás fibrózist okozó mutáció, a CFTR első, N-terminális nukleotidkötő doménjén (NBD1) helyezkedik el. A nukleotidkötő domének (NBD-k) két aldoménből állnak. Egy nukleotidkötő/katalitikus alegységből (*catalytic core*, α/β -core), ami egy paralell β -redőből (*F1-like ATP-binding core subdomain*: S6, S7, S8, S3, S9 és S10; „S” mint *Strand*) és az ezt stabilizáló α -hélixekből (H1, H6, H7 és a C-terminális H8, H9; „H” mint *Helix*), valamint az ABC-specifikus, háromszálú, antiparallell β -redőből (S1, S2, S4; *ABC β -subdomain*) épül fel. Az NBD-k másik alegysége az α -hélixekből álló α -alegység (H3, H4, H4b, H5, S6c-b, *ABC α -subdomain*) [7]. Az F508 aminosav az NBD1 α -aldoménhez tartozó H3 és H4 α -hélixek közötti hurkon helyezkedik el (1.3. ábra).



1.3. ábra – A CFTR N-terminális (első) nukleotidkötő domén (NBD1) másodlagos szerkezeti elemeinek elrendeződése. Az NBD1 (a) domének szekvenciális elrendeződése és (b) egy 3D röntgenszerkezeten (PDB ID: 2bbo) alapuló, a regulátor inszerciót nem tartalmazó (ΔRI) szerkezete. Az NBD1 nukleotidkötő alegysége: F1-like ATP-binding core subdomain (β -redők: S6, S7, S8, S3, S9 és S10; α -hélixek: H1, H6, H7, H8, H9) és az ABC β (β -redők: S1, S2, S4) áll. Az NBD α -alegysége: ABC α (α -hélixek: H3, H4-H4b, H5). Az α -alegységben helyezkedik el az F508 aminosav is (fekete pálcika jelölés). A másodlagos szerkezeti elemeket színes téglalapok jelölik (S: β -redő, H: α -hélix).

Kutatások vizsgálták már a CFTR fehérje szerkezetének kialakulását, azonban a pontos folyamat még kevésbé ismert. Becslések szerint a CFTR szintézise jóval hamarabb befejeződik, minthogy a domének feltekeredése, majd összeszerelődése megtörténne [42]–[44]. A folyamat során a még nem teljesen feltekeredett fehérjék, köztes szerkezetek, az endoplazmatikus retikulumban tartózkodnak, és nagy részük lebontódik. Így a fehérjék kis százaléka jut csak ki a sejtfelszínre még a vad típusú CFTR esetén is [43], [45]. Ismert, hogy a leggyakoribb $\Delta F508$ mutáció, valamint a hasonló *fold*ing, azaz feltekeredést érintő mutációk destabilizálják az egyes doméneket és/vagy megakadályozzák a domének hatékony összeszerelődését a fehérje korai degradációjához vezetve. A $\Delta F508$ mutáció egyfelől megakadályozza az NBD1 és a többi CFTR domén közötti kölcsönhatások kialakulását, másrészt pedig csökkenti a jól feltekeredett fehérjék mennyiségét és az NBD1 feltekeredésére jellemző köztes szerkezeti állapotok közötti átmeneteket [11]. Kísérleti módszereket alkalmazó kutatások különböző $\Delta F508$ mutációk bevezetésével (*site-directed mutagenesis*) kimutatták, hogy a $\Delta F508$ azáltal károsítja a domének helyes feltekeredését és összeállását, hogy befolyásolja a négy strukturált domén, az NBD1/2 és a TMD1/2 közötti kölcsönhatásokat [46]–[48]. Mások ciszteinek keresztkötésén alapuló biokémiai kísérleteket felhasználva molekuláris modellezés segítségével vizsgálták az NBD1 domént és azt találták, hogy az F508 aminosav hidrofób oldallánca döntő szereppel bír az NBD1 és a 4-es intracelluláris hurok (*coupling* hélix 4, CH4 vagy CL4 jelölés) kapcsolat kialakításában [11]. Az izolált vad típusú (WT) és $\Delta F508$ -NBD1 termikus és izotermikus denaturálásának részletes biofizikai vizsgálatai (CD és intrinzik fluoreszcencia spektroszkópia, differenciális pásztázó fluorimetria, statikus fényszórás) pedig a mutáns domén jelentősen csökkent mértékű termodinamikai stabilitását mutatták ki [49], [50]. A $\Delta F508$ mutáció pontos szerkezeti hatását azonban még nem sikerült feltárni.

A gyógyszerfejlesztés elsődleges célja a $\Delta F508$ -CFTR feltekeredésének (*fold*ing) helyreállítása az NBD1 stabilitásának korrekciójával [51], vagy az NBD1 és az NBD1-CL4 kölcsönhatás instabilitásának célzottan történő helyreállításával [37], [52]. Mindkét korrekciós módszer valószínűleg csak a már feltekeredett NBD1-gyel rendelkező CFTR fehérjék esetén hatásos. Ezért azt is vizsgálják, hogy az NBD1 feltekeredése során kis molekulák képesek-e kompenzálni a $\Delta F508$ mutáció destabilizáló hatását. A BIA (5-bromoindol-3-ecetsav) egy kis molekula, amely bizonyítottan elősegíti a $\Delta F508$ -CFTR érését és mérsékelten stabilizálja a $\Delta F508$ -NBD1-et az emelkedett hőmérsékleten történő letekeredéssel szemben [37]. Ez a hatóanyag azonban csak igen magas koncentrációban (1-10 mM) volt hatékony *in vitro* kísérletekben [51]. Azt is kimutatták, hogy a BIA más hatásmechanizmussal állíthatja helyre a feltekeredést, mint a lumacaftor (VX-809) korrektor. Hudson és munkatársai NMR kísérletekkel igazolták, hogy a lumacaftor a S3, S9 és S10 β -redők által kialakított hidrofób felülethez kötődik. Kísérleteik alapján a BIA azonban az α -aldoménre lehet hatással, csak hogy a folyamat pontos hatásmechanizmusa még nem tisztázott [53]. Mivel a BIA stabilizálta az NBD1-et a termikus letekeredéssel szemben, valószínűleg az NBD1

feltekeredése után is a doménhez kötődve marad [37]. Így a kötőhelye és stabilizáló hatása háttérének megismerése terápiás jelentőséggel bír, segítve a BIA módosítását hatékonyságának növelése érdekében vagy új kötőanyagok tervezését.

Bár a CFTR biogenezisének első lépése, amelyet a $\Delta F508$ befolyásol, az NBD1 feltekeredése, csak néhány tanulmány vizsgálta ezt a folyamatot. Qu és munkatársai kimutatták, hogy a $\Delta F508$ mutáció megnövelte a feltekeredés folyamatától divergáló köztes szerkezeti állapotok valószínűségét, valamint hatással volt az ATP-kötőhely kialakulása előtti feltekeredésre, a feltekeredés kezdeti szakaszára [54], [55]. A kísérletek során izolált NBD1 feltekeredésének mennyiségét mérték spektroszkópai módszerekkel és azt találták, hogy az F508 aminosav befolyásolja a fehérje érési sebességét. Vizsgálataikból arra következtettek, hogy az F508 aminosav döntő fontosságú kapcsolatokat hoz létre a feltekeredés folyamata során. Érdekes módon Bartoszewski és munkatársai CD spektroszkópai mérésekkel és az emésztett RNS fragmentumok vizsgálatával (*mRNA folding assay*) megfigyelték, hogy a $\Delta F508$ mutációt eredményező három nukleotid deléciója az mRNS szerkezetének megváltozását okozza, ami a translációs sebesség csökkenéséhez vezet [56]. Bali és munkatársai azt is leírták, hogy az alacsonyabb translációs sebesség megváltozott CFTR-konformációkat eredményezett *pulse-chase* kísérleteikben [57]. Egy másik tanulmány sorozatban az NBD1 riboszómákon történő feltekeredését vizsgálták FRET spektroszkópia segítségével [58]–[60]. Kimutatták, hogy az NBD1 S1-S6 β -redőt tartalmazó N-terminális része akkor tekeredett fel, amikor az F508 aminosav még a riboszómában volt, és az F508 deléciója a domén feltekeredésének egy későbbi szakaszát befolyásolta [58]. Továbbá azt találták, hogy a riboszóma késleltette az α -aldomén és az S6 feltekeredését, ami elengedhetetlen volt az S7-S8 β -redők katalitikus aldoménbe történő helyes beilleszkedéséhez [59], [60]. Ezek az eredmények elsöre ellent mondanak a Qu és munkatársai által megfigyeltekkel, miszerint a $\Delta F508$ a feltekeredés kezdeti szakaszára van hatással [54], [55]. Ugyanakkor az N-terminális, katalitikus aldomén gyorsan és önállóan is feltekeredhet a Kim és munkatársai által végzett FRET kísérletek szerint [59], azonban az aldomén állapota feltehetőleg nem tud megfelelő környezetet biztosítani a megfelelő ATP-kötőhely kialakításához [54], [55]. Valószínűleg az eltérő típusú kísérletek a feltekeredés folyamatának különböző aspektusairól szolgáltatott adatokat. Ezek a kísérletek egyértelműen a megváltozott köztes szerkezeti állapotok tekintetében, azonban a felbontásuk alacsony volt.

Serohijos és munkatársai molekula dinamikai szimulációk segítségével vizsgálták az NBD1 feltekeredésének kinetikáját [1]. A számítások azt mutatták, hogy a helytelenül feltekeredett $\Delta F508$ -NBD1 megnövekedett arányát az S7-H6 hurok kölcsönhatásainak zavara okozhatta. Feltételezhető, hogy a globális CFTR feltekeredését befolyásoló NBD1 és TMD-k helytelen elrendeződése [61] és a CFTR fehérje csökkent termodinamikai, kinetikai stabilitása [62] a $\Delta F508$ -NBD1-ben található lokális hatásokból eredhet.

1.5. Fehérjék működésének és feltekeredésének molekuláris szintű vizsgálata MD módszerek alkalmazásával

Fehérjék feltekeredésének vizsgálatát számos biokémiai és spektroszkópia módszer lehetővé teszi, azonban ezek többségének jellemzője, hogy alacsony felbontásúak és nem szolgáltatnak atomi szintű információt a folyamatról. Habár a kísérleti úton megoldott, statikus fehérjeszerkezetekben ionok áthaladási útvonala jelen lehet, a CFTR szerkezetekben a kloridcsatorna nem látható. Ezeknek a felmerülő kérdéseknek a megválaszolására kísérletet lehet tenni molekula dinamikai (MD) szimulációk alkalmazásával, amely lehetővé teszi molekuláris rendszerek atomi szintű dinamikájának követését. Ezt az elméleti módszert széles körben alkalmazzák fehérjék (és más biomolekulák) szerkezeti, dinamikai és termodinamikai vizsgálatára.

Atomi szintű kölcsönhatásokat legpontosabban kvantummechanikai számításokkal lehet leírni, ezek azonban nagyobb molekulák esetén, mint amilyenek a fehérjék is, olyan magas számítási igénnyel rendelkeznek, hogy a jelenlegi számítási kapacitással nem modellezhetőek. Közelítések bevezetésével azonban nagyobb biológiai rendszerek kölcsönhatásainak, tulajdonságainak számítása is elérhetővé válik. A molekuláris dinamika klasszikus mechanikai közelítéseket alkalmaz, a rendszerben jelen lévő atomok, mint töltéssel rendelkező tömegpontok, a klasszikus dinamika törvényei szerint mozognak a rájuk ható erők következtében. A szimulációk során az atomok mozgását leíró egyenletek numerikus megoldásával kapjuk meg a rendszer energiájának változását. Molekuláris dinamika esetén a rendszer energiáját csak az atommagok helyzetéből származtatott kölcsönhatások határozzák meg, az elektronokat és kvantumkémiai tulajdonságokat nem veszi figyelembe ez a módszer.

A számításokhoz a rendszer teljes energiáját úgynevezett erőterek segítségével határozhatjuk meg. Ezek a kölcsönhatásokat leíró potenciál függvények, illetve az egyenletek megoldásához szükséges rendszerfüggő paraméterek összessége. A fehérjék esetén alkalmazott paraméterek empirikusak, kísérleti megfigyelések, vagy kisebb rendszerekkel végzett kvantum számítások alapján kerültek meghatározásra. A paraméterek írják le a különböző atomtípusokra vonatkozó tulajdonságokat (pl. tömeg, töltés, kötэшossz stb.), illetve különböző kölcsönhatások kialakítása esetén ezek jellemzőit. A potenciális energia a kovalens kötéssel kapcsolódó atomok (kötő kölcsönhatások), illetve a nem kovalens kötéssel kapcsolódó atom-atom kölcsönhatások (nemkötő kölcsönhatások) energia értékeiből tevődik össze. A kötések meghatározó tényezői a kötэшossz, a kötэшög, és a torziósszög megváltozásai. A rendszer energiáját a nemkötő kölcsönhatások esetén a van der Waals (Lennard-Jones potenciál) és elektrosztatikus kölcsönhatások (Coulomb potenciál) határozzák meg. Ez utóbbi számításiigénye jóval nagyobb, így jelentősen hozzájárul a számítási idő növekedéséhez. Ezek számításához közelítések alkalmazása szükséges (pl. PME, Particle Mesh Ewald módszere [63]).

Az atomisztikus erők esetén minden atom mozgásával és kölcsönhatásával számolunk a szimuláció során, így ezek nagy számításigényűek. Ezért kis időskála modellezésére adnak lehetőséget, a számítási időtartamok a ns- μ s skálán mozognak a modellezni kívánt rendszer méretétől függően. A biológiai folyamatokat jellemző időskálák azonban általában több nagyságrenddel hosszabbak, ezért az ezeket jellemző dinamikák nem érhetők el az összes atomot tartalmazó empirikus erők alkalmazásával. A számítási korlátok leküzdésére különböző egyszerűsítések vezethetők be. Lehetőség van a rendszert leíró szabadsági fokok számának csökkentésére. Például a rendszerben jelen lévő gyors hidrogén atomok elhanyagolására (pl. virtuális kölcsönhatási helyek bevezetése [64]). Durva felbontású modellek (*coarse-grained*) alkalmazásával bizonyos atomcsoportokat vonhatunk össze, ezeket gyöngyökként reprezentálva. Ez esetben az atomisztikus erők helyett ezeknek az egyszerűsített modelleknek a kölcsönhatásait leíró erők alkalmazása szükséges. A szerkezet alapú modellek esetén a kísérleti úton megoldott szerkezetekben jelen lévő, a natív szerkezetet stabilizáló kölcsönhatások játszanak jelentős szerepet a számítások során. A többi, nem-natív kölcsönhatást ezek a módszerek elhanyagolják (pl. a szerkezet alapú Gő modell) [65]–[67].

Explicit oldószer alkalmazása jelentősen megnöveli a számításigényt, hiszem ebben az esetben a fehérje atomok mellett több százezer atom kölcsönhatását is nyomon kell követni. Az explicit oldószer modellek helyett a számítások egyszerűsítését implicit modellek implementálásával is el lehet érni.

A számítási korlátok leküzdésére a diszkrét MD módszere is megoldást nyújthat [68], [69]. A diszkrét molekuladinamika (DMD) a kölcsönhatásokat a hagyományos MD számításokkal szemben a folytonos potenciálok helyett diszkrét függvényekkel írja le. Az atomok közti kötések végtelen potenciálként (*infinite square well potentials*), míg az egyéb kölcsönhatások diszkrét energetikai lépések sorozataként vannak modellezve. A szimulációk során minden egyes részecske sebessége állandó, amíg el nem éri egy másik részecske kölcsönhatási távolságát (ütközés), amikor is azonnal megváltoztatja sebességét. Minden egyes időlépés a részecskék egyetlen ütközését jelenti, ezért az időlépések közötti idő változó. Azért, hogy értékes számítási időt lehessen megspórolni, a DMD minden egyes időlépés után egy gyors rendezési algoritmust használ a rendszerben a következő ütközés azonosítására és csak az ütközésben részt vevő részecskékre oldja meg a mozgásegyenleteket. Mivel kevesebb számítást kell elvégezni, a DMD módszer lehetővé teszi nagyobb időskála modellezését, ezáltal például nagyobb méretű molekulák is vizsgálhatók a segítségével. Adott méret (atomszám) elérése után azonban ez a módszer lelassul a nagyon gyakori ütközések miatt.

Az egyensúlyi molekula dinamikai szimulációk során a rendszer hajlamos energiaminimumban megrekedni, és csupán az állapotér egy kis része térképezhető fel, a kiindulási pont (szerkezet) közvetlen környezetének mintavételezése történik meg. A replikacsere (REX, *replica exchange*) egy olyan módszer, amely MD szimulációk mintavételezésének javítására használható [70]. A replikacsere során különböző

hőmérsékletek alkalmazásával, ugyanazon rendszer több másolatával (replika) indítunk szimulációkat. A szomszédos hőmérsékletű replikák esetén adott időközönként, adott valószínűséggel kicseréljük a két replika teljes állapotát. Alkalmazása különösen akkor előnyös, mikor a szerkezeti állapotokat magas energiagátak választják el egymástól.

Az energiagát leküzdése történhet metadinamika segítségével is [71]. Ennek során kollektív változók (CV) definiálásán keresztül térképezhetjük fel az ezek által meghatározott konformációs teret. Ehhez ismerni kell a reakciókoordinátákat, ami mentén az energiagát elhelyezkedik és „rásegítéssel” ezen energiaminimumból a rendszer kimozdítható, azaz az energiagáton átjuttatható. A metadinamikai szimulációk mesterséges dinamikán alapulnak, mert a szimulációk során a kollektív változók mentén módosul a rendszer energiája. Egy előzményfüggő Gauss-potenciál tölti fel a kollektív változók mentén a szabadenergia felszín minimumait. Ez a folyamat a felszín „kisimulásáig” tart (konvergencia).

A molekula dinamikai szimulációk egy speciális esete, mikor külső erőhatás alkalmazásával vizsgáljuk a molekuláris rendszert. Például fehérjék letekeredésének modellezésére lehetőség van a molekula dinamikai szimulációk számítására fejlesztett GROMACS programcsomagban implementált *pull code* alkalmazásával [72]. Ezek a szimulációk nem egyensúlyi számítások, hanem külső erőhatást, kényszer feltételeket alkalmaznak a számítások során az előre definiált kollektív változók mentén. Például az általunk használt letekeredési (*pulling*) szimulációk során a fehérjelánc egyik végén definiált atomcsoportra egy állandó sebességű „húzó” erő hat, a fehérje lánc másik végén definiált atomcsoportot pedig egy kellően nagy erő „rögzíti” a szimulációk során. A húzás irányát esetünkben a két húzási csoportot tartalmazó vektor iránya jelölte ki.

2. Motiváció és célok

Kutatásom célja a CFTR fehérje feleletkeredésének, szerkezetének, dinamikájának, és működésének jobb megismerése, ugyanis ezen tudás birtokában gyógyszer molekulák tervezéséhez tudunk hozzájárulni. A dolgozatomban bemutatott tanulmány a CFTR kloridcsatorna szerkezetét és dinamikáját vizsgálja, amit különböző típusú molekula dinamimai szimulációk segítségével valósítottunk meg. A munka két különböző témakört ölel fel, ezért ezek részletes taglalása a könnyebb megértés céljából két külön fejezetben kapott helyet.

- I. A CFTR fehérje térszerkezetét és szerkezet-funkció kapcsolatát illetően még számos kérdés vitatott. Ezért első célkitűzésünk a CFTR kloridion-útvonal azonosítása és az ioncsatorna-működés szerkezeti hátterének vizsgálata volt.

- II. A CFTR fehérje mutáns NBD1 domén szerkezet korrekciós mechanizmusát és stabilizálását célzó lehetőségek feltárása egy jelentős kutatási terület. Ehhez kapcsolódóan vizsgáltuk a leggyakoribb cisztás fibrózist okozó mutáció, a $\Delta F508$ NBD1 doménre kifejtett hatását. Ehhez az NBD1 domén mechanikai letekeredését elemeztük kísérleti és szimulációs módszerek kombinálásával.

A két külön fejezet elején részletesebben ismertetem a kapcsolódó célkitűzéseket.

3. A CFTR kloridion-útvonal azonosítása és az ioncsatorna-működés szerkezeti hátterének feltérképezése

3.1. A tanulmány motivációja és célkitűzései

Habár több organizmusból származó, illetve különböző konformációban meghatározott krio-EM CFTR szerkezet is elérhető, azonban az ioncsatorna pontos működése még nem tisztázott. A statikus szerkezetek korlátainak leküzdése, a fehérjedinamika felderítése molekuladinamikával egy racionális lehetőség. Korábban kutató csoportunk munkatársai molekula dinamikai (MD) szimulációk segítségével vizsgálta az ATP távollétében meghatározott zebrahal CFTR szerkezetét, amely szeparált nukleotidkötő doméneket (NBD-k) mutatott. Megállapították, hogy ez a konformáció fiziológiás körülmények között nem gyakori, mivel az NBD-k záródása még rövid szimulációkban is megfigyelhető volt [15]. Mivel még az aktív állapotban meghatározott (ATP-kötött és foszforilált) CFTR krio-EM szerkezetben sem figyelhető meg nyitott kloridcsatorna, így a kloridionok pontos transzportútvonala sem ismert. Das és munkatársai ciszteinek kereszkötésén alapuló kísérletekkel kiegészített modellezéssel hoztak létre szerkezeti modelleket és vizsgálták a CFTR ioncsatornát [73]. Ezek azonban jelentősen eltérnek az ismert ABC fehérjeszerkezetektől [74]. Mások MD szimulációkat végeztek az ATP-kötött, zebrahal CFTR szerkezeten (PDB ID: 5w81) alapuló homológiamodelleket felhasználva. Az egyik tanulmányban metadinamikai szimuláció alkalmazásával vizsgálták a kapuzáshoz kapcsolódó konformációváltozásokat [20], illetve egy másik publikáció a CFTR lipidekkel kialakított kölcsönhatásairól számol be [33]. Azonban a kloridútvonal részletes leírására ezek a tanulmányok sem térnek ki.

Az aktív állapotban meghatározott (ATP-kötött és foszforilált) zebrahal CFTR szerkezetre egy tranziens zárt állapotként hivatkoznak [35]. Így lehetségesnek tartottuk, hogy MD szimulációk segítségével a nyitott konformációtól elválasztó energiagát átléphető, és ezáltal a teljes kloridionútvonal feltérképezhetővé válik. Ezért, a kloridkonduktancia szerkezeti hátterének vizsgálata céljából molekula dinamikai szimulációkat végeztünk az aktív állapotban meghatározott zebrahal CFTR szerkezettel (PDB ID: 5w81 [26]), és az így előállított szerkezeti sokaságban olyan konformációkat kerestünk, amelyek nyitott, kloridionok áteresztésére alkalmas ioncsatornával rendelkeznek. Ez a módszer lehetővé tette a nyitott kloridcsatorna szerkezeti tulajdonságainak vizsgálatát, a fehérje-ion kölcsönhatások jellemzését.

A krio-EM CFTR szerkezetek többségében a TM7 és a TM8 transzmembrán hélix az ABC fehérjéktől eltérő szerkezeti tulajdonságokat mutat. A krio-EM szerkezetek többségében a TM8 hélix megtörik a membrán régióban (kivételek a PDB ID: 6d3r, 6d3s szerkezetek). Szerkezeti megfigyelések alapján feltételezik, hogy a TM8-nak és megtörésének fontos szerepe van az ioncsatorna nyitásban [23],

[24], [26], [31]. A krio-EM CFTR szerkezetekben megfigyelt szokatlan tulajdonságok azonban okozhatják a kloridcsatorna zárt állapotát eme térszerkezetek esetén. A TM7 és TM8 ioncsatorna-nyitásra gyakorolt hatásának vizsgálata céljából egy közeli CFTR rokon fehérje (MRP1) szerkezete alapján homológiamodellezéssel állítottunk elő egy olyan modellt, melyben a TM8 és a TM7 is a homológ ABC fehérjékhez hasonlóan helyezkedik el, valamint a TM8 a törés nélkül szerepel. Az így előállított modellel a zebrahal krio-EM szerkezetéhez hasonlóan MD szimulációkat végeztünk.

3.2. Alkalmazott módszerek

3.2.1. Konformációs sokaság előállítása

3.2.1.1. Felhasznált szerkezeti modell

A szimulációkhoz a foszforilált, ATP-kötött zebrahal CFTR krio-EM szerkezetét (PDB ID: 5w81 [26]) használtuk. A szövegben az aminosavak számozását a humán CFTR fehérje számozásának megfelelően jelöltem. Ahol az aminosav eltér a két variáns esetén, ott a humán aminosav és annak pozícióját követően a zebrahal aminosav típusát zárójelben tüntettem fel. Az ábrákon szereplő aminosav számozás szintén a humán CFTR számozásnak felel meg. A zebrahal és humán CFTR szekvenciája ~55% azonosságú [24], amely ABC fehérjék esetén igen magasnak számít.

3.2.1.2. Egyensúlyi molekula dinamikai szimulációk futtatása

A kiindulási szerkezeti modellt a membrán normálhoz igazítottuk az OPM adatbázis és szerver segítségével [75]. A szimulációkat a 2018-as verziójú GROMACS molekula dinamikai szimulációk számítására és elemzésére fejlesztett programcsomag segítségével végeztük el [76]. A szimulációkhoz a CHARMM36m fehérjékre optimalizált erőteret használtuk [77], az erőterben implementált, fehérjék esetén megbízhatóan alkalmazható explicit oldószer modellel, a TIP3P vízmodellel [78]. A CHARMM-GUI webes felületet használtuk a fehérje lipid kettősrétegbe történő beágyazásához, valamint az energiaminimalizálás, az egyensúlyba hozás (NVT, NPT) és az egyensúlyi szimulációs bemeneti fájlok elkészítéséhez [79]–[81].

A rendszer előkészítése során egy POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-foszfokolin) molekulákból álló homogén lipid kettősrétegbe ágyaztuk a CFTR szerkezeti modellt. A vízmodell mellett ionokat is adtunk a rendszerhez és 150 mM KCl koncentrációt állítottunk be, mint fiziológiás környezet. A szimulációkhoz egy újabb ATP paraméterezést vettünk igénybe [82]. Az első lépésben a rendszert energiaminimalizáltunk (*steepest decent integrator*; konvergált, ha az erő <1000 kJ/mol/nm). Az elektrosztatikus kölcsönhatások kiszámításához a *fast smooth* PME [83], a kötéshosszok korlátozásához pedig a LINCS algoritmust [84] használtuk. A PME elektrosztatikához szükséges rácsinformációt automatikusan generáltuk. Minden szimuláció előtt két fázisban egyensúlyba hoztuk a rendszert

(*equilibration*). Először NVT, majd NPT futtatás következett a hőmérséklet és a nyomás stabilizálásának céljából ($T=310$ K, $P=1$ bar). Ezen lépések alatt az atomokra pozíciókorlátozások hatnak (*position restraints*), melyek segítségével elkerülhetők a túlzott mértékű fluktuációk, térszerkezetet érintő nagyobb változások. Ezekhez a futásokhoz a Berendsen termosztátot és barosztátot használtuk 1, illetve 5 ps időállandót alkalmazva. Ezt követően az egyensúlyba hozott rendszerrel lehet egyensúlyi szimulációt indítani immár a korlátozások nélkül (*production run*). Az egyensúlyba hozást összesen 22 alkalommal végeztük el, hogy különböző kezdősebességekkel független szimulációk bemeneteit generáljuk, majd ezt követően 35 ns hosszú egyensúlyi szimulációt indítottunk a 22 egyensúlyban lévő rendszerrel. Az egyensúlyi szimulációkhoz a Nose-Hoover termosztátot és a Parrinello-Rahman barosztátot használtuk, ezek időállandója 1, illetve 5 ps volt. Az egyensúlyi szimulációk alatt a hőmérséklet 310 K, a nyomás 1 bar volt. Egy nyitott konformációkat tartalmazó szimulációs trajektóriát és öt másik véletlenszerűen kiválasztottat 100 ns hosszúra terjesztettünk ki, hogy növeljük a nyitott szerkezetek megfigyelésének lehetőségét. Így összesen 22 (16x35 ns, 6x100 ns hosszú) különböző kezdeti atomsebességgel indított egyensúlyi szimulációt indítottunk a zebrahal CFTR szerkezettel. A szimulációkat a 3.1. táblázat foglalja össze.

3.2.2. Kloridcsatorna detektálása a generált szerkezeti sokaságban

A kloridionok átérésztésére alkalmas, transzmembrán (TM) régióban nyitott ioncsatornát tartalmazó konformációk meghatározásához az első lépésben előszűrőként a Hole2 programot [85] használtuk. Egy szerkezetet akkor választottunk ki további elemzéshez, ha a Hole2 által detektált pórus sugara a membrán régióban nagyobb volt, mint 1.8 Å (kloridion sugara). A TM régiót, azaz a keresés irányát és határait az intracelluláris (IC) és extracelluláris (EC) lipid fejcsoportok magasságába eső Ca atomcsoportok geometriai közepe jelölte ki (IC aminosav pozíciók: 190, 250, 992, 1047; humán: 189, 223, 1018, 1023; EC aminosav pozíciók: 218, 223, 1018, 1023; humán: 217, 222, 1010, 1015). Az így kiválasztott, TM régióban nyitott szerkezeteket a második lépésben a Caver programmal [86] elemeztük. Ez utóbbi program az előzővel szemben jóval kifinomultabb keresést tud végrehajtani: nem csak egy definiált irányban, mint amilyen a membrán normál iránya, hanem attól eltérve is képes üreget keresni. Azonban az erőforrásigénye nagy, ezért végeztünk a Hole2-vel előszűrést. A Caver programmal végzett pórus keresés kiindulási pontját két Ca geometriai közepe jelölte ki (aminosav pozíciók: 190, 990; humán: 189, 982). Ezek találhatóak a membrán régió IC lipid fejcsoportok magasságában. A program a megadott kiindulási pontból indulva térképezte fel a lehetséges útvonalakat. A számítás során a Caver az útvonalak mentén az üregekbe akkora sugarú gyöngyöket illeszt, melyek még pont elférnek a fehérje aminosav oldalláncai mellett (*Caver spheres*). A fehérje felszín elérése jelölte ki az adott útvonal végét. A számításokat kizárólag a transzmembrán doméneken (aminosav pozíciók: 1–384, 844–1181; humán: 1–383, 846–1173) végeztük el.

A keresési határérték itt is a kloridion sugara, az 1.8 Å érték volt. Egyéb alkalmazott paraméterek a számítás során: *shell radius* 6 Å, *shell depth* 3 Å, *clustering threshold* 4.5 Å, *one tunnel off*. A többi beállítást alapértelmezettként használtuk.

Ezzel a módszerrel számos útvonalat sikerült detektálni, melyek a kiindulási pontból vagy az intracelluláris/citoszolkus tér, vagy pedig a transzmembrán régió keresztül az extracelluláris tér felé vezettek ki a fehérje belsejéből. Azokat a szerkezeteket elemeztük a továbbiakban, melyek rendelkeztek mindkét irányba kivezető útvonallal. Egy szerkezet esetén a legalacsonyabb pontszámmal (*Caver tunnel cost parameter*) jellemzett útvonalpárt, az adott konformációban a legvalószínűbb nyitott útvonalnak tekinthető ioncsatornát választottuk ki a további elemzéshez. A 22 trajektóriából csupán egy esetén sikerült nyitott ioncsatornát tartalmazó szerkezeteket azonosítani és ebben az esetben is csak a szerkezetek kis arányában (54/10,000). Az elemzés során ezt az egy trajektóriából származó, 54 nyitott ioncsatornát tartalmazó szerkezetet használtuk fel. Mivel a trajektória elején ~20 ns ideig nem fordult elő ioncsatorna-nyitás, ezért az elemzést az ezt követő 80 ns hosszú trajektórián végeztük el.

3.2.3. Az azonosított kloridcsatorna jellemzése

3.2.3.1. Nyitott szerkezetek elemzése

Meghatároztuk a kloridcsatorna kialakításában részt vevő aminosavakat az 54 nyitott szerkezetekben. Egy aminosavat akkor tekintettünk ioncsatorna kialakításában résztvevőnek, ha bármely atomja és a Caver által definiált pórust kitöltő gyöngy távolsága kisebb volt, mint 3 Å. A pórust körülölelő aminosavak mellett feltérképeztük az ioncsatorna szerkezeti tulajdonságait. Ehhez meghatároztuk az útvonalak átlagos sugarát a szimulációs doboz z-koordinátája mentén. A nyitott szerkezetek elemzéséhez ezeket a kiindulási szerkezethez illesztettük. A z=0 koordináta pont felel meg a szimulációs rendszer (doboz) aljának. Összehasonlítás céljából a nyitott szerkezeteket a kloridcsatorna kialakításában részt vevő aminosavak alapján csoportosítottuk. A kloridion útvonalak csoportokba rendezése az ioncsatorna kialakításában részt vevő aminosavak helyzete alapján végeztük el hierarchikus klaszterezéssel. Ehhez a páronkénti RMSD értékeket határoztuk meg, a klaszterek közelségének számítására pedig Ward módszerét alkalmaztuk.

3.2.3.2. Nyitott és zárt szerkezetek összehasonlítása

A nyitott és zárt állapotú konformációk közti szerkezeti különbség rávilágíthat a kloridkonduktancia fontos elemeire. A kapuzásban szerepet játszható szűk keresztmetszeti régió konformációs változásainak meghatározásához összehasonlítottuk az összes nyitott ioncsatornát tartalmazó szerkezet (trajektória index=i) és a közvetlenül előtte még zárt szerkezet (trajektória index=i-1) két halmazát. A különbségek kvantitatív jellemzéséhez kiszámítottuk a nyitott és zárt szerkezetek kapcsolati mátrixait a nem hidrogén atomok 4 Å távolságon belüli környezetét tekintve. A zárt szerkezeti halmaz mátrixát kivontuk a nyitott

szerkezeti csoportot jellemző mátrixából, és jelöltük a szerkezetben legnagyobb különbséget mutató 10%-ot.

3.2.4. Kloridionok vizsgálata a szimuláció során

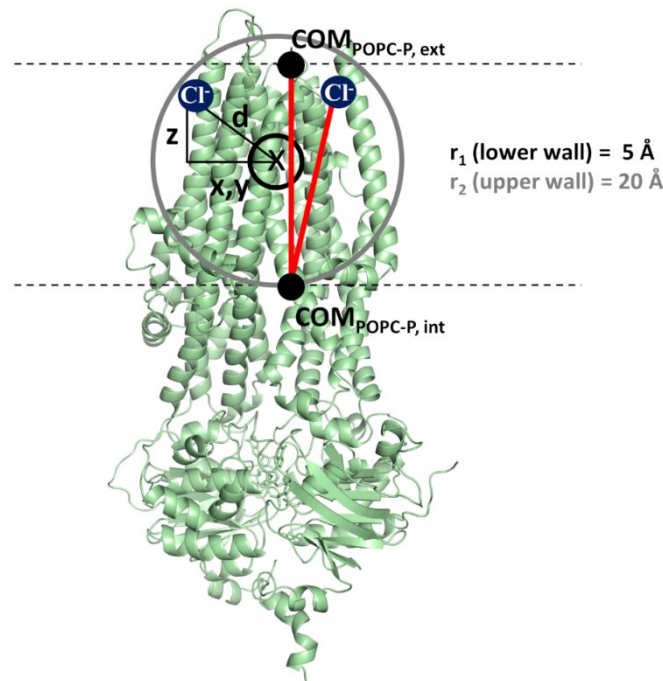
3.2.4.1. Ionkölcsönhatások vizsgálata

A kloridion-kölcsönhatások vizsgálatához kiszámoltuk az összes hosszú szimuláció során (6x100 ns) a kloridionok és a CFTR normalizált kapcsolati mátrixát a nem hidrogén atomok 4 Å távolságon belüli környezetét tekintve ($d < 4$ Å). A negatív töltésű kloridionok mellett azt is vizsgáltuk, hogy a pozitív töltésű káliumionok kialakítanak-e kölcsönhatásokat a CFTR fehérjével. Ehhez kiszámítottuk a káliumionok és a fehérje kontakt mátrixait ($d < 4$ Å) az összes hosszú szimulációnkban (6x100 ns).

3.2.4.2. Kloridionok ioncsatornán történő áthaladásának vizsgálata metadinamika alkalmazásával

Metadinamikai szimuláció segítségével határoztuk meg a lehetséges klorid útvonalakat és jellemeztük a kloridion-átjutás energetikáját a kloridútvonal szűk keresztmetszeti szakaszán. A metadinamika megkönnyíti a lokális minimumokból való kilépést azáltal, hogy az előzményfüggő Gauss-potenciált felhalmozza az egyes reakciókoordinátákon (kollektív változók, CV) [71]. A metadinamikai szimuláció során egy távolság alapú kollektív változót (CV) hoztunk létre, ami a kiválasztott kloridion (#2) és négy szén atom tömegközéppontja (COM) közötti távolság volt (aminosav pozíciók: 96, 348, 932 és 1149; humán: 95, 347, 924 és 1141). Ennek a távolsági CV-nek az x, y és z komponensét alkalmaztuk az elemzési lépésben az 1D és 2D szabadenergia-felszín (FES, *Free Energy Surface*) újraszámításához. A belső régióra összpontosítva a CV változóra egy további feltételt vezettünk be, hogy annak értékét $z=5$ Å és $z=20$ Å közé korlátozzuk. Ehhez a CV-hez egy 5 Å-nál lévő alsó falat, a szimuláció során megengedett legkisebb értéket, és egy 20 Å-nál lévő felső falat, a szimuláció során megengedett legnagyobb értéket állítottunk be a klorid mozgásának az IC és a távoli EC tér felé történő korlátozására. Ezzel a megközelítéssel elkerülhető volt a kloridionnak a fehérjéből az intracelluláris vagy a távoli extracelluláris irányok felé történő kiszabadulása. Végül egy szögkorlátozással tovább szabályoztuk az ion mozgását, hogy az a vizsgált régióban maradjon. Ehhez három pontot vettünk figyelembe: a POPC lipidek foszfor atomjainak COM-ját (1) az EC oldali membrán rétegben, (2) az IC oldali membrán rétegben és (3) a kloridion tényleges helyzetét. E három pontot ebben a sorrendben összekötve egy szöveget határoztunk meg, amelyet a szimuláció során 80°-nál kisebbnek tartottunk. Az elemzési lépés azt sugallta, hogy maga a fehérje is hozzájárult ahhoz, hogy a kloridion a vizsgált régióban maradjon, és a távolsági CV-re vonatkozó falak alkalmazása önmagában elegendő lehetett volna a metadinamikai szimulációhoz. A definiált CV-t és a korlátozásokat a 3.1. ábra szemlélteti.

Először a kiindulási konformációval, amelyben a kloridion #2 a legközelebb volt a szűk keresztmetszeti régióhoz, egy 25 ns időtartamú egyensúlyi szimulációt indítottunk a #2 kloridionra vonatkozó pozíciókorlátozással. Ennek a szimulációnak a végső állapotát használtuk fel egy 600 ns hosszú, jól temperált metadinamikai szimulációhoz. A metadinamikai szimulációt a PLUMED 2.3 csomaggal bővített GROMACS segítségével futtattuk [87]. A PLUMED alkalmazható a dinamika jellemzőinek szimuláció során történő (*on-the-fly*) elemzésére, illetve szabadenergia számítások végezhetők a kollektív változók függvényében. A kloridion #2 szabadenergia-felszínét a PLUMED eszközeivel számoltuk ki, vetítettük az x/y és x/z síkokra. A periodikus peremfeltétel (PBC) nem volt hatással a CV számítására, mivel a PLUMED kód figyelembe veszi azt.



3.1. ábra – Kollektív változók és korlátozások meghatározása a metadinamikai szimulációban. A kloridion (kék kör) és négy szén atom (aminosav pozíció: 96, 348, 932 és 1149.; humán számozás: 95, 347, 924, 1141) tömegközéppontja (COM, X) közötti távolságot (d) használtuk fel a metadinamikai szimulációban kollektív változóként (CV). Erre a CV-re további korlátozást vezettünk be, hogy a kloridiont a $z=5$ Å (kis fekete kör) és $z=20$ Å (nagy szürke kör) közé korlátozzuk. Azért, hogy a kloridion kiszökését a vizsgált régióból meggátoljuk, meghatároztunk egy három ponton alapuló szöveget. Ez a három pont az EC és IC oldali membrán rétegek POPC lipid foszfor atomok COM-ja (kitöltött fekete körök) és a kloridion (kék kör) volt. E szög felső falát (piros vonalak) 80° -ban határoztuk meg. x , y , z : a " d " távolság (távolság CV) komponensei. Az egyértelműség kedvéért két kloridiont ábrázoltam, de a szimulációban csak egyetlen kloridionra alkalmaztuk a korlátozásokat.

3.2.5. TM8 kiegyenesítése és kloridionok ioncsatornán keresztüli átjutásának vizsgálata

A TM8 hélix megtörésének vizsgálata céljából a zebrahal szerkezetben (PDB ID: 5w81 [26]) a TM7 és TM8 hélixeket a nagy szekvencia azonosságú (~25%) homológ MRP1/ABCC1 szerkezet (PDB ID: 6bhu [88]) alapján homológiamodellezéssel megváltoztattuk, azaz a TM8 törését megszüntettük (kiegyenesítettük). A szekvenciaillesztéshez a ClustalW-t használtuk, manuálisan igazítottuk ki [89]. A homológiamodellezést a Modeller programcsomag segítségével végeztük [90]. A modellezés során a TM7 és TM8 hélixeket az MRP1 megfelelő régiói alapján modelleztük, a többi szerkezeti régiót pedig a zebrahal szerkezet alapján stabilizáltuk. Összesen 100 szerkezetet generáltunk, és a legjobb DOPE pontszámmal rendelkezőt választottuk ki a molekula dinamikai szimulációkhoz. Az egyensúlyi szimulációkat és az ioncsatorna keresést a zebrahal szerkezetéhez hasonló módon végeztük el, azonos beállításokat és paramétereket alkalmaztunk. Összesen 6 egyensúlyi, egyenként 100 ns hosszú szimulációt indítottunk.

Modell	Típus	Idő	#
5w81	egyensúlyi	35 ns	16
5w81	egyensúlyi	100 ns	6
5w81 kloridion #2	egyensúlyi	20 ns	1
5w81 kloridion #2	metadinamika	600 ns	1
6bhu_hmodell	egyensúlyi	100 ns	6

3.1. táblázat – Szimulációk összefoglalása. Jelölések: 5w81 az aktív (ATP-kötött és foszforilált) zebrahal CFTR fehérje (PDBID: 5w81); 5w81 kloridion #2 az a szerkezet, ahol a 2-es számú kloridion a legjobban megközelítette az ioncsatornában a szűk keresztmetszeti régiót; 6bhu_hmodell az MRP1 alapján homológiamodellezéssel előállított CFTR szerkezet (kiegyenesített TM8 és elmozgatott TM7).

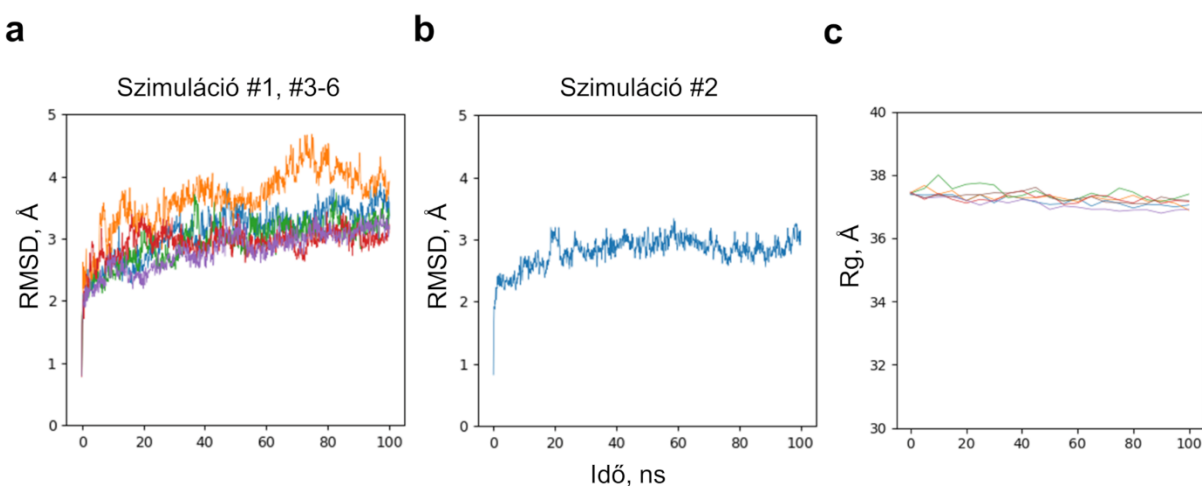
3.2.6. Az adatok elemzéséhez és vizualizálásához felhasznált programok

Az ioncsatorna kereséséhez a Hole2 [85] és a Caver [86] programokat használtam. A detektált kloridútvonalak (ioncsatorna) elemzését és az aminosav-, illetve ionkölcsonhatások meghatározását Python használatával végeztem. Ehhez saját és a csoportunk szkriptjeit is felhasználtam. Az elemzés során a nyílt forráskódú, molekula dinamikai szimulációk elemzéséhez fejlesztett MDAnalysis könyvtárat [91] vettem igénybe. A szerkezetek vizualizálását a PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.4 Schrödinger, LLC), illetve a VMD: visual molecular dynamics [92] programok segítségével végeztem. A grafikonokat a Python Matplotlib [93] könyvtárával generáltam.

3.3. Eredmények ismertetése

3.3.1. A CFTR kloridion-csatorna két citoszolikus bemeneti pórussal és egy, a membránrégió extracelluláris oldalán elhelyezkedő szűk keresztmetszeti régióval jellemezhető

Nyitott, kloridionok átérésére alkalmas ioncsatornával rendelkező szerkezetek előállítására céljából molekula dinamikai szimulációkat végeztünk. Az RMSD (átlagos négyzetes eltérés a kezdeti szerkezettől) és az R_g (girációs sugár) értékek ábrázolása azt mutatja, hogy a közel atomi felbontású zebrahal CFTR szerkezeti modellel (3,37 Å) végzett szimulációk stabilak voltak (3.2. ábra). A 4-5 Å-t meg nem haladó RMSD értékek stabil szimulációkat jeleznek ezen az időskálán és a rendszer méretét tekintve. Komoly instabilitás esetén 6-8 Å feletti RMSD értékeket kaptunk volna [94].

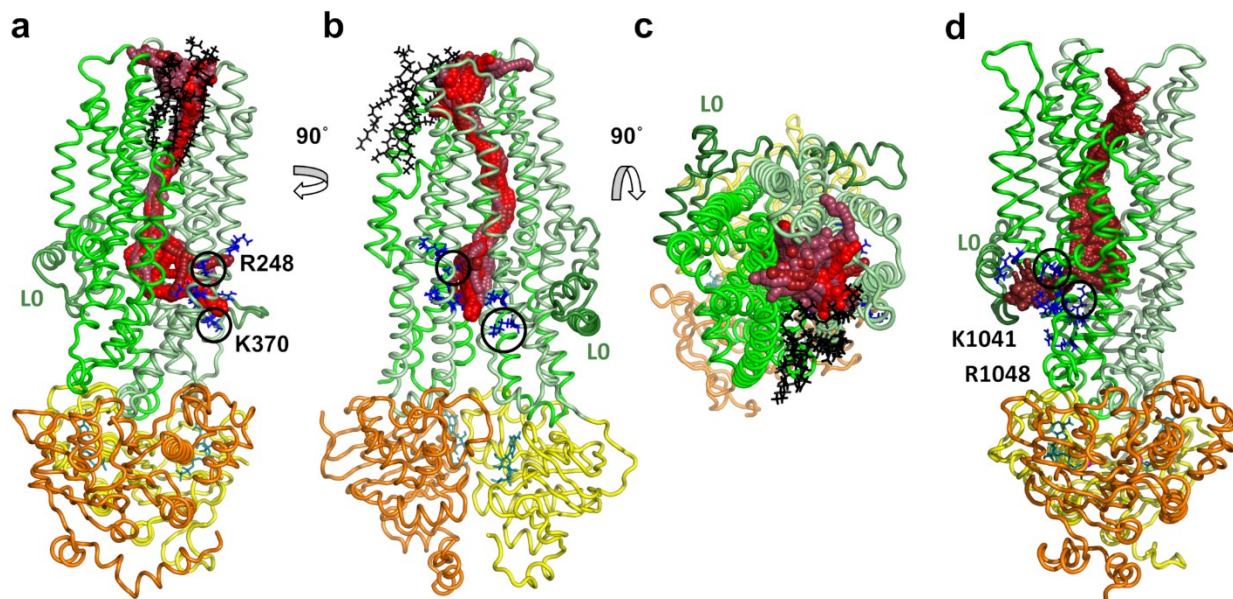


3.2. ábra – Az RMSD és R_g értékek azt mutatják, hogy a szimulációk stabilak voltak. (a, b) A kezdeti fehérjeszerkezettől való átlagos négyzetes eltérést (RMSD) és (c) a fehérje girációs sugarát (R_g) a hat 100 ns hosszúságú trajektória mentén számoltuk ki, hogy minősítsük ezeket a szimulációkat. A (b) panelen láthatóak a nyitott szerkezeteket tartalmazó kettes számú (#2) szimuláció RMSD értékei.

Az azonosított útvonalak a lipid kettősrétegbe eső szakaszon igen hasonlóak voltak, míg az intracelluláris régióban nagyobb mértékben eltértek egymástól (3.3. ábra). A citoszolikus oldalon az útvonalak többsége a TM3, TM4 és TM6 hélixek között végződött (TM4/TM6 bemenet) a következő pozitív töltésű aminosavak környezetében: K190, R248 (K), G366 (R) és K370, a humán CFTR-ben jelen lévő pozícióknak megfelelő számozás szerint. A CFTR fehérjében bizonyos aminosavakat ciszteinekre cseréltek ki, majd ezek hozzáférhetőségén alapuló kísérletekkel (SCAM) és elektrofiziológiai mérésekkel bizonyították, hogy ezeknek a pozitívan töltött aminosavaknak szerepe lehet a kloridionok csatornához történő toborzásában [95]. Ezzel szimmetrikusan egy másik intracelluláris, a TM9, TM10 és TM12 közötti végződést (TM10/TM12 bemenet) is megfigyeltünk, azonban ezeket a Caver program alacsonyabb

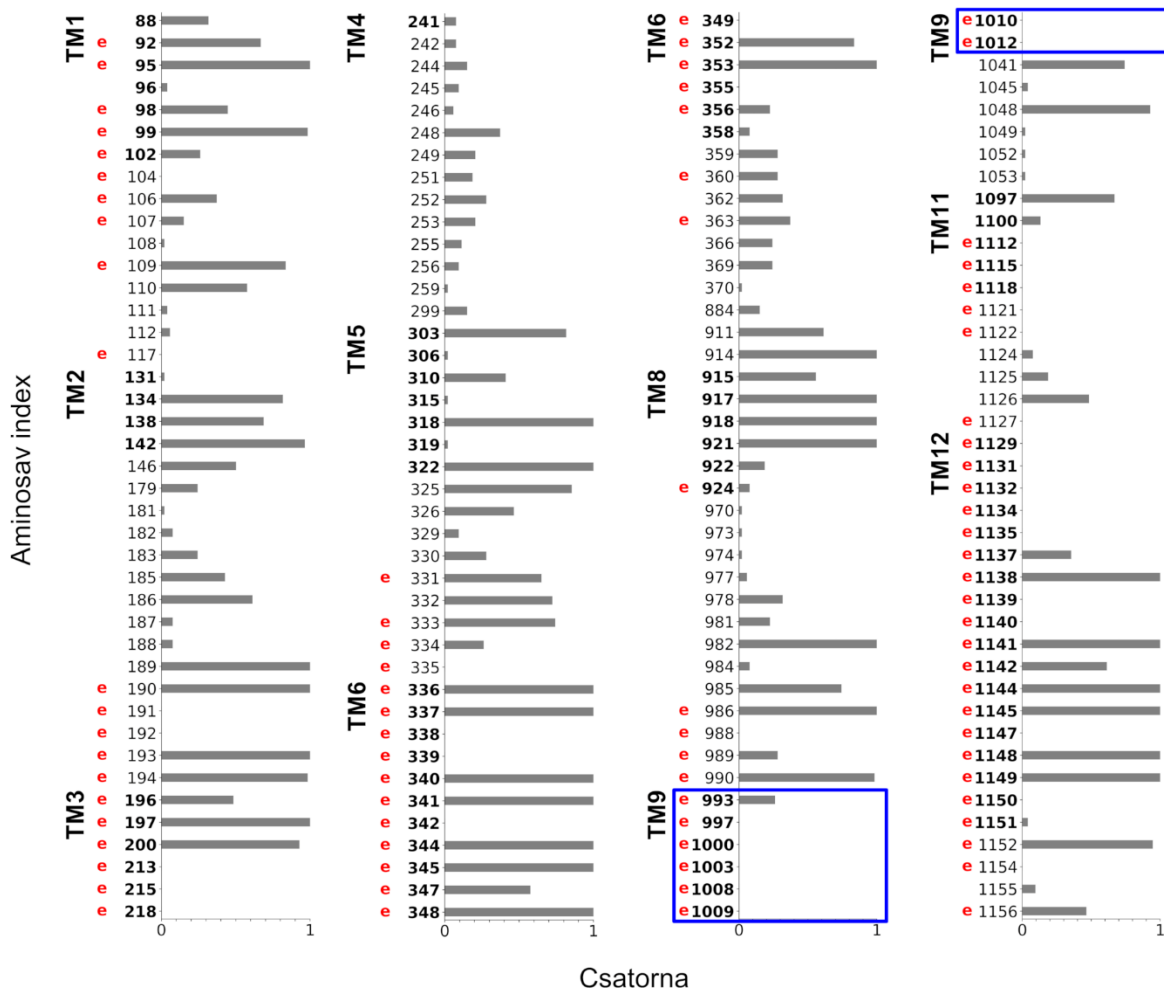
pontszámokkal jelölte. Bár a TM10/12 helyet is kiterjedten veszik körül pozitív töltésű aminosavak (3.3. ábra, kék pálcika jelölés), mint amilyen a G971 (R), R975, Q1035 (R), K1041, R1048, R1158, R1162 és K1165, ez a hely alacsonyabb Caver pontszámokat kapott, amelyet valószínűleg a pórust lefedő L0/Lasso motívum jelenléte okoz. A pozitív töltésű aminosavak némelyikéről (pl. K1041 és R1048) kimutatták, hogy nagy valószínűséggel részt vesznek a kloridkonduktancia kialakításában [95].

Az ábrázolt útvonalakon jól látszik, hogy egyes konformációkban megfigyelt útvonalak az extracelluláris oldalon a TM8 környezetében a hidrofób membránba nyíltak. Ez arra utalt, hogy a lipidek akár kölcsönhatásba is léphetnek a kloridcsatorna kialakításában résztvevő aminosavakkal, amit a szimulációinkban meg is figyeltünk. A POPC molekulák betüremkedtek az ioncsatornába ezáltal eltömítve azt (3.3. ábra, fekete pálcika jelölés). Ehhez hasonló jelenséget mások is megfigyeltek szimulációikban [32].



3.3. ábra – A konformációs sokaságban detektált kloridion-útvonal két belépési ponttal rendelkezik az intracelluláris oldalon. A kloridvezetésre alkalmas útvonalakat az ATP-hez kötött CFTR-szerkezettel (PDB ID: 5w81) végzett 22 egyensúlyi szimulációból egy trajektóriában sikerült azonosítani. A legjobb pontszámot elért útvonalakat az ioncsatornát bélelő aminosavak helyzete alapján csoportosítottuk. Piros színű gyöngyök reprezentálják a Caver program segítségével azonosított útvonalakat. A belépési helyek környékén pozitív töltéssel rendelkező intracelluláris aminosavakat kék pálcikák jelölik. A Lasso/L0 régió, a TMD1, TMD2, NBD1 és NBD2 domének sötétzöld, halványzöld, zöld, sárga és narancssárga színek jelölik. A TM8 régióban a pórusba betüremkedő lipidmolekulákat fekete pálcikák jelzik. (a-c) A TM4/6 hélixek közötti belépési ponttal induló útvonalak. (d) A TM10/12 hélixek között nyíló, alacsonyabb pontszámú útvonalak. Az (a-b, d) oldalnézet a lipid kettősréteg síkjából, és (c) felülnézet az extracelluláris tér irányából.

A szimulációk hitelesítése céljából összegyűjtöttük azokat a kísérleti úton meghatározott aminosav pozíciókat, melyek nagy valószínűséggel a pórus irányába néznek, vagy melyeknek fontos szerepük lehet a kloridkonduktancia kialakításában [30], [96]–[102]. Ezek a kísérletek többnyire ciszteinek hozzáférhetőségén (SCAM) és elektrofiziológiai méréseken alapulnak. Az 54 nyitott szerkezetben megfigyelt, ioncsatorna kialakításában szerephez jutó aminosavat összeszámoltuk és a normalizált értéket oszlopdiagrammon ábráztuk (3.4. ábra). Számos olyan aminosavat azonosítottunk, amelyek mind az összegyűjtött kísérleti eredmények, mind pedig a szimulációink alapján az ioncsatorna irányába néznek. A TM9 hélix mentén is találtak olyan aminosavakat, amelyek hatást gyakorolnak a kloridion transzferre,

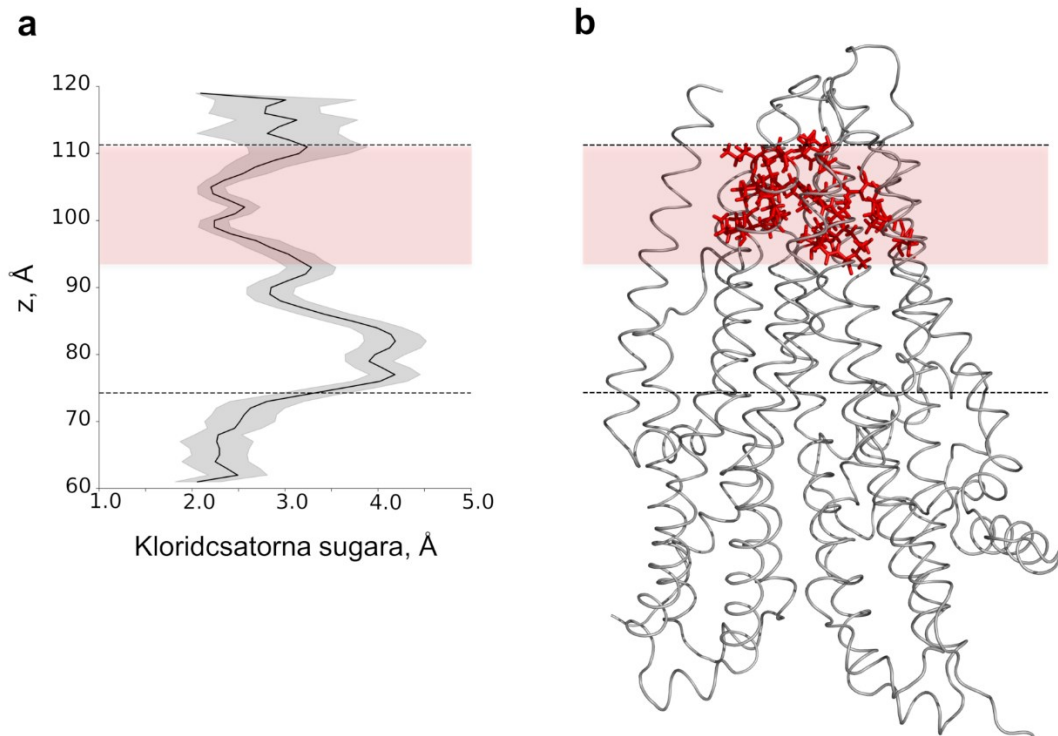


3.4. ábra – A szimulációkban azonosított ioncsatorna-alkotó aminosavak nagymértékben megfelelnek kísérleti adatoknak. A Caver gyöngyökkel kölcsönhatásba lépő aminosavakat az összes nyitott szerkezetben megszámoltuk és a kapott értéket normalizáltuk. Az ábrán csak azokat az aminosavakat tüntettük fel, amelyek az *in silico* vagy *in vitro* adatok alapján a kloridion-csatorna mentén helyezkednek el. Az aminosavak pozícióját jelölő szám (humán számozás) melletti piros színű "e" betű jelzi, amennyiben az adott aminosav laboratóriumi kísérletek alapján bizonyítottan befolyásolja a CFTR kloridvezetését. A vastag betűs számok a TM-régióban található aminosavakat jelölik. A két bekeretezett szakasz emelik ki a TM9 hélix lipid-kettősrétegben elhelyezkedő aminosavait.

azonban ezek a fehérje szerkezete és szimulációink alapján nem közvetlenül az ioncsatorna kialakításában vehetnek részt, hanem feltehetőleg allosztérikus módon vannak hatással a kloridion konduktanciára. A TM9 ugyanis távol esik az ioncsatornától és ezen aminosavak jelentős része nem közvetlenül az *in silico* megfigyelt útvonalak mentén helyezkedett el.

A kloridcsatorna szerkezetének feltérképezéséhez meghatároztuk az ioncsatorna sugarát a szimulációs rendszer z-koordinátája mentén, ami megközelítőleg merőleges a membrán síkjára (3.5. ábra). Az intracelluláris irányból kiindulva az itt lévő bemenet kisebb sugár értékeket mutat ($z=50-75 \text{ \AA}$), majd az ezt követő szakaszon nagyobb értékek figyelhetők meg ($z=75-95 \text{ \AA}$). Ezen a szakaszon egy tágasabb üreg jelenlétére ciszteinek hozzáférhetőségén alapuló kísérleteket (SCAM) és elektrofiziológiai méréseket alkalmazó kutató munka is utalt már [30], [96]–[99]. Az ioncsatorna szűk keresztmetszeti régiója a TM régió extracelluláris részének irányába helyezkedik el ($z=95-110 \text{ \AA}$). Az itt kapott sugár értékek igen alacsonyok, a kloridion méretét közelítik meg.

Számos tanulmány, többek között bizonyos aminosavak mutagenézisének, illetve a cisztein mentes CFTR fehérje konstrukcióba illesztett ciszteinek hozzáférhetőségén alapuló kísérletek (SCAM) és elektrofiziológiai mérések segítségével azt mutatták ki, hogy bizonyos aminosavak az ioncsatorna kialakításában biztosan részt vesznek. Ezek a TM1 hélixen a Q98, P99, L102, a TM6 hélixen az I344 (M) és V345, valamint a TM12 hélixen a N1138 (Q) [96]–[101], melyek a szimulációink során a nagy belső üregben az ioncsatorna irányába nézve helyezkedtek el. Ezek mellett további ioncsatorna-alkotó aminosavakat figyeltünk meg a szimulációkban, melyek a szűk keresztmetszeti régió kialakításában vettek részt, melyek az I336, F337, T338, T339, I340 (L) és S341 voltak. Ciszteinek hozzáférhetőségén alapuló kísérleti tanulmányok alapján ezek a pozíciók szerepet játszanak a CFTR szelektivitásában [96], [100], [102] (1. függelék táblázat).

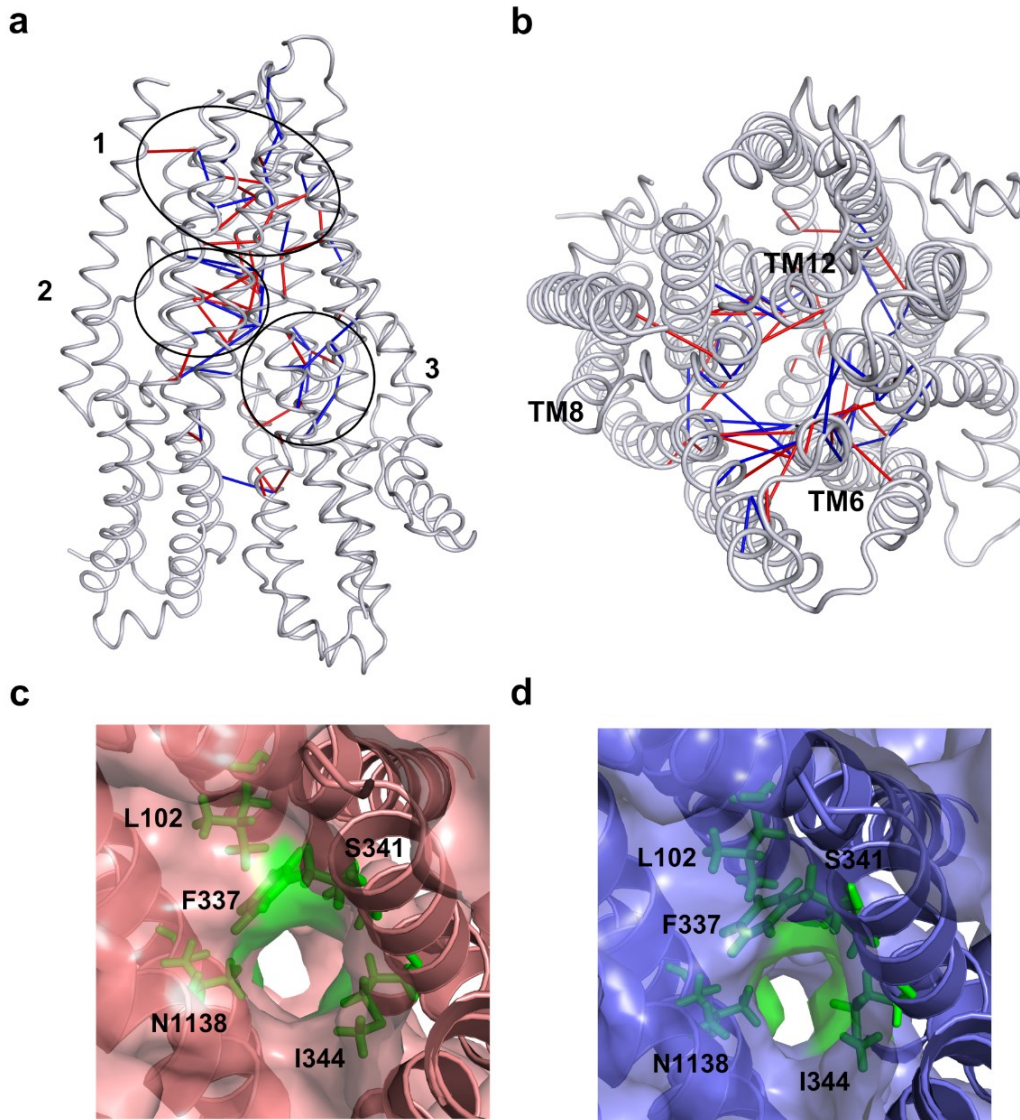


3.5. ábra – A kloridion-csatorna két helyen is beszűkül a megfigyelt kloridion-útvonal mentén. (a) Az összes nyitott ioncsatornából származó Caver gyöngy sugarát átlagoltuk a z-koordináta mentén. A tágas transzmembrán régióban elhelyezkedő üreget nagy értékek jellemzik (akár $r=4 \text{ \AA}$), míg a citoszolikus régióban, valamint az extracelluláris oldali membrán réteg magasságában lévő szűk keresztmetszetű szakaszok 2-2,5 \AA közötti sugárértéket mutatnak. Az extracelluláris oldali membrán réteg területén elhelyezkedő szűk szakaszt a világos korallszínű doboz területe jelöli ki. (b) A transzmembrán domének 3D szerkezetei az ioncsatorna profiljának kontextusában láthatók, az extracelluláris oldali membrán réteg magasságában elhelyezkedő ioncsatorna-alkotó aminosavakat piros pálcikák jelölik.

3.3.2. A nyitott és zárt szerkezeteket eltérő kölcsönhatások jellemzik

Azért, hogy jellemezhesük a nyitott és zárt állapot közti szerkezeti eltéréseket, összehasonlítottuk a két állapot szerkezeteinek normalizált kapcsolati mátrixait. Számos jellemző aminosavkölcsönhatást megfigyeltünk a TM hélixek mentén. Ezek közül a legtöbb kölcsönhatásban résztvevő aminosav a TM6, valamint a TM12 hélixeken helyezkedett el. Az összehasonlítás megmutatta, hogy a kölcsönhatások három elkülönülő területre korlátozódnak (3.6. ábra, a-b), illetve a különböző területeken eltérő kölcsönhatások jellemzőek a két szerkezeti állapotot tekintve. A három elkülönülő terület egyike a szűk keresztmetszeti régióknak felel meg, míg a másik két terület aszimmetrikusan a transzmembrán régió közepén és intracelluláris részén helyezkedik el. A közepén elhelyezkedő régiót a TM6 és TM12 hélixek aminosavai által kialakított kölcsönhatások jellemzik. Az intracelluláris oldal felőli régióra a TM6 hélix aminosavkölcsönhatások jellemzőek. A szűk keresztmetszeti szakaszon található kölcsönhatások kialakításában főként a TM6 hélix aminosavai vesznek részt (2. függelék táblázat). A zárt szerkezeti állapotban nagyobb arányban fordul elő a TM6 által kialakított kölcsönhatás a TM12-vel szemben (14/21, 4/21), míg a nyitott állapotra jellemző kölcsönhatásoknál kisebb az eltérés a TM6 és TM12 által kialakított kölcsönhatások számában (9/17, 6/17). A L197, F310, I340, S341, R347, L997, R1048, R1097 és W1145 aminosavak mind a nyitott, mind pedig a zárt konformációban kölcsönhatással rendelkeznek, viszont megváltozik a kölcsönhatási partnerük a két állapotban.

A nyitott és zárt szerkezetek összehasonlítása során kapott régiók, melyekre különböző kölcsönhatások jellemzőek a két eltérő állapotban, a TM domének intracelluláris és extracelluláris végei között helyezkednek el (főleg TM6 és TM12 aminosavak). Ezek allosztérikus kommunikációs helyek lehetnek konformációváltozások a nukleotidköti doménektől a szűkületi régióba történő továbbítására. A szűk keresztmetszeti régióba allosztérikusan közvetített kis változások nyithatják és zárhatják az ioncsatornát. A szűk keresztmetszetű régióban a főbb változások nem a pórus régióra lokalizálódnak. Vizuálisan megvizsgáltuk az összes nyitott és ezt követő zárt szerkezetet és azt láttuk, hogy a pórus átmérője csak nagyon kis mértékben változik a nyitott, illetve zárt állapotok között, aminek demonstrálására egy nyitott és egy zárt szerkezetpárt mutatok be (3.6. ábra, c-d). Azt figyeltük meg, hogy az extracelluláris oldali pórusnál, a TM1, 6 és 12 között az I344 és N1138 (M és L) aminosavak helyezkedtek el és ezek a szimulációban részt vettek a kloridion-útvonal lezárásában. Ezt és a pórust körülvevő további aminosavak (F337, S341, L102) CFTR kapuzásra gyakorolt hatását mutagenézist és elektrofiziológiai méréseket kombináló kísérletekkel is kimutatták [96], [97], [100], [102].



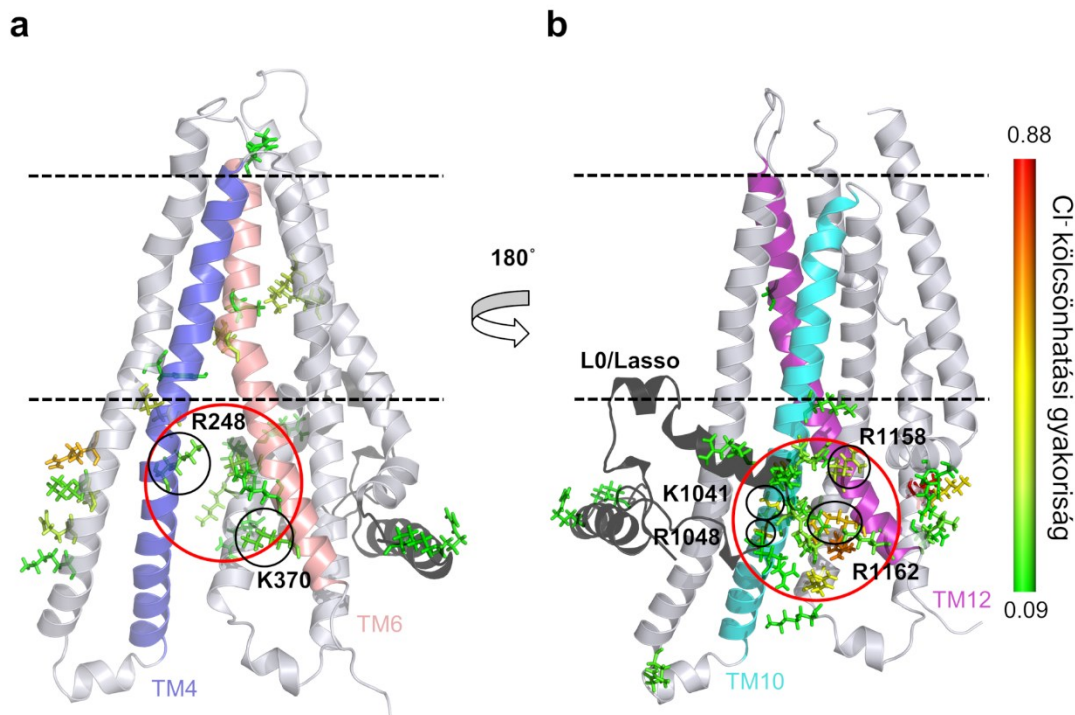
3.6. ábra – A nyitott és zárt szerkezeti állapotra különböző kölcsönhatások jellemzőek a TM régióban. Oldalnézet (a) és felülnézet (b) a szerkezetről. Vonalakkal jelöltük a legnagyobb különbséget mutató (felső 10%), a nyitott (piros), illetve a zárt (kék) állapotra jellemző kölcsönhatásokat. Az ábrázolásnál ezek a vonalak a kölcsönhatásban lévő aminosavak szén atomjait kötik össze, az aminosavak nincsenek kiemelve a könnyebb áttekinthetőség végett. A három kölcsönhatási területet fekete keretelés jelöli ki, melyek a (1) szűk keresztmetszeti régióban, (2) a TM régió közepén, és a (3) TM régió intracelluláris oldalához közel található. Egy nyitott (c) és egy zárt (d) szerkezetpár szemlélteti a szűk keresztmetszeti régió nyitott és zárt állapota közötti különbségét. A kloridvezetést befolyásoló, az ioncsatorna kimeneti helye körül kísérletileg azonosított aminosavakat pálcika modellel ábrázoltam és zöld színnel jelöltem (L102, F337, S341, I344, N1138). A fehérje felületi ábrázolásán látható, hogy az I344 (M) és az N1138) aminosavak a nyitott állapotban egymástól távolabb, míg a zárt állapotban egymás felé fordulva helyezkednek el.

3.3.3. A CFTR ioncsatorna két potenciális szelektivitási lépcsővel is rendelkezik

Az ionok a szimulációk során kiterjedt mozgást végeznek a nagy molekulákhoz képest, mint amilyenek a fehérjék is. Ezért a kloridionok és az aminosavak között kialakuló kölcsönhatások vizsgálatától azt vártuk, hogy az értékes információkat szolgáltatathat a kloridion kölcsönhatási helyekről, melyeknek szerepe lehet a CFTR kloridion-vezetőképességében. Ezért a szimulációk során meghatároztuk a fehérje és kloridionok közötti kölcsönhatásokat.

Elsődlegesen azt vizsgáltuk meg, hogy a kloridionok kialakítanak-e jelentős kölcsönhatást az ioncsatorna két bemeneti szakaszának környezetében. Ugyanis az intracelluláris bemeneti pórusokat pozitív töltésű aminosavak veszik körül, melyek várhatóan segítik a negatív töltésű kloridionok ioncsatornához vonzását. A kloridion interakciós helyek szerkezetére vetített gyakoriságát mutatja a 3.7. ábra. A két, Caver program segítségével azonosított intracellulárisan elhelyezkedő ioncsatorna-belépési helye körül intenzív kölcsönhatásokat figyeltünk meg. Ezek közül az N-terminális L0/Lasso régióhoz közel eső TM10/TM12 bemeneti pórus kölcsönhatásai erőteljesebb volt a másik, K370 pozícióhoz közeli TM4/TM6 körül megfigyelhető kölcsönhatásokhoz képest. A Caver pontozása alapján ez utóbbi, a TM4/TM6 közti pórus volt a jellemzőbb bemenet, azonban az ellentétes oldalon megfigyelhető nagyszámú kölcsönhatási hely alapján ez a TM10/TM12 közötti bemeneti pórus sem elhanyagolható. A bemeneti pórus körüli pozitív aminosavaknak is szerepe lehet a kloridionok ioncsatornához vonzásában és lehetséges, hogy a két alternatív citoszolikus bemenet együttesen létezik és fiziológias körülmények között mindkettő szerepet játszik a kloridkonduktanciában. Ezt az is alátámasztja, hogy mindkét pórus körül található olyan aminosavak, melyeket mutagenézist és elektrofiziológiai méréseket alkalmazó tanulmányok elengedhetetlennek minősítettek a kloridkonduktancia zavartalan működéséhez [95], [96].

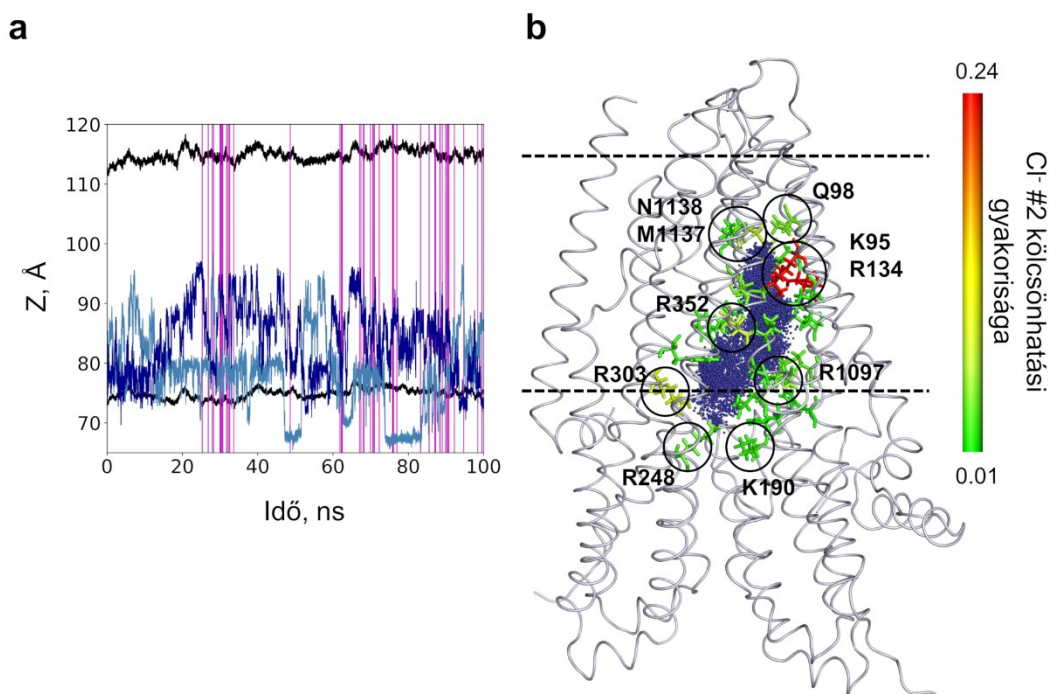
A szimulációk egyensúlyba hozásakor a víz molekulák feltöltötték a transzmembrán régióba eső, fehérjén belüli üreget. Megfigyeltük, hogy két kloridion bejutott a kloridcsatornába, ezért a nyitott szerkezeteket is tartalmazó szimuláció során nyomon követtük ennek a két kloridionnak a membrán síkjára merőleges helyváltoztatását (3.8. ábra, a). A várakozásoknak megfelelően a kloridionok taszították egymást, és nem maradtak egymás közelében. Azonban ezek a kloridionok a nyitott konformációk ellenére sem tudtak áthaladni a teljes ioncsatornán. A transzmembrán régióba belépő két klorid elérte a szűk keresztmetszeti régiót ($z=95 \text{ \AA}$), de a Q98, M1137 és N1138 (L) aminosavak környékénél nem jutott tovább egyik sem, nem haladtak át a membránon.



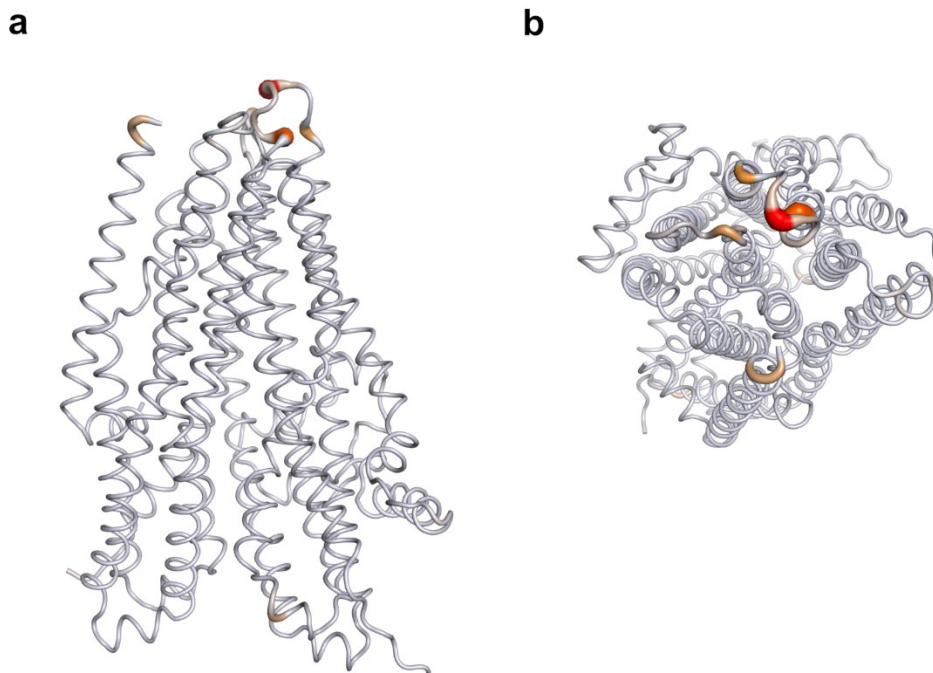
3.7. ábra – A kloridionok és a CFTR fehérje kölcsönhatási helyek a kloridion-útvonal két intracelluláris belépési pontja körül csoportosulnak. A 100 ns hosszú szimulációk ($n=6$) során átlagolt fehérje-kloridion kapcsolati mátrix a szerkezetre vetítve. A kölcsönhatási pozíciókat az aminosavak pálcika ábrázolása jelöli. A színskala a kölcsönhatások gyakoriságát mutatja, ami zöldtől (alacsony) pirosig (magas) terjed. (a) A TMD1-en elhelyezkedő, a TM4/TM6 hélixek közötti, K370 pozíció környezetében lévő kloridion bemeneti pórus ábrázolása. (b) A TMD2-n és az L0/Lasso motívumhoz (fekete) közel elhelyezkedő, a TM10/TM12 hélixek közötti bemeneti pont ábrázolása. A bemeneti pontokat piros keretelés jelöli. A kísérleti tanulmányok által a kloridvezetésben fontos szerepet betöltő aminosavakat fekete keretelés jelöli. A TM4, TM6, TM10 és TM12 hélixeket kék, lazac, cián és lila színek jelölik.

A 22 trajektóriából csupán egy esetén (100 ns hosszú) sikerült nyitott ioncsatornát tartalmazó szerkezeteket azonosítani és ebben az esetben is csak a szerkezetek kis arányában (54/10,000 konformáció). Az átjárható szerkezetek, a nyitási események nem egy adott időpont körül csoportosulnak, hanem a szimuláció alatt elosztva figyelhetők meg. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az egyetlen szimuláció során megfigyelt ioncsatorna-nyitási események egymástól függetlenek. A nyitott konformációk alacsony előfordulási gyakorisága miatt lehetséges, hogy egyik kloridion sem volt megfelelő helyzetben a nyitás pillanatában, ezért nem tudtunk ionátmenetet megfigyelni. Továbbá fontos megjegyezni, hogy a szimulációk során a rendszerben a membrán két oldalán megegyező kloridion koncentráció (150 mM) állt fenn az alkalmazott periodikus peremfeltételek következtében, mely szintén negatívan befolyásolhatta a kloridionok átjutását fiziológias körülményekkel ellentétben, ahol elektrokémiai gradiens segítheti az ionok átjutását az ioncsatorna szűk keresztmetszeti régióján.

Kiszámoltuk a fehérje belsejébe bejutó kloridionoknak és az ioncsatorna-alkotó aminosavaknak a kölcsönhatási gyakoriságát (3.8. ábra, b). A kloridionok olyan pozitívan töltött aminosavak közelében töltöttek több időt, melyek közül számos fontos szerepet tölt be a CFTR működésében (K95, R134, K190, R248 (K), R303, R352, R1097). Erre mutáns CFTR variánsokkal végzett elektrofiziológiai kísérletek utalnak, melyekben a vizsgált aminosavak mutációja negatívan befolyásolta kloridkonduktanciát [95], [96], [99], [103]–[105]. A nem pozitív töltésű aminosavakkal ritkábban figyeltünk meg kloridkölcsönhatást. A kloridionok mellett a szimulációs rendszerben szintén jelen lévő, pozitívan töltött káliumionok mozgásait és kölcsönhatásait is vizsgáltuk. A kloridionokkal szemben ezek nem jutottak be a CFTR központi üregébe, valamint csökkent mértékben alakítottak ki kölcsönhatásokat a fehérjével a kloridionokhoz képest (3.9. ábra).



3.8. ábra – Az egyensúlyi szimulációk során a kloridionok bejutottak az ioncsatornába, de nem haladtak át a membrán régió. (a) A fehérjébe belépő két kloridion helyzetét kék vonalak mutatják (#1 világoskék és #2 kék). A fekete vonalak a membrán kettősrétegének határait jelzik, amelyeket a POPC molekulák foszfor atomjainak tömegközéppontja határoz meg. Függőleges vonalak (lila) jelölik a nyitott útvonallal rendelkező konformációkat. (b) A klorid #2 összes szerkezetből meghatározott, membrán régió belüli pozícióját kék pontokkal ábrázoljuk a kiindulási szerkezet kontextusában. Ennek a kloridionnak és a fehérjének a kölcsönhatási gyakoriságát a szerkezetre vetítettém (pálcika jelölésű aminosavak), zöldtől (alacsony) pirosig (magas) szinkódoltam. A legmagasabb kölcsönhatási frekvenciájú aminosavak a K95 és az R134 (piros).

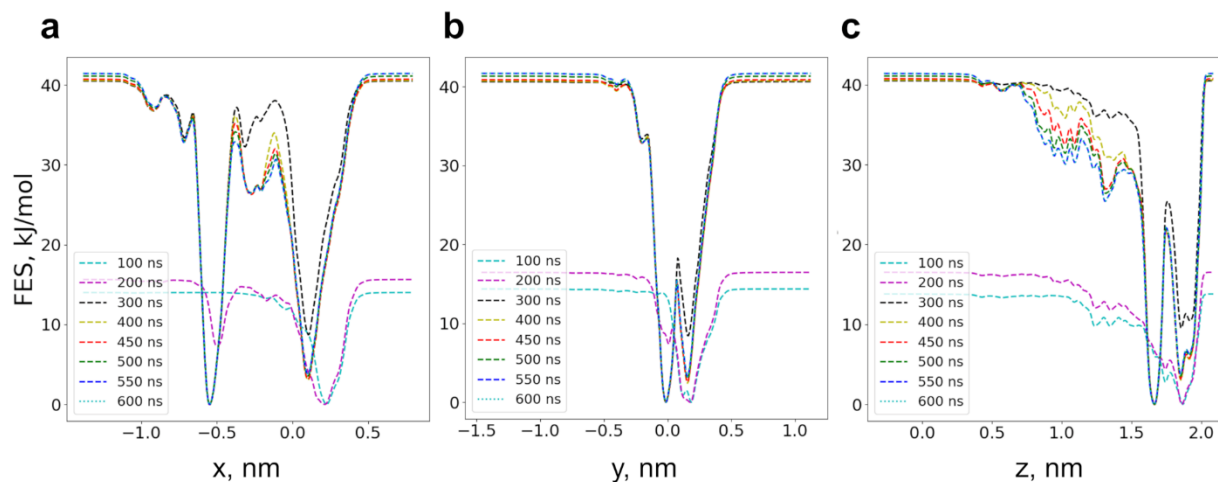


3.9. ábra – A pozitív töltésű káliumionok nem alakítottak ki jelentős kölcsönhatásokat a fehérjével. A TMD1-2 szerkezeti képe a (a) membrán síkjából és (b) arra merőlegesen az extracelluláris oldalról. Az egyes aminosavak káliumionokkal való normalizált kölcsönhatását ($d < 4 \text{ \AA}$) a szerkezetre vetítettem, a kontaktok gyakoriságának megfelelően színeztem. Ezek az ábrák azt mutatják, hogy a káliumionok főként az extracelluláris oldani aminosavakkal lépnek kölcsönhatásba, és szimulációinkban nem jutottak be a fehérje belsejébe.

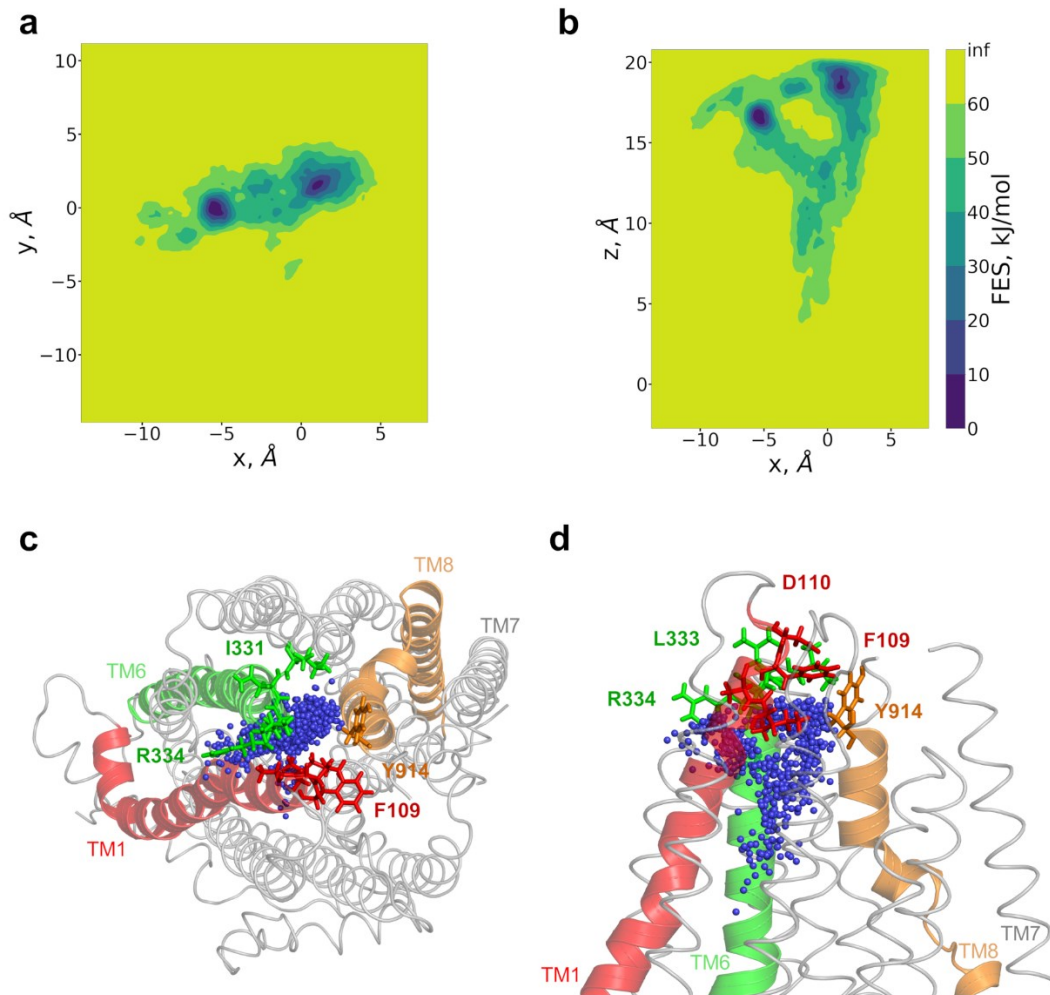
3.3.4. A szűk keresztmetszeti régió keresztül lehetséges a kloridion-transzlokáció

A hagyományos molekula dinamikai szimulációink során a kloridionok áthaladását nem tudtuk megfigyelni. A kloridionok az extracelluláris membránrészben lévő szűk keresztmetszetű régióig jutottak el az ioncsatornában. Ez azt sugallja, hogy a szűk keresztmetszeti régió a kloridvezetés potenciális korlátozó tényezője lehet. Ezen a szűk régió átvezető útvonal jellemzésére és az átmenet potenciál felületének leírására metadinamikai számításokat végeztünk. Az egyensúlyi molekula dinamikai szimulációk során a nyitott szerkezeteket tartalmazó trajektóriában két kloridion (klorid #1 és #2) lépett be a fehérje belső régiójába. A metadinamika kiindulási szerkezetének kiválasztása a klorid #2 pozícióján alapult, amely jobban megközelítette a szűk régiót, mint a klorid #1. Azt a konformációt választottuk ki, amelyben a klorid #2 a legközelebb volt a szűk keresztmetszeti régióhoz. Ezzel a kiindulási szerkezettel egy 25 ns időtartamú egyensúlyi szimulációt indítottunk a klorid #2-re vonatkozó pozíciókorlátozással, és a végső állapotot használtuk fel egy hosszú, jól temperált metadinamikai szimulációhoz. A 600 ns hosszú szimuláció során a számítások konvergáltak (3.10. ábra).

A 2D szabadenergia-felzíneket x/y és x/z mentén számoltuk ki (3.11. ábra, a-b) a távolsági CV x , y és z komponenseinek felhasználásával. Az x/y vetület, amely az extracelluláris térből való felülnézetnek felel meg, két mély energia minimumot mutat, amelyek az x/z vetületen (oldalnézet) két extracelluláris kilépési helyként jelennek meg. Ez az x/z vetület azt mutatja, hogy a metadinamikai szimuláció során az útvonal a szűk keresztmetszeti régió után kettévált, és ezeken az útvonalakon nem volt jelentős energetikai akadály a kloridion számára az ioncsatorna extracelluláris irányban történő elhagyásához. A szűk keresztmetszeti szakasz extracelluláris oldala felé elhelyezkedő és a kloridionnal kölcsönhatásba lépő aminosavak közé tartoznak az I106, A107, Y109, D110 a TM1-ből, az I331, I332 (N), L333 R334 a TM6-ból és Y914 a TM8-ből (3.11. ábra c-d). Ezek közül az R334 és a Y914 aminosavaknak fontos szerepe van a CFTR funkcióban. Az R334 pozitív töltésű aminosav töltésemlegesítő mutációi csökkentik a kloridvezetést [106]. Emellett a Y914 mutációi a kloridkonduktancia mellett a csatorna nyitás-zárás folyamatát is befolyásolják [107]. Ezeket a kölcsönhatásokat Zeng és munkatársai is megfigyelték szimulációik során [108].



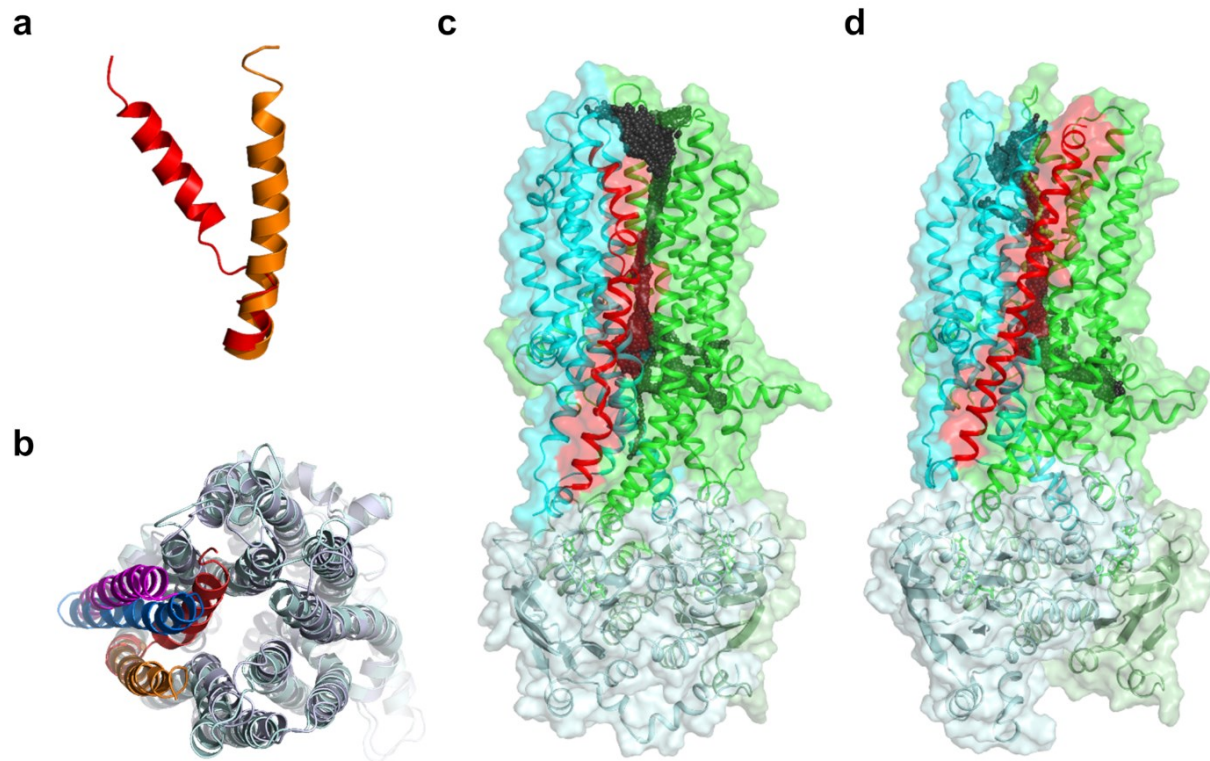
3.10. ábra – A 600 ns hosszú metadinamikai szimuláció konvergált. Az elemzéshez a kollektív változó (CV) x , y és z komponensét használtuk a szabadenergia-felzín (FES) újraszámításához. (a-c) A PLUMED eszközzel kiszámított 1D FES grafikonok az egyes koordináták mentén különböző szimulációs időintervallumokban ábrázoltuk. A grafikonok azt mutatják, hogy a metadinamika mindhárom dimenzióban konvergált (a későbbi időpontokban a vonalak nagyon hasonlóvá váltak egymáshoz).



3.11. ábra – A metadinamikai szimuláció két útvonalat fedett fel az extracelluláris tér felé. Metadinamikai szimulációt végeztünk a kloridionok és az útvonal e régióját szűkítő aminosavak lehetséges kilépési útvonalainak azonosítására. A négy C-atom (aminosav pozíció: 95, 347, 924 és 1141) tömegközéppontja és a Cl⁻ #2 közötti távolságot reakciókoordinátaként (kollektív változó, CV) használtuk. Ennek a CV távolságnak az x, y és z komponensei mentén 2D szabadenergia-felületeket számítottunk és ábrázoltam a kiindulási szerkezethez viszonyítva. A TM1, TM6 és TM8 piros, zöld, illetve narancssárga színnel jelöltük. A pálcikák a következő aminosavakat jelölik a szűk keresztmetszeti régióban: I106, A107, Y109 (F), D110 (TM1), I331, I332 (N), L333, R334 (TM6), Y914 (TM8).

3.3.5. A megtört TM8 csökkenti az ioncsatorna nyitásának valószínűségét

A TM8 hélix mentén található törés a legtöbb CFTR szerkezetben jelen van (PDB ID: 5uak, 6o2p, 6msm, 6o1v, 5uar, 5w81) és sokan úgy vélik, hogy ez adja a CFTR egyediségét az ABC család aktív transzportereihez képest. A csirkéből származó CFTR fehérje szerkezetében azonban nincs ilyen törés (PDB ID: 6d3s és 6d3r) és ilyen konformációt más ABC szerkezetekben sem észleltek. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk ennek a törésnek a jelentőségét, az 5w81 szerkezetben a TM7 és TM8 hélixeket az MRP1 szerkezete (PDB ID: 6bhu) alapján homológiamodellezéssel megváltoztattuk. Azaz a TM8 törését megszüntettük, kiegyenesítettük a hélixet, illetve a TM7 hélix pozícióját is megváltoztattuk (3.12. ábra). Ezzel a korrigált szerkezettel, a korábbi egyensúlyi szimulációk során használt paraméterek mellett futtattunk szimulációkat. A hat szimulációból ötben tudtunk megfigyelni nyitott konformációt. Továbbá a fent ismertetett, 5w81 szerkezettel végzett egyensúlyi szimulációban megfigyelt 0.047% gyakorisághoz képest jóval magasabb, 2.038%-os valószínűséggel (3.2. táblázat). A gyakoribb ioncsatorna-átjárhatóság mellett a kiegyenesített TM8 esetén az ioncsatorna integritása nem sérült, a lipidek nem jutnak be az ioncsatornába a szimulációk során a zebrahal szerkezet esetén megfigyeltekkel ellentétben.



3.12. ábra – A kiegyenesített TM8 gyakoribb ioncsatorna-nyitást eredményez a szimulációkban, valamint az ioncsatorna sem nyitott a lipid molekulák felé az extracelluláris oldalon. A (a) megtört TM8 a zebrahal szerkezetben (piros) és az egyenes TM8 az MRP1 szerkezetén alapuló homológia-modell (narancssárga) esetén. (c-d) A teljes zebrahal CFTR szerkezetének „cartoon” és felszín ábrázolása. Fekete gyöngyök jelölik a megfigyelt kloridútvonalakat. (b) Extracelluláris oldali nézete az illesztett CFTR (halványlila) és homológia-modell (halványlila) szerkezeteknek (TMD1-2). CFTR TM8 (piros) és TM7 (magenta), homológia-modell TM8 (narancssárga) és TM7 (kék).

CFTR modell	Idő	Nyitott/összes szerkezet	Nyitott szerkezetek aránya
5w81	6x100 ns + 16x35 ns	54/116,000	0.047%
6bhu_hmodell	6x100 ns	1223/60,000	2.038%

3.2. táblázat – A két szerkezettel végzett szimulációk során a nyitott szerkezetek aránya. Jelölések: 5w81 az aktív (ATP-kötött és foszforilált) zebrahal CFTR fehérje (PDBID: 5w81); 6bhu_hmodell az MRP1 alapján homológiamodellezéssel előállított CFTR szerkezet (kiegyenesített TM8 és elmozgatott TM7).

3.4. Diskusszió

A CFTR kloridcsatorna nyitott és zárt állapotú szerkezetének, valamint a két különböző állapot közötti átmenetnek a feltárása kulcsfontosságú a kloridcsatorna működésének, illetve működési hibáinak megértéséhez. Annak ellenére, hogy több, közel atomi felbontású CFTR krio-EM szerkezetet is publikáltak, még mindig nem tisztázott a CFTR nyitás-zárás (kapuzás) és a kloridionok ioncsatornán történő átjutásának pontos mechanizmusa. Bár a zebraahal CFTR krio-EM szerkezetét (PDBID: 5w81) aktiváló körülmények között határozták meg, azonban az ioncsatorna zárt, nem átjárható a kloridionok számára és ezért erre a szerkezeti állapotra egy tranziens zárt konformációként tekintenek [26]. A CFTR fehérje kloridcsatorna átjárhatóvá válás megfigyelése és a kloridcsatorna jellemzése céljából egyensúlyi molekula dinamikai szimulációkat végeztünk ezzel a zebraahal szerkezettel (PDB ID: 5w81). Az elemzés lehetővé tette a kloridcsatorna atomi szintű feltérképezését, valamint a CFTR és a kloridionok kölcsönhatásának vizsgálatát.

Szimulációs eredményeink korrelálnak a szakirodalomból kigyűjtött kísérleti módszerek alkalmazásával kapott adatokkal. Az ioncsatorna-alkotó aminosavak nagymértékben megfeleltek mutagenezisen és elektrofiziológiai méréseken, valamint ciszteinek hozzáférhetőségén alapuló kísérleti eredményeknek, a szimulációink és kísérleti eredmények között megfigyelt eltérések nagy része allosztérikus hatásokból eredhet. Az allosztérikus hatások evidens példája a TM9 (9-es transzmembrán hélix). Habár kísérletek szerint néhány TM9 aminosav befolyásolhatja a CFTR kloridvezető képességét, azonban a TM9 aminosavai nem vehetnek részt az ioncsatorna közvetlen kialakításában, mivel ez a hélix a központi pórustól laterálisan távol helyezkedik el. Ez a példa rávilágít, hogy fontos az egymásnak ellentmondó kísérleti és szerkezeti adatok tanulmányozása, ez ugyanis információt szolgáltat az allosztérikus kölcsönhatások azonosításához.

Míg több intracelluláris bemeneti pórust is feltételeztek mind kísérleti módszereken alapuló [95], [109], mind pedig számításon alapuló tanulmányok [13], [14], [20], a foszforilált, ATP-kötött zebraahal szerkezet esetén az egyik, K370 körüli, TM4 és TM6 között nyíló belépési helyet emelték ki, ahol a két hélix között egy szemmel láthatóan nagy rés található [26]. A másik, a TM10 és TM12 közti, az L0/Lasso motívum közelében lévő bemenetnek nem tulajdonítottak nagy jelentőséget, mint lehetséges bemeneti pórus, azonban ugyanez a tanulmány bemutatja, hogy ezen az oldalon elhelyezkedő K1041 és R1048 aminosavak fontos szerepet játszanak a kloridionok elektrosztatikus vonzásában [95]. Mi mindkét bemeneti hely környékén megfigyeltünk pozitív töltésű aminosavakat, melyek szimulációink során kölcsönhatásba léptek a kloridionokkal. Ezek az aminosavak biztosíthatják a szelektivitást a negatív töltésű ionok számára. Emellett az intracelluláris bemenet környékén alacsony ioncsatorna-sugárértékeket határoztunk meg (2-3 Å), ami arra utal, hogy az ioncsatorna bemeneti régiója a töltés mellett a méret szempontjából is szelektív lehet.

A szelektivitás egy másik lehetséges tényezője és a kloridvezetés potenciális korlátja az extracelluláris membránrészben lévő szűk keresztmetszetű régió. Megfigyeltük, hogy ezt a szakaszt olyan aminosavak alkotják (I336, F337, T338, T339, I340 (L) és S341), melyre több mutagenézisen és elektrofiziológiai méréseken, illetve ciszteinek hozzáférhetőségén alapuló tanulmány is a CFTR szelektivitásában szerepet játszó aminosavként utal, és feltételezik, hogy ezen aminosavak kölcsönhatásai határozhatják meg az ioncsatorna nyitás-zárás mechanizmusát [29], [30], [96], [100], [102]. Az ABC fehérjékre jellemző a citoszolikus, illetve az extracelluláris oldalakon elhelyezkedő kapuk jelenléte, melyeknek a transzporterekre jellemző szubsztrátranzlokációs mechanizmus során van szerepük. Ez a CFTR fehérjében az ioncsatorna funkció kialakulásával együtt módosulhatott, a kloridion-útvonal mentén megfigyelt két szelektivitási tényező ennek a két transzporter kapunak az utódja lehet.

Azt figyeltük meg, hogy az ioncsatorna átmérője ebben a szűk keresztmetszeti régióban a nyitott konformációkban csak kis mértékben haladta meg a kloridion méretét, valamint a zárt állapotot jellemző átmérőt. A szimulációk során a kloridionok nem haladtak át az ioncsatorna ezen szűk szakaszán, így lehetséges, hogy ez a kis átmérőbeli különbség már nem elegendő ahhoz, hogy a kloridion spontán átjutását lehetővé tegye az általunk alkalmazott szimulációs körülmények között. A kloridionok áthaladásának hiányát okozhatja az elektrokémiai potenciál hiánya is, ugyanis fiziológiás körülmények között a hidrátburkot gyengítheti a negatív membránpotenciál [110]. Egy újabb publikációban a humán CFTR-rel végeztek molekula dinamikai szimulációkat, és azt figyelték meg, hogy az alkalmazott membránpotenciál mellett több víz molekula jut a szűk keresztmetszeti szakaszon lévő hidrofób részbe és pár kloridion spontán átjut az ioncsatornán. Az így generált membránpotenciál nem tükrözte a fiziológiás körülményeket, rendkívül magas volt, mégis csupán 17 db kloridionnak sikerült átjutnia 2 rendkívül hosszú (10 x 1000 ns) szimuláció során [108]. Ez alapján ez a tranziens zárt humán szerkezet sem különbözött a zebrahal szerkezettől annak tekintetében, hogy a szimulációk során nehézkes volt a kloridionok átjutása.

A metadinamikai szimulációink eredménye megmutatta, hogy a szűk keresztmetszeti szakaszon keresztül két, energetikailag kedvező útvonal halad keresztül az extracelluláris tér irányába. Az egyik útvonal egy centrálisabban elhelyezkedő pórushoz vezet a TM1, TM6 és TM8 között. Ezt alátámasztja egy ciszteinek hozzáférhetőségén alapuló tanulmány, amely során kimutatták, hogy a nyitott CFTR ioncsatornában a TM8 egyes aminosavai a szűk keresztmetszeti régióban a TM1 és a TM6 közelébe esnek [107]. A másik általunk megfigyelt laterális útvonal a TM1 és TM6 (TM3 felé eső oldalon) között érte el az extracelluláris oldalt. Megfigyeltük, hogy a pórus nyitott állapotát a TM1 és a TM6 közötti távolság szabályozza. Ezekről a hélixekről kimutatták, hogy döntő fontosságúak a nyitás-zárás folyamatának szempontjából [96]–[102] és ciszteinek hozzáférhetőségén alapuló vizsgálatok is azt sugallják, hogy a TM1 és a TM6 extracelluláris végei elválnak egymástól, amikor a csatorna megnyílik [111]. Ehhez hasonlóan Zeng és munkatársai jelentősebb TM1 és TM6 mozgást figyeltek meg, azonban a TM8 és a TM12 esetén

nem ezt látták [108] Zhang és munkatársaival ellentétben [26]. Zeng és munkatársai is több kloridion kilépési útvonalat figyeltek meg a szimulációikban. Ezek a TM1 és TM6 között, TM1 és T12 között, valamint egy a kettő közötti átmentenek megfelelő, a TM1, TM6 és TM12 között lévő útvonalak [108]. A foszforilált és ATP-kötött humán szerkezetben (PDB ID: 6msm) szintén a TM1 és TM6 között figyelhető meg egy szűk pórus az extracelluláris oldalon [27]. Ezek alapján feltételezhető, hogy ezek a leírt útvonalak együttesen léteznek és a TM hélixek átrendeződésével változhat ezeknek az útvonalaknak az átjárhatósága [108].

A nyitott szerkezetek száma igen alacsony volt, a 22 szimulációs trajektóriából csupán 1 esetén tudtunk megfigyelni kloridcsatornát, s a trajektóriát alkotó 10,000 szerkezetből pedig csak 54 esetén. Zhang és munkatársai elektrofiziológiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a zebrahal CFTR ioncsatornának több mint tízszer kisebb a nyitási valószínűsége humán CFTR fehérjéhez képest [112], ami magyarázattal szolgálhat a szimulációinkban megfigyelt ritka nyitási eseményekre. Megfigyeltük azonban, hogy a zebrahal szerkezettel végzett szimulációink során a TM8 megtörésének környezetében lipid molekulák türemkedtek be az ioncsatornába elzárva azt, ami eredményezhette a nyitott szerkezetek igen alacsony számát. A kiegyenesített TM8 hélixű szerkezeti modellel végzett egyensúlyi szimulációinkban gyakoribb ioncsatorna-nyitást figyeltünk meg a megtört TM8 CFTR szimulációkhoz képest. Ez arra utalhat, hogy a CFTR fehérje TM8 hélixének törése a szerkezetmeghatározáskor alkalmazott körülmények (detergens, alacsony hőmérséklet) által előidézett műtermék lehet [26], amihez hozzájárulhat a TM8 nagy mozgékonyága is [113]. Lehetséges, hogy a TM8 különböző kölcsönhatásokat alakít ki a nyitott és zárt állapotban, azonban a kísérleti módszerekkel történő szerkezetmeghatározás esetén nem lehetett a nyitott állapotot jellemző konformációban meghatározni. Chin és munkatársai arra utalnak, hogy a detergensben történő tisztítás során a lipidek eltávolítása megzavarhatja ezt a mechanizmust és ezért nem figyelhető meg nyitott kloridcsatorna a szerkezetekben [33].

3.5. Összefoglalás

A fentebb bemutatott munka során a CFTR-kloridvezetés szerkezeti hátterének vizsgálatával foglalkoztunk. Az aktív állapotban meghatározott CFTR szerkezettel (ATP-kötött és foszforilált, PDB ID: 5w81) végzett molekula dinamikai szimulációink segítségével előállított szerkezeti sokaságban azonosítottuk a kloridion CFTR fehérjén belüli átjutási útvonalát. A CFTR ioncsatorna funkciójára vonatkozóan összegyűjtöttük a publikált kísérleti eredményeket és validáltuk a szimulációkkal kapott eredményeinket.

A kloridion-útvonalak elemzése megmutatta, hogy a CFTR citoszolikus részén két alternatív belépési hely is található. Ez a megfigyelés az összegyűjtött kísérleti módszereket alkalmazó tanulmányok eredményeivel is összhangban van. Továbbá jellemeztük az ioncsatorna szerkezeti tulajdonságait, valamint meghatároztuk a fehérje és kloridionok közötti kölcsönhatásokat. Az ionkölcsönhatások vizsgálata megmutatta, hogy az ioncsatorna citoszolikus bemeneti szakaszán a szubsztrát mérete és töltése határozza meg a szelektivitást. Az egyensúlyi molekula dinamikai szimulációinkkal kapott eredmények azt megmutatták, hogy a kloridvezetés potenciális korlátozó tényezője az úgynevezett szűk keresztmetszeti régió.

A krio-EM CFTR szerkezetek többségére jellemző 8-as transzmembrán hélix (TM8) megtörése egy atipikus szerkezeti elem, amely nem jellemző az ABC fehérjékre. Emellett szokatlan helyzete a TM7-et is kimozdítja a homológ ABC fehérjékre jellemző pozíciójából. Ezért egyensúlyi molekula dinamikai szimulációkkal vizsgáltuk ezeknek a szerkezeti jellemzőknek a hatását. A szimulációink megmutatták, hogy a CFTR krio-EM szerkezetekben megfigyelhető TM8 és a TM7 elmozdulása gátolhatja az ioncsatorna működését. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a TM8 megtörése a szerkezetmeghatározáskor fennálló körülmények következménye lehet. A TM8-megtörés jelentőségének, esetleges szerepének tisztázására további vizsgálatok szükségesek.

Szimulációs eredményeink lehetővé tették a CFTR-kloridútvonal atomi szintű jellemzését, melyet kísérleti módszerekkel csupán alacsony felbontással lehetséges vizsgálni. A munka során kapott eredmények segíthetik a kísérleti eredmények értelmezését. Emellett, a szerkezetre vonatkozó atomi szintű információk hozzájárulhatnak ioncsatorna-funkcióra negatívan ható mutációk hatásmechanizmusának megértéséhez. Továbbá, hasznos adatokkal szolgálhatnak ioncsatorna-funkció helyreállítását célzó vegyületek fejlesztéséhez.

4. A CFTR kloridcsatorna NBD1 domén mechanikai letekeredésének vizsgálata

4.1. A tanulmány motivációja és célkitűzései

Számos cisztás fibrózist (CF) okozó mutáció érinti a CFTR fehérje első nukleotidkötő doménjét (NBD1). Ezek közül a leggyakoribb, az 508-as fenilalanin deléciója ($\Delta F508/F508\text{del}$). A $\Delta F508$ mutáció a fehérje érése során rossz irányba tereli az NBD1 feltekeredését, melynek következtében a termelt fehérje jelentős mennyisége degradálódik [43], [45]. Kisebb hányada eljuthat ugyan a plazmamembránba, azonban a mutáció a hibás feltekeredés mellett a CFTR funkcióját és stabilitását is csökkenti a normál variánséhoz képest [114]. A jelenleg használatban lévő, a CFTR funkcionális expresszióját helyreállító gyógyszerek hosszú távú hatékonysága még kétséges [39]–[41]. Az alkalmazott vegyületek többnyire az érett, plazmamembránba kijutott fehérjék stabilizálását célozzák, azonban a fehérjék nem megfelelő feltekeredése (*misfolding*) esetén nem nyújtanak tökéletes megoldást. A mutációk ezen típusa esetén a terápiás hatékonyság fokozását a fehérje feltekeredésébe beavatkozva, a helyes szerkezet kialakításának támogatásán keresztül lehetne elérni. Hatékony CFTR korrektorok tervezéséhez azonban elengedhetetlen a CFTR szerkezetének és dinamikájának atomi szintű ismerete, valamint az NBD1 feltekeredésének részletes leírása.

Korábbi tanulmányok vizsgálták az NBD1 feltekeredését [58]–[60], [115], ezek a kísérleti módszerek azonban alacsony felbontásúak. Az izolált vad típusú és $\Delta F508$ mutáns NBD1 biofizikai módszereket alkalmazó vizsgálatai a mutáns domén jelentősen csökkent mértékű olvadási hőmérsékletét mutatták ki [49], [50]. Az F508 aminosav deléciója okozhat különbséget az NBD1 stabilitásában a vad típushoz képest, ami a fehérje megváltozott mechanikai ellenállásában nyilvánulhat meg. Ezért egyik célunk volt nagyobb felbontásban vizsgálni az NBD1 mechanikai letekeredéssel szembeni ellenállását a vad típusú és a $\Delta F508$ mutáns NBD1 esetén.

Erőspektroszkópiai módszerek alkalmazásával sikeresen vizsgálták már fehérjék mechanikai letekeredését, a letekeredési erővel szemben mutatott ellenállását [116]–[119]. Ezért csoportunk atomerő-mikroszkóp (AFM) kísérletekkel tanulmányozta az NBD1 letekeredését. A kísérletek során egy molekulárisan sima csillámfelszínhez rögzítették az NBD1 domént, majd AFM tű segítségével meghúzták. Az erőhatás következtében a fehérje több lépésben tekeredik le. Az egyes letekeredési események az ellenállási erő hirtelen csökkenésének felelnek meg, ezáltal a domén teljes letekeredése egy fűrészfog mintázatú letekeredési erőgörbét szolgáltat. Az erő-távolság (AFM tű és felszín közti távolság) adatokból következtethető vissza, hogy a fehérje bizonyos szakaszai mikor tekerednek le egymáshoz képest.

Habár az erőspektroszkópiai kísérleti eredmények valóságához közeli adatokat szolgáltatnak, ezek sokszor nehezen értelmezhetőek és felbontásuk is alacsony. Ezek a problémák kiküszöbölhetőek irányított molekula dinamikai szimulációk alkalmazásával. A módszer előnye, hogy az erőspektroszkópiai kísérletekhez hasonlóan vizsgálható fehérjék mechanikai letekeredése. A letekeredési szimulációk során megfigyelt erőcsúcsokhoz könnyen hozzárendelhetők a letekeredési események, valamint lehetővé teszi a fehérjeletekeredés atomi szintű jellemzését is [120], [121]. Így a kísérletekhez képest nagyobb felbontásban, pontosabban leírható a szerkezeti elemek letekeredési sorrendje, a letekeredési útvonalak.

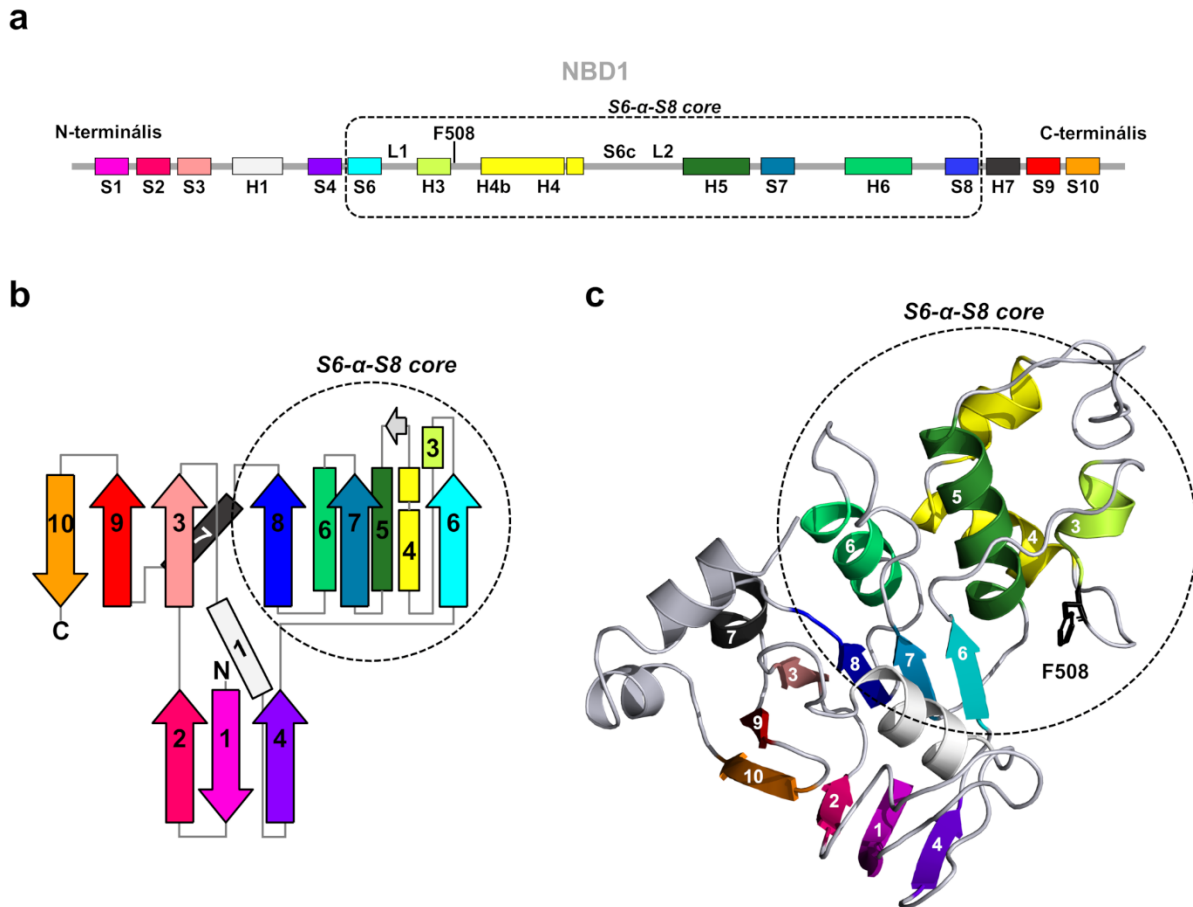
A szimulációs módszer előnyeit kihasználva célul tűztük ki a kísérletek segítségével meghatározott letekeredési útvonalak részletesebb feltérképezését. Ehhez letekeredési (*pulling*) molekula dinamikai szimulációkkal, egy egyszerűsített, Gō-nak nevezett modellt [65] alkalmazva, implicit oldószer mellett vizsgáltuk az NBD1 letekeredését (*heavy-atom* Gō, HA-Gō). A Gō egy natív szerkezet alapú modell. A szerkezet alapú modellek esetén a szimulációhoz szükséges számítások egyszerűsödnek azáltal, hogy nem veszik figyelembe a natív állapotban nem "érintkező" aminosav-kölcsönhatások nagy részét [65]–[67]. A Gō modellben a potenciálfüggvényt csak a natív állapot határozza meg, a natív szerkezetben nem érintkező atomok taszító kölcsönhatást kapnak [65]. Az egyszerűsített modellre az NBD1 méretéből (~205 aminosav) adódóan volt szükségünk, ugyanis a szimulációs módszer hátránya, hogy csak kis fehérjék letekeredése vizsgálható. Az explicit oldószerrel végzett, minden atomra kiterjedő (*all-atom*, AA) MD szimulációk hossza és időskálája korlátozott [122], egy teljes fehérje letekeredésének vizsgálata az erőspektroszkópiai kísérleteket megközelítő húzási sebesség alkalmazásával nem lehetséges [123]. Ennek a problémának egy feloldása a szerkezet alapú modellek alkalmazása, melyeket sikeresen alkalmaztak már fehérjék fel-, (*fold*) és letekeredésének (*unfold*) vizsgálatára is [65]. Az explicit oldószer hiánya jelentősen lecsökkenti az atomok számát, melyek helyzetével és mozgásával az AA-MD szimulációk esetén számolni kellene. Ez lehetővé tette a teljes NBD1 letekeredésének vizsgálatát.

Biofizikai módszerek segítségével kimutatták, hogy a $\Delta F508$ mutáció termodinamikailag és kinetikailag is destabilizálja az NBD1-et és feltehetőleg hozzájárul lokálisan kedvező energetikájú *off-pathway* intermedier szerkezetek (kinetikus csapdák) kialakulásához [49], [50]. Mások spektroszkópiai módszerekkel vizsgálták az NBD1 feltekeredésének folyamatát. Megállapították, hogy az F508 aminosav fontos kölcsönhatásokat hozhat létre a feltekeredés során, és feltételezik, hogy ezeknek szerepe lehet a *fold* helyes irányba történő terelésében [54]. Emellett azt is kimutatták, hogy a $\Delta F508$ mutáció hatással van a feltekeredés sebességére, ami okozhatja a különböző régiók nem megfelelően időzített feltekeredését, illetve nem megfelelő helyre történő illeszkedését a doménen belül [56]–[60]. A *fold* kritikus elemei az S8 és S7 β -redők. Ezek szintézise az α -alegység után következik be, azonban a katalitikus domén N-terminális régiója és az α -alegység közé szükséges illeszkedniük. A *fold* folyamatát vizsgáló kutatások

eredményei arra utalnak, hogy ezt az illeszkedést az α -alegység gyors feltekeredése, illetve nem megfelelő kölcsönhatások kialakítása gátolhatja [59], [60].

Az S8, S7 és S6 β -redők, valamint az α -alegység a szerkezetben egy önálló egységet alkot és szekvenciálisan is folytonos. Erre a régióra a dolgozatban, mint *S6- α -S8 core* (α -alegység a H6 α -hélixet beleértve + a β -alegység három β -redője: S6, S7, S8) hivatkozok. Itt található az F508 aminosav is, melynek deléciója akadályozza a CFTR helyes feltekeredését (4.1. ábra). Azért, hogy pontosabban jellemezhessük az F508 aminosav *S6- α -S8 core* régióra kiterjedő hatását, nehéz atomokra kiterjedő, explicit víz molekulák jelenlétében végzett (HA-MD) szimulációkkal vizsgáltuk az *S6- α -S8 core* letekeredési útvonalait, a letekeredés köztes szerkezeti állapotait és a letekeredés során létrejövő nem-natív kölcsönhatásokat mind a vad típusú (WT), mind pedig a Δ F508 mutációt hordozó *S6- α -S8 core* régió esetében. Továbbá, célul tűztük ki a szimulációk és az AFM kísérletek során kapott erőgörbék elemzésével a letekeredés lépéseinek közvetlen összehasonlítását is.

A BIA (5-bromoindol-3-ecetsav) egy kis molekula, mely potenciálisan hathat a CFTR első nukleotidkötő doménjének (NBD1) feltekeredésére. Mivel a BIA stabilizálta az NBD1-et a termikus letekeredéssel szemben [37], valószínűleg az NBD1 feltekeredését követően is a doménhez kötődve marad. A BIA kötőhelyének megismerése terápiás jelentőséggel bírhat. Egyrészt, mivel ez az ismeret segítheti a BIA molekula áttervezését úgy, hogy növekedjen annak hatékonysága. Másrészt hozzájárulhat újabb, az adott helyhez kötődő molekulák tervezéséhez. Ezért csoportunk további célkitűzése a BIA-korrekciónak mechanizmusának, kötőhelyének feltárása volt. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy BIA hozzáadása mellett az NBD1 mechanikai letekeredéssel szembeni ellenállása megváltozik-e.



4.1. ábra – A CFTR N-terminális (első) nukleotidkötő domén (NBD1) másodlagos szerkezeti elemeinek elrendeződése. Az NBD1 (a) domének szekvenciális elrendeződése, (b) topológiája és (c) egy 3D röntgenszerkezeten (PDB ID: 2bbo) alapuló, a regulátor inszerciót nem tartalmazó (Δ RI) szerkezete. Az NBD1 nukleotidkötő alegysége: F1-like ATP-binding core subdomain (β -redők: S6, S7, S8, S3, S9 és S10; α -hélixek: H1, H6, H7, H8, H9) és az ABC β (β -redők: S1, S2, S4) áll. Az NBD α -alegysége: ABC α (α -hélixek: H3, H4-H4b, H5). Az S6- α -S8 core (aminosav pozíció: 487-604, fekete szaggatott keretezés), mely három β -redőből (S8, S7, S6) és öt α -hélixből (H3, H4, H4b, H5, H6) áll. Ebben a szerkezeti egységben helyezkedik el az F508 aminosav is (fekete pálcika jelölés). A másodlagos szerkezeti elemeket színes téglalapok jelölik (S: β -redő, H: α -hélix).

4.2. Alkalmazott módszerek

4.2.1. Az NBD1 és az *S6- α -S8* régió letekerését reprezentáló szerkezeti sokaság előállítása szimulációs módszerekkel

4.2.1.1. Felhasznált szerkezeti modell

A szimulációkhoz kiindulási szerkezetként egy vad típusú humán NBD1 szerkezeti modellt használtunk fel, amely egy korábbi tanulmányból [1] származik és egy röntgenszerkezeten (PDB ID: 2bbo [124]) alapul. Azért, hogy illeszkedjen az erőspektroszkópiai kísérletekben használt konstrukcióhoz, a regulátor inszerciót (aminosav pozíció: 405-435) nem modelleztük (Δ RI-NBD1), a hézagot a Modeller [90] hurokmodellezésével zártuk le, a 403, 404, 433 és 434 aminosavakat hurok régióknak beállítva. Erre a fehérjére hivatkozunk úgy, mint vad típusú (WT) NBD1 domén. A Δ F508 mutációt hasonló módon modelleztük, az I507 és G509 aminosavakat Modellelrel fűztük össze.

4.2.1.2. Molekula dinamikai szimulációk az NBD1 doménnel G \ddot{o} modell alkalmazásával

A letekeredési útvonalak meghatározása céljából irányított molekula dinamikai szimulációkat végeztünk a vad típusú NBD1 doménnel egy egyszerűsített, nehéz atomokra kiterjedő, szerkezet alapú G \ddot{o} modellel (*heavy-atom* G \ddot{o} , HA-G \ddot{o}) [65]. A szerkezet alapú G \ddot{o} modell esetén a potenciálfüggvényt csak a kísérleti úton meghatározott, natív állapot határozza meg (globális energia minimum), a natív szerkezetben nem érintkező atomok pedig taszító kölcsönhatást kapnak [123]. Az általunk használt G \ddot{o} modell a hidrogén atomokra nem, csak a nehéz atomokra terjed ki (HA-G \ddot{o} modell). [123].

Azért ezt az egyszerűsített modellt használtuk, mert a 250 aminosav hosszú NBD1 esetén a teljes letekeredés elérése minden atomra kiterjedő (*all-atom*, AA), explicit víz molekulák jelenlétében végzett MD módszer alkalmazásával nagy erőforrás igényű lenne. A teljes NBD1 letekeredéséhez szükséges méretű szimulációs „dobozt” (6*6*90 nm) AA-MD esetén oldószer tölti ki (pl. TIP3P vízmodell) drasztikusan megnövelve a molekulák számát (NBD1 esetén: ~2000 fehérje atom + ~315.000 nem-fehérje atom), melyek helyzetével és mozgásával a szimulációs lépések során számolni kellene. Ezzel szemben az egyszerűsített G \ddot{o} modell esetén nem tartalmaz explicit oldószert a rendszer jelentősen megnövelve a számítási sebességet a hagyományos módszerhez képest.

A SMOG2 egy olyan szoftver, amit eredetileg fehérjék feltekeredésének tanulmányozására fejlesztettek ki [67], [125]. Segítségével a szerkezet alapú modellek alkalmazhatóak a GROMACS molekula dinamikai szimulációk számítására használt programban. Ezért, a GROMACS 4.6.7 számára a SMOG2 programcsomag segítségével generáltunk bemeneti fájlokat. A szomszédkeresésre, a nem kötésben lévő kölcsönhatásokra, az általánosított Born-féle elektrosztatikára, a nyomás-, és

hőmérsékletkapcsolásra vonatkozó opciókat a SMOG2 alapértelmezéseinek és hasonló irányított letekeredési (*pulling/unfolding*) szimulációt alkalmazó tanulmányban használt paramétereknek megfelelően állítottuk be [123], [126].

A Gō modell esetén a hőmérséklet nem felel meg a valósnak. A rendszerben mért olvadási hőmérsékletet szokás használni, ami jóval alacsonyabb az AA-MD szimulációk esetén alkalmazott fiziológiás hőmérsékletnél. Ezért, mi a Gō szimulációink során a hőmérsékletet 110 K-re állítottuk, ami az NBD1 méretű fehérjék SMOG2 rendszerben mutatott olvadási hőmérséklettartományában van [123], [126]. Az 1 ns hosszú egyensúlyba hozási lépésben a fő-, és oldallánc atomok mozgását 400, illetve 40 kJ/mol/nm² harmonikus erőállandóval korlátoztuk. Az NBD1 letekeredését a GROMACS *pull code* használatával végeztük el. A *pulling* szimulációk során egy reakciókoordinátát és két húzási csoportot (*pull group*) alkalmaztunk. Az NBD1 C-terminális végét rögzítettük, az N-terminális végét pedig állandó sebességű (5 m/s) húzásnak tettük ki, a szimulációk végére egy teljesen kitekert fehérjeláncot kapva (16 ns). A két húzási csoport tömegközéppontja között harmonikus potenciált alkalmaztunk (*umbrella pulling*). Így az erő arányos volt az elmozdulással. A húzás irányát a két húzási csoportot tartalmazó vektor iránya jelölte ki (*distance pulling*). Egy dimenzió mentén történt húzás, a rendszer z-koordinátáját vettük figyelembe az irány meghatározása során. A rugó állandó (*pull k*) értéke 1000 kJ/mol/nm² volt. Összesen 100, eltérő kezdeti sebességű szimulációt indítottunk a vad típusú NBD1 doménnel.

4.2.1.3. Nehéz atomokra kiterjedő molekula dinamikai szimulációk az S6- α -S8 core peptiddel

Azért, hogy részletesen és pontosan jellemezhesük az NBD1 S6- α -S8 core régiójának a letekeredését, atomi szintű irányított molekula dinamikai szimulációkat végeztünk a szolvatált vad típusú és a Δ F508 S6- α -S8 core régióval (WT S6- α -S8 core és Δ F508 S6- α -S8 core; aminosav pozíció: 487-604). Ezek a számítások realiztikusabb, pontosabb jellemzését tették lehetővé a letekeredési útvonalaknak.

Az atomisztikus (összes atomot tartalmazó) erőkkel végzett klasszikus szimulációk esetében a leggyorsabb mozgások a kötésben lévő hidrogén atomok rezgései. Ezeknek a mozgásoknak a frekvenciája többszöröse a többi kölcsönhatás időskálájának. Így az összes mozgás pontos kiszámításához kis időlépték alkalmazására van szükség. Ez a kis lépésköz a legtöbb mozgást a szükségesnél sokkal gyakrabban frissíti, ami felesleges számítási kapacitást emészt fel. Ez elkerülhető a gyors rezgések teljes eltávolításával. Ezért a minden atomra kiterjedő molekula dinamikai szimulációink esetén a számítás felgyorsításához a szerkezeti modellben a hidrogén atomokat úgynevezett tömeg nélküli virtuális kölcsönhatási helyekkel helyettesítettük (nehéz atomokra kiterjedő, HA-MD), eltávolítva a rendszer leggyorsabb szabadsági fokát, a hidrogén atomok rezgéseiből származó kötésszög-változásokat [64]. Ezáltal nagyobb időléptéket tudunk beállítani a szimulációkhoz (2 helyett 4 fs), és azok gyorsabban lefutottak. A virtuális kölcsönhatási helyek

bevezetését egy tanulmányban szimulációs módszerek alapos összehasonlításával vizsgálták és azt a következtetést vonták le, hogy nincs jelentős hatása a fehérje dinamikára [127].

A szimulációk futtatására a 2019-es GROMACS verziót [76] használtuk a fehérjékre optimalizált CHARMM36m erőter [77] és az erőterben implementált TIP3P explicit vízmodell [78] alkalmazásával. A rendszerben a KCl koncentráció fiziológias volt (150 mM). A szimulációk során az elektrosztatikus kölcsönhatások kiszámítására a *fast smooth* PME algoritmust [83], a kötéshosszok korlátozására pedig a LINCS algoritmust [84] használtuk. A szerkezetek energiaminimalizálását a *steepest decent integrator* alkalmazásával tettük meg (konvergált, ha az erő <1000 kJ/mol/nm). Minden *pulling* szimuláció előtt két fázisban egyensúlyba hoztuk a rendszert (*equilibration*). Először NVT, majd NPT futtatás következett a hőmérséklet és a nyomás stabilizálásának céljából (T=310 K, P=1 bar). Ezekhez a futásokhoz egy módosított Berendsen termosztátot (V-rescale) és a Parrinello-Rahman barosztátot használtuk 0.1, illetve 2 ps időállandót alkalmazva. Az egyensúlyba hozást 50-50-szer végeztük el a WT *S6- α -S8 core* és a Δ F508 *S6- α -S8 core* esetén is, hogy különböző kezdeti sebességekkel független szimulációkhoz generáljunk kiindulási állapotokat. A *pulling* szimulációkhoz a Nose-Hoover termosztátot és a Parrinello-Rahman barosztátot (izotróp csatolás) használtuk, ezek időállandója 2, illetve 5 ps volt.

A letekeredési szimulációkat ebben az esetben is a GROMACS *pull code* segítségével végeztük el. A *pulling* során egy reakciókoordinátát és két húzási csoportot (*pull group*) alkalmaztunk. Az *S6- α -S8 core* szerkezet C-terminális vége volt rögzítve (S8 β -redő), az N-terminális végén (S6 β -redő) pedig egy olyan változó nagyságú erő hatott, amely állandó sebességű (1 m/s) húzásnak tette ki ezt a peptidet, a szimuláció végére teljesen letekerve azt (40 ns). A két húzási csoport tömegközéppontja között harmonikus potenciált alkalmaztunk (*umbrella pulling*). A húzás irányát a két húzási csoportot tartalmazó vektor iránya jelölte ki (*distance pulling*). Egy dimenzió mentén történt húzás, a rendszer z-koordinátáját vettük figyelembe az irány meghatározása során. A rugó állandó (*pull k*) értéke 1000 kJ/mol/nm² volt. Ez a húzási beállítás megfelelt a kísérleti rendszerben használttal, kivéve a húzási sebesség nagyságát. Az erőspektroszkópiai kísérletek során alkalmazott húzási sebesség nagyságrendekkel kisebb a szimulációk során alkalmazotténál (10⁻⁶ m/s). Összesen 50-50 szimulációt indítottunk a WT *S6- α -S8 core* és a Δ F508 *S6- α -S8 core* peptideket tartalmazó rendszerrel.

4.2.2. Letekeredési útvonalak és köztes szerkezeti állapotok meghatározása

4.2.2.1. Letekeredési útvonalak

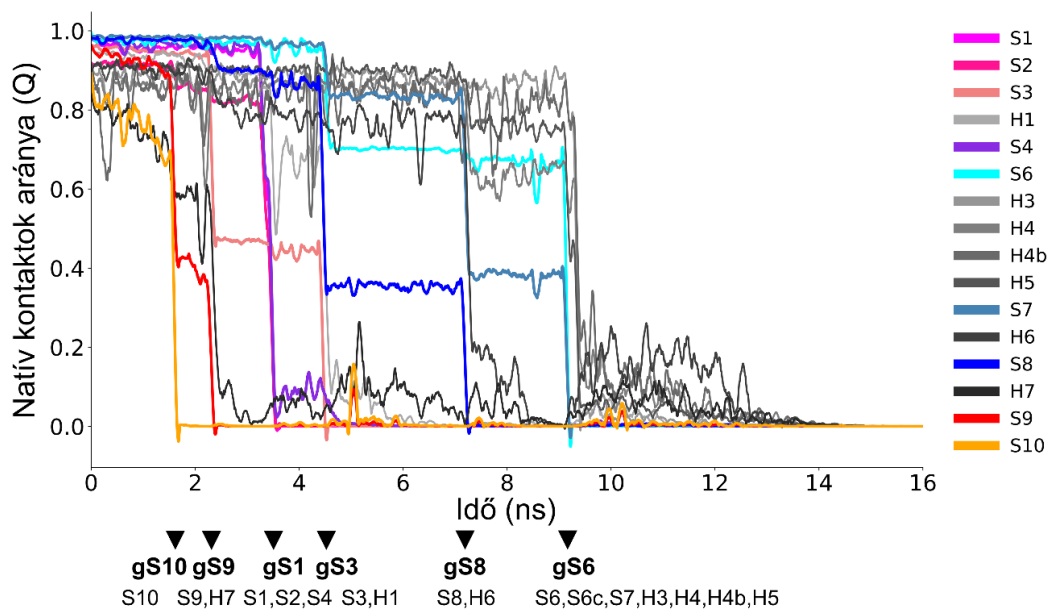
A nem-natív kölcsönhatások befolyásolhatják a fehérjék feltekeredését a fehérje stabilitásán, a feltekeredés sebességén, a szabadenergia felszín módosításán, valamint lokálisan alacsony energetikájú köztes szerkezeti állapotokon, *foldings* intermedier szerkezeteken keresztül. Azonban Best és munkatársai

bizonyították, hogy habár a nem-natív kölcsönhatásoknak is szerepe lehet a fehérje feltekeredésének meghatározásában, azonban szimulációs rendszerben a natív kölcsönhatások aránya is megfelelően leírja fehérjék feltekeredésének (*fold*ing) folyamatát, s így a nem-natív kölcsönhatások elhanyagolhatók. Ezt különböző $G\bar{o}$ modellel végzett, valamint hagyományos *all-atom* MD szimulációk összehasonlításával mutatták meg [128]. Ezért az NBD1 doménnel végzett, letekeredési, natív kölcsönhatásokon alapuló $G\bar{o}$ szimulációinkban a letekeredési útvonalakra a natív kölcsönhatások arányából következtethetünk.

A letekeredési útvonalak elemzését a következő módon végeztük. Meghatároztuk a másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -redő) kiindulási szerkezetben egymás között jelen lévő, natív kölcsönhatásait (kontaktusait). Minden egyes letekeredési szimuláció esetén kiszámoltuk a natív kölcsönhatások kezdeti értékhez viszonyított arányát (Q) [128] a szimulációs trajektória mentén (idő függvényében). Egy szerkezeti egység leválása a doménről akkor következik be, amikor natív kontaktusainak száma hirtelen nulla közeli értékre csökken le. Ezért letekeredési eseményként azonosítottuk a Q érték egy küszöbérték alá csökkenését (NBD1: 0.2, *S6- α -S8 core*: 0.1). Így minden egyes szimulációs trajektória esetén azonosítottuk a másodlagos szerkezeti egységek letekeredési sorrendjét, azaz a letekeredési útvonalakat. Ezeket összesítve kaptuk meg az egyes letekeredési útvonalak gyakoriságát. Legtöbb esetben a másodlagos szerkezeti elemek nem önállóan tekeredtek le, hanem letekeredési csoportokat alkottak. Tehát több másodlagos szerkezeti elem is egyszerre tekeredett le. Ezeket az egyszerre letekeredő szerkezeti elemeket letekeredési csoportokba soroltuk (4.1. táblázat). Erre példa az S1, S2 és S4 redők együttes letekeredése, melyet a gS1 (*group S1*) jelöl. A 10-es számú β -redő (S10) volt az egyetlen, amely minden esetben külön egységként vált le. Az 4.2. ábra mutatja egy $G\bar{o}$ szimuláció során számolt Q értékeket és az abból meghatározott letekeredési csoportokat.

Csoport	Másodlagos szerkezeti elemek
gS10	S10
gS9	S9, H7
gS1	S1, S2, S4
gS3	S3, H1
gS8	S8, H6
gS6	S6, S6c, S7, H3, H4, H4b, H5

4.1. táblázat – Letekeredési csoportok definiálása. A csoport nevét egy „g” (group) és az azt tartalmazó β -redő jelöli. A csoportban szereplő másodlagos szerkezeti elemek fel vannak tüntetve: S (Strand), mint β -redő; H (Helix), mint α -hélix.



4.2. ábra – Az NBD1 másodlagos szerkezeti elemek letekeredése egy HA-G ϕ szimuláció során. A natív kontaktusok arányát (Q) minden egyes szerkezeti elemre kiszámítottuk és ábrázoltuk. A Q értéket színes vonalak jelölik a β -redők, szürke vonalak pedig az α -hélixek esetén. Nyilak mutatják a főbb letekeredési eseményeket, amelyeket a csoportban lévő β -redő neve jelöl. A letekeredési csoport neveit és tagjait félkövér, illetve normál betűtípussal jelöltem.

4.2.2.2. A letekeredés során kialakuló intermedier szerkezetek meghatározása

A letekeredés köztes szerkezeti állapotainak meghatározása céljából csoportosítottuk a letekeredés során kapott konformációs sokaság szerkezeteit. A szerkezeti csoportosítást kontakt alapú páronkénti RMSD (átlagos négyzetes eltérése) értékek számításával, 0.8 nm küszöbérték alkalmazásával végeztük el [129]. Minden egyes szimuláció esetén meghatároztuk a páronkénti aminosav távolság mátrixát a trajektória szerkezeteinek úgy, hogy a 0.8 nm-es határérték feletti távolság értékeket már nem vettük figyelembe, azokat 0.8 nm értékkel helyettesítettük. A páronkénti kontakt alapú RMSD értékeit ezekből a távolságmátrixokból számoltuk ki a következőképpen:

$$RMSD(f_i, f_j) = \frac{1}{N} \sum_{i,j} (f_i - f_j)^2$$

ahol N az aminosavak száma, f_i az i . számú szerkezet páronkénti aminosav távolság mátrixa. Ez a fajta távolság metrika az egymástól távol eső aminosavak közötti távolság változást elhanyagolja, melyek elrejténék a még feltekeredett régióban jelen lévő fontosabb kölcsönhatások változásait. A konformációk csoportosításához a DBSCAN sűrűség alapú klaszterező algoritmust alkalmaztuk [130]. Az egyes letekeredési szimulációkra először külön-külön végeztük el a csoportosítást. Első lépésben egy trajektória szerkezeteit csoportosítottuk a számolt kontaktus alapú RMSD értékeket felhasználva, majd meghatároztuk a csoportok központi elemeit (centroidokat). Ezt követően az összes trajektória centroid szerkezetein szintén elvégeztük a csoportosítást. Ezek, a második lépésben generált szerkezeti csoportok centroid szerkezetei jellemzik az összes szimuláció során kapott, a letekeredést jellemző szerkezeti változásokat. Azon centroidokat nem vontuk be a második csoportosításba, melyek csoportja kevesebb szerkezetet tartalmazott, mint a trajektórián belül csoportokba sorolt szerkezetek 5%-a. A klaszter centroidokat egy hasonlósági érték [131] alapján választottuk ki:

$$S_{ij} = e^{-D_{ij}/D_{std}}$$

$$argmax_i = \sum_j S_{ij}$$

ahol D a csoport szerkezeteinek páronkénti távolság mátrixa (kontakt RMSD értékek), S_{ij} két szerkezet páronkénti hasonlósága, D_{ij} ($RMSD_{ij}$) a csoport i . és j . szerkezetek páronkénti távolsága, D_{std} a D mátrix

szórása, $argmax_i$ az i . szerkezet, aminek maximális az összesített hasonlósága a csoporton belül. Tehát a centroid a csoporton belül az összes többi szerkezethez legjobban hasonlító konformáció.

4.2.3. Intermediér szerkezetek jellemző kölcsönhatásainak vizsgálata

4.2.3.1. Nem-natív kölcsönhatások elemzése

A kölcsönhatások vizsgálata céljából meghatároztuk az egyes letekeredési trajektóriák esetén a letekeredés során a natív és nem-natív kölcsönhatások normalizált számát. Akkor tekintettünk egy aminosav párt kontaktban lévőnek, ha a pár bármely atomja közötti távolság a 0.45 nm-es *cutoff* értéken belül volt. Natív kölcsönhatásként azonosítottuk azokat az aminosavpárokat, melyek az 50 szimuláció kiindulási szerkezetének legalább 75%-ában *cutoff* értéken belüli távolságra voltak egymástól. Azokat az aminosav párokat, amelyek nem voltak kontaktusban a kiindulási szerkezetben, de a letekeredési szimulációk során a *cutoff* értéknél közelebb kerültek egymáshoz, nem-natív kontaktusként jelöltünk. A nem-natív kölcsönhatások jellemzésére közelségi értékeket [132] számoltunk az alábbi képlet szerint:

$$proximity(a_i, a_j) = \begin{cases} (cut - d_{ij})/cut & d_{ij} < cut \\ 0 & d_{ij} \geq cut \end{cases}$$

ahol *cut* jelöli két aminosav közötti megengedett maximális távolságot (0.45 nm), a_i az aminosav az i . pozícióban, d_{ij} az i . és j . pozíciójú aminosavak közötti távolság. A közelség érték maximálisan egy a *cutoff* értéknél kisebb távolságok esetén, nulla a *cutoff* vagy az annál nagyobb távolságok esetén. A páronkénti közelségértékeket a vad típusú és a $\Delta F508$ mutánsú végzett szimulációk esetén külön-külön számoltuk ki a szimulációs trajektóriák azon szakaszán, ahol a nem-natív kölcsönhatások számában növekedést figyeltünk meg (18-25 ns). A vad típusú és a $\Delta F508$ szimulációkból számolt páronkénti közelségértékeket külön-külön összegeztük egy összesített páronkénti közelségértékeket tartalmazó mátrixot kapva. Ezen értékek alapján számoltuk ki az aminosavanként összesített közelségértékeket (adott aminosav kontaktusainak összegzése).

4.2.3.2. DMD folding szimulációk

Úgy gondoltuk, hogy a vad típusú $S6-\alpha-S8$ core letekeredése során az utolsó lépésben megfigyelt intermediér szerkezetben jelen lévő nem-natív kölcsönhatások szerepet játszhatnak e régió (NBD1 α -aldomén) feltekeredésének korai fázisában. Azért, hogy feltevésünket teszteljük, replikacsere diszkrét potenciálú molekula dinamikai (REX-DMD) [68], [69] *fold*ing szimulációkat végeztünk egy rövid, teljesen megnyújtott peptiddel. Ez az NBD1 azon szakasza, ahol nem-natív kölcsönhatások alakultak ki a

letekeredési szimulációk során (aminosav pozíció: 491-567). A kiindulási állapotként használt peptidszakasz kinyújtott konformációját egy CHARMM szkript segítségével hoztuk létre. A diszkrét molekula dinamikai szimulációk során az atomok közötti kölcsönhatások leírása a hagyományos MD során alkalmazott folytonos potenciálfüggvények helyett diszkrét lépcsős függvényekkel történik. A DMD szimulációinkhoz minden atomra kiterjedő peptid modellt és a diszkrét Medusa erőteret alkalmaztuk [133]. Ez az erőter egy implicit oldószer modellt vesz igénybe. A nyújtott peptid szakasz kölcsönhatásainak hatékonyabb feltérképezésére a replikacsere módszerét alkalmaztuk, ami egy „fokozott” mintavételezést lehetővé tévő módszer. A nyújtott peptid szakaszt tartalmazó rendszerrel nyolc replikát futtattunk különböző hőmérsékleteken (0.5246, 0.5451, 0.5665, 0.5886, 0.6116, 0.6355, 0.6604 és 0.6862 önkényes hőmérséklet egység), mindet 1,000,000 időegységen keresztül. A szimulációs hőmérsékletek cseréje periodikus időközönként egy Monte Carlo típusú függvény alapján cserélődik ki a replikák között. A replikák cseréjének feltételeit 1,000 időegységenként teszteltük. Az alkalmazott hőmérsékletek 23-51%-os csere valószínűséget biztosítottak a szomszédos replikák között. A szerkezeti állapotokat 200 időegységenként mentettük el, így minden hőmérsékletre 5000 konformációt generáltunk. A diszkrét molekula dinamikai számítások során Anderson termosztátot használtunk, és a hőcserélő tényezőt 0.01-re állítottuk be. Az egyes trajektóriák konformációit hőmérséklet szerint csoportosítottuk, és a legmagasabb hőmérsékletű konformációkat használtuk az elemzéshez.

4.2.4. Kísérleti eredmények összehasonlítása a HA-MD szimulációkból nyert adatokkal

4.2.4.1. Egyedi-molekula erőspektroszkópiai kísérletek az NBD1 letekeredésének vizsgálatára

Az erőspektroszkópiai kísérleteket nem én végeztem. Mivel szerves részét képezi a munkámnak a szimulációs és kísérleti módszerek összehasonlítása miatt, ezért itt röviden bemutatom a módszert.

A kísérletekhez csoportunk egy cisztein nélküli [134], His6-jelölt, SUMO-fúziós humán NBD1 fehérjét használt. Ebben a fehérjében az NBD1 domén N-terminális végéhez egy SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) fehérjét fuzionáltak (SUMO-fúziós-NBD1 konstrukció). A SUMO fehérje jelenlétének két előnye van. Egyfelől javítja az NBD1 oldhatóságát elősegítve azt, hogy a fehérje termelése során ne csapódjon ki. Másrészt a SUMO fehérje karakterisztikus jelet ad a letekeredés során, aminek segítségével könnyebben azonosíthatók a vizsgálni kívánt mérési adatok (lásd később). A regulátor inszerció hiányzik ebből a konstrukcióból (Δ RI, aminosav pozíció: 405-436), mivel ez a deléciónövel a fehérje stabilitását és oldhatóságát [18]. Ez különösen fontos volt a Δ F508 mutáns esetében [18], [50], [135]. A termelt fehérjében a ciszteineket alanin, illetve valin helyettesíti. Ez 5 ciszteint érintett: C491A, C524V, C590V, C592V, C647A. A cisztein nélküli konstrukció használatára azért volt szükség, hogy ne zavarják a terminálisan bevezetett ciszteineken keresztül történő immobilizációt. A SUMO-NBD1 konstrukciókat *E.*

coli Rosetta 2 (DE3) pLysS törzsből, a His6-jelölt fehérjét Ni-NTA affinitás oszlopon (Profinity IMAC Ni-Charged, BioRad) tisztították. Az egyszerűség kedvéért erre a cisztein mentes és regulátor inszerció nélküli, Cys-less NBD1 Δ RI konstrukcióra NBD1-ként hivatkozok a továbbiakban.

A frissen hasított csillámfelületet APTES reagens felhasználásával funkcionálizálták. Az NBD1 terminális ciszteinjét Sulfo-SMCC segítségével kötötték az APTES-sel bevont csillámhoz. Az erőspektroszkópiát egy Cypher atomerő-mikroszkóp (AFM) műszerrel (Asylum Research) végezték PNP-TR rugólapka (rugóállandó: 100-200 pN/nm, NanoWorld) használatával. A kísérleteket 25 °C-on, PBS pufferben (pH 7,2) végezték [116]. A műszer először a hegyet egy másodpercen keresztül a csillámfelületen tartotta 1 nN állandó erő alkalmazásával, ami az NBD1-SUMO fehérje rugólapka hegyéhez történő nem-specifikus rögzítését eredményezte. Azt, hogy a kötődés megtörtént-e, illetve a megfelelő helyen, a fehérje N-terminálisán történt-e meg, az eredmények elemzése mutatta meg (lásd később). A rugólapka csillámfelületen történő tartását követően állandó sebességgel (1 μ m/s) húzta vissza a tűt a felszíntől eltávolítva azt (4.3. ábra, a), miközben az erőváltozások rögzítésre kerültek. A fehérjehúzásonként kapott letekeredési erőgörbéken megfigyelt fűrészfog-szerű csúcsok (megemelkedett erőértékek) megfelelnek az egyes szerkezeti elemek letekeredésének. Ugyanis a fehérje húzásakor a szerkezeti egység ellenállása következtében a kifejtett erő folyamatosan emelkedik. Ez az emelkedés addig tart, amíg egy szerkezeti egység stabilizáló kölcsönhatásai felbomlanak, a szerkezet „megropan” és az erő érték hirtelen lecsökken. Ekkor elkezdődik a letekeredés.

A WLC (*worm-like chain*) modell egy, a biopolimerek entrópiikus rugalmasságának és konformációjának leírására használt modell. Alkalmazzák az erőspektroszkópiai mérések során kapott fehérjeletekeredési adatok elemzéséhez [136]–[138], [116]. Az erőspektroszkópiai fűrészfog mintázatú görbék felfutó szakaszaira illesztve kapható meg a már letekeredett fehérjeszakasz maximális hossza, a kontúrhossz (L_c), illetve a hajlítómerevséget jellemző perzisztenciahossz. Az egyes letekeredési lépésekhez tartozó kontúrhossz értékekből kiszámolható két csúcs közötti kontúrhossz-növekedés (ΔL), ami megfelel az adott letekeredett fehérjeszakasz hosszának. Csoportunk a kísérletek során kapott erőgörbe csúcsok felszálló ágaira a WLC polimermodellt illesztette, amely alapján Asylum Research AFM meghajtó szoftverrel kibővített Igor Pro (Wavemetrics) alkalmazásával határozták meg a letekeredési eseményekhez (erőgörbe csúcsai) tartozó kontúrhossz (L_c), illetve kontúrhossz-növekedés (ΔL) értékeket. Mivel az AFM tű véletlenszerű pontokon kapcsolódik a fehérjéhez és nem feltétlenül a fehérje végét sikerül megragadni, a felvett erőgörbék egy része nem a teljes fehérje letekeredését mutatja. Ez indokolja a megfelelő erőgörbék kiválogatását. Az elemzéshez a teljes hosszúságú NBD1-SUMO fehérje húzásából származó erőgörbékét választották ki. Az erőgörbéknek két feltételnek kellett megfelelniük. Egyrészt a számolt polimerhossz megközelítőleg egyezett az NBD1-SUMO fehérje hosszával (teljes hossza \sim 110-120 nm). Másrészt az erőgörbe tartalmazta a SUMO letekeredésének ujjlenyomatát, egy \sim 25 nm-es kontúrhossz-növekedést az

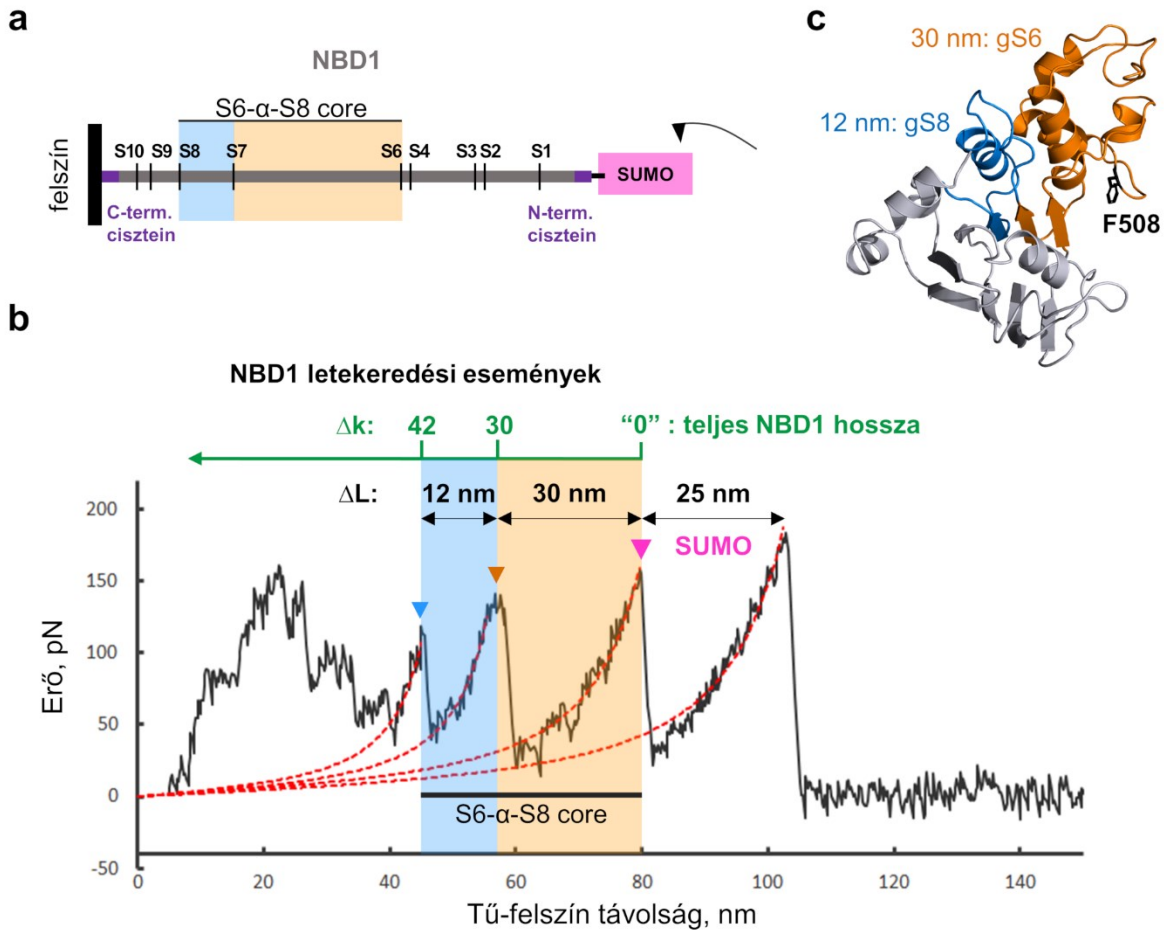
erőgörbe terminális szakaszán. A SUMO mechanikai ellenállása nagy, ezért tekeredik ki ez a fehérjedomén utoljára. Mivel a SUMO letekeredése előtt detektált kontúrhossz-növekedések (ΔL) származnak az NBD1 letekeredéséből, ezeket összegyűjtötték és ezeket felhasználva azonosították a letekeredő szakaszoknak megfelelő szerkezeti régiókat (4.3. ábra, b-c). Az NBD1 letekeredését jellemző események eloszlását úgy ábrázoltuk, hogy az utolsó esemény, a SUMO domén letekeredésének kezdetét használtuk referenciapontként. Ettől a letekeredési eseménytől kiszámítottuk a különböző csúcsokhoz tartozó kontúrhossz-növekedéseket (Δk), majd ezeket hisztogramon ábrázoltuk. Ez lehetővé tette a szimulációs eredményekkel történő összehasonlítást is. A referenciaponttól számolt kontúrhossz-növekedés (Δk) értékek meghatározását a 4.3. ábra szemlélteti.

4.2.4.2. A kontúrhossz-növekedések számítása a szimulációs erőgörbékből.

A molekula dinamikai szimulációk és a kísérleti eredmények összehasonlítása érdekében az AFM kísérletekhez hasonlóan a szolvatált, atomi *S6- α -S8 core* MD szimulációkban is kiértékeljük az erőgörbéket. A kontúrhossz értékeket (L_c) és azok növekményeit (ΔL) az egyszerű polinomiális WLC polimermodell adatokra történő illesztésével határoztuk meg [139]. Az *S6- α -S8 core* szimulációk esetén a kísérleti adatokhoz hasonlóan, a fehérje teljes letekeredését referenciapontként használva meghatároztuk a referenciaponttól számított kontúrhossz-növekedéseket (Δk). Ezek eloszlását az AFM kísérletek során mért kontúrhossz-növekedések (Δk) hisztogramjain ábrázoltuk.

4.2.4.3. Szakítóerők meghatározása a szimulációs erőgörbékből

A másodlagos szerkezeti elemek letekeredéséhez szükséges erő értékeket (szakítóerő, *rupture force*), a szimulációs trajektóriákból határoztuk meg. Ehhez kigyűjtöttük a szerkezeti elemek letekeredéséhez köthető erőgörbe-csúcspontokat azok szimuláció során történő letekeredési időpontjai alapján. Majd kiszámoltuk az ezekből a letekeredési eseményekből származó szakítóerők normalizált gyakoriságát és eloszlását.



4.3. ábra – Az NBD1 szerkezeti elemek letekeredéséhez köthető kontúrhosszak meghatározása az AFM mérésekkel kapott erőgörbékből. (a) A cisztein nélküli Δ RI konstrukció sematikus ábrázolása. A SUMO-jelölt NBD1-et diszulfidkötésen keresztül immobilizálták a csillám felületén. A β -redők hozzávetőleges helyzetét S betűkkel jelöltük. (b) Egy mérés során kapott, jellegzetes fűrészfog mintázatot mutató erőgörbe. A letekeredési eseményeket háromszögek jelölik. Csoportunk a csúcsokra WLC polimermodellt illesztett (piros szaggatott vonalak), aminek segítségével meghatározták a köztes szerkezetek letekeredéséből származó kontúrhossz-növekedés (ΔL) értékeket. Ezen az erőgörbén egy 12 nm és egy 30 nm hosszú (ΔL) fehérjeszakasz letekeredése látható. A teljes NBD1 letekeredését követően a 25 nm kontúrhossz-növekedés a SUMO domén letekeredéséhez (magenta háromszög) köthető. (c) Az NBD1 szerkezetén kék és narancssárga szín jelöli a b) panelen látható erőgörbe (egyetlen letekeredés) esetén számolt kontúrhossz-növekedés értékeknek megfelelő szerkezeti régiókat, melyeket egyértelműen sikerült beazonosítani. Ezek egy 12 nm (32 a.a.) és egy 30 nm (83 a.a.) hosszú fehérje szakaszok voltak. A 12 nm a gS8 letekeredési csoportnak, míg a 30 nm a gS6 letekeredési csoportnak felelt meg. A b) panelen láthatóak az ezekhez a letekeredési eseményekhez köthető, referenciaponttól számolt kontúrhossz-növekedés értékek (Δk). A referenciapont az NBD1 teljes letekeredése, azaz a SUMO domén letekeredésének kezdetéhez köthető csúcs (magenta háromszög, zöld „0” pont). Ez értelmezhető, mint a „SUMO doméntől mért távolság”. Az utoljára letekeredő fehérjeszakasz egy $\Delta L=30$ nm kontúrhossz-növekedést eredményez, ez $\Delta k=30$ nm a referenciaponttól. A $\Delta L=12$ nm kontúrhossz-növekedést eredményező fehérje régió pedig egy $(30+12)$ $\Delta k=42$ nm a referenciaponttól. Ezeknek a Δk értékeknek az eloszlását mutatják a hisztogramok.

4.2.5. Adatok elemzéséhez és vizualizálásához felhasznált eszközök

A munka során az elemzéshez a GROMACS beépített funkcióit [76], saját, illetve a csoportunk Python szkriptjeit használtam. Az elemzés során a nyílt forráskódú, molekula dinamikai szimulációk elemzéséhez fejlesztett MDAnalysis könyvtárat [91] vettem igénybe.

A natív kölcsönhatások arányának (Q) meghatározását Python segítségével, az MDAnalysis csomag felhasználásával végeztem (*soft_cut* metrika, [128]). A szerkezetek csoportosítását (DBSCAN [130]) és a centroidok kiválasztását [131], továbbá a natív, valamint nem-natív kölcsönhatások elemzését, a közelségi értékek számítását [132] és az egyes szerkezeti elemek szakítóerőinek meghatározását szintén Python segítségével végeztem. A szimulációkból kapott erőgörbékkel a kontúrhossz értékeket (Lc) és azok növekményeit (ΔL) saját, illetve a csoportunk Python szkriptjeinek felhasználásával számoltam.

A szerkezetek vizualizálásához PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.4 Schrödinger, LLC), illetve a VMD: Visual Molecular Dynamics [92] programot használtam. A grafikonokat a Python Matplotlib [93] könyvtárának segítségével generáltam.

4.3. Eredmények ismertetése

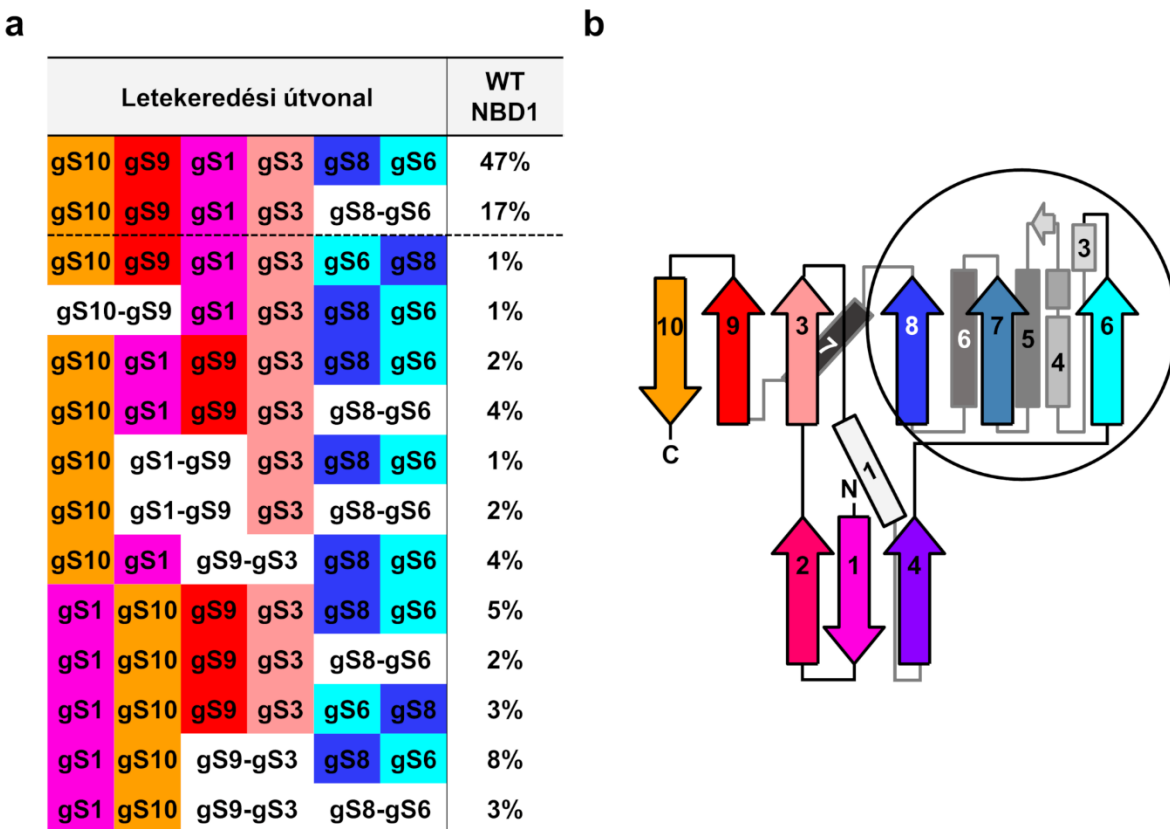
4.3.1. A G α szimulációk lehetővé tették az NBD1 letekeredési útvonalak feltérképezését hozzájárulva az AFM kísérleteink elemzéséhez

A CFTR kloridcsatorna NBD1 domén szerkezetét erőspektroszkópai (AFM) kísérletek és szimulációs módszerek kombinálásával vizsgáltuk. Azért, hogy az AFM kísérletekhez hasonlóan, azonban nagyobb felbontásban, meghatározzuk az NBD1 letekeredésének lépéseit, irányított molekula dinamikai szimulációkat végeztünk az NBD1 doménnel. Ehhez egy egyszerűsített, natív szerkezet alapú HA-G α modellt alkalmaztunk. A letekeredési útvonalak meghatározását a másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -redő) natív kölcsönhatásainak szimuláció során bekövetkező változásai alapján végeztük el. Minden egyes szimuláció esetén (n=100) megállapítottuk a szerkezeti egységek letekeredésének sorrendjét, majd ez alapján számoltuk ki a különböző letekeredési útvonalak gyakoriságát (4.4. ábra). Számos alternatív útvonalat megfigyeltünk, melyek közös tulajdonsága, hogy az NBD1 letekeredése minden esetben a β -alegységgel kezdődött. A H6 α -hélix és az α -alegység csak ezt követően tekeredett le.

Az NBD1 letekeredése során leggyakrabban először az S10 vált le önmagában (gS10), majd ezt követték a gS9, gS1, és gS3 letekeredési csoportok. Az ezt követően megmaradó átmeneti szerkezeti egység három β -redőből (S6, S7, S8), a H6 α -hélixből és az α -alegységből áll. A letekeredés ezzel a szekvenciálisan folytonos és szerkezetileg is egy egységet alkotó régióval (4.1. ábra és 4.4. ábra, b) zárul, ezért ennek az egységnek az *S6- α -S8 core* elnevezést adtuk. Ez a szerkezet többféleképpen is letekeredett a G α szimulációkban. A leggyakoribb esetben a gS8 letekeredésével kezdődik a *S6- α -S8 core* letekeredése (68%).

Gyakoriság szerint ezt követi a teljes *S6- α -S8 core* egyszerre történő letekeredése (gS8-gS6, 28%). Az esetek kis százalékában gS6-tal kezdődő letekeredést is megfigyeltünk (4%).

Összességében két fő letekeredési útvonalat figyeltünk meg, melyek egymástól az *S6- α -S8 core* régió letekeredésében különböztek (külön-külön: gS8, gS6 (47%) vagy egyszerre: gS8-S6 (17%)). Ezek mellett számos alacsony valószínűséggel előforduló alternatív útvonal is látható (1-8%). Az ezek közti különbség jelentős része bizonyos szerkezeti elemek együttes letekeredéséből adódik, mint például a gS10 és gS9 (4.4. ábra, a panel – táblázat 4. sora) vagy a gS1 és gS9 (4.4. ábra, a panel – táblázat 7. sora) csoportok együttes letekeredése mindkét esetben az útvonalak 1-1%-át teszik ki.



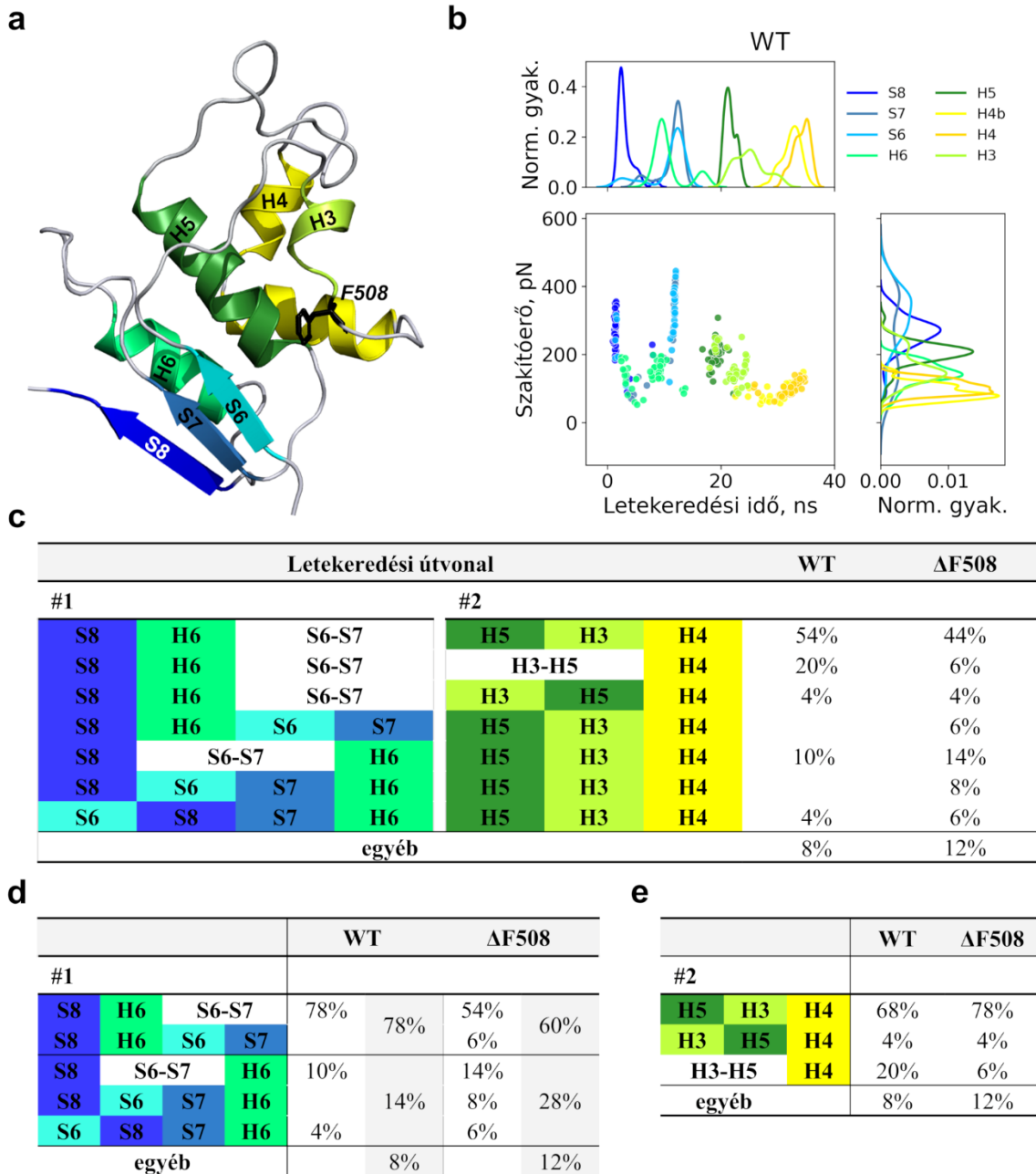
4.4. ábra – A különböző letekeredési útvonalak gyakorisága *G δ* szimulációk esetén. (a). Az együttesen letekeredő szerkezeti elemeket a csoportban lévő β -redő neve jelöli. A szaggatott vonal feletti, felső két sor mutatja a két leggyakoribb útvonalat. (b) Az NBD1 topológiája. Színek jelölik a különböző β -redőket, a feketével bekarikázott régió pedig az *S6- α -S8 core* régiót jelöli.

Ezeket a G α szimulációkat a módszer nagymértékű egyszerűsítéséből adódóan nem használtuk fel a részletes elemzésnél, illetve a vad típusú és mutáns fehérjék közti különbségek kimutatásánál. Mivel azonban a másodlagos szerkezeti elemek letekeredési sorrendjének (letekeredési útvonalak) megállapításához alkalmasnak bizonyultak [128], így ezeket felhasználtuk a letekeredési események pontos meghatározásához. Ez jelentősen hozzájárult az erőspektroszkópiai kísérleteink elemzésének sikerességéhez.

4.3.2. Egyes másodlagos szerkezeti elemek kötődése gyengébb a Δ F508 mutáns esetén

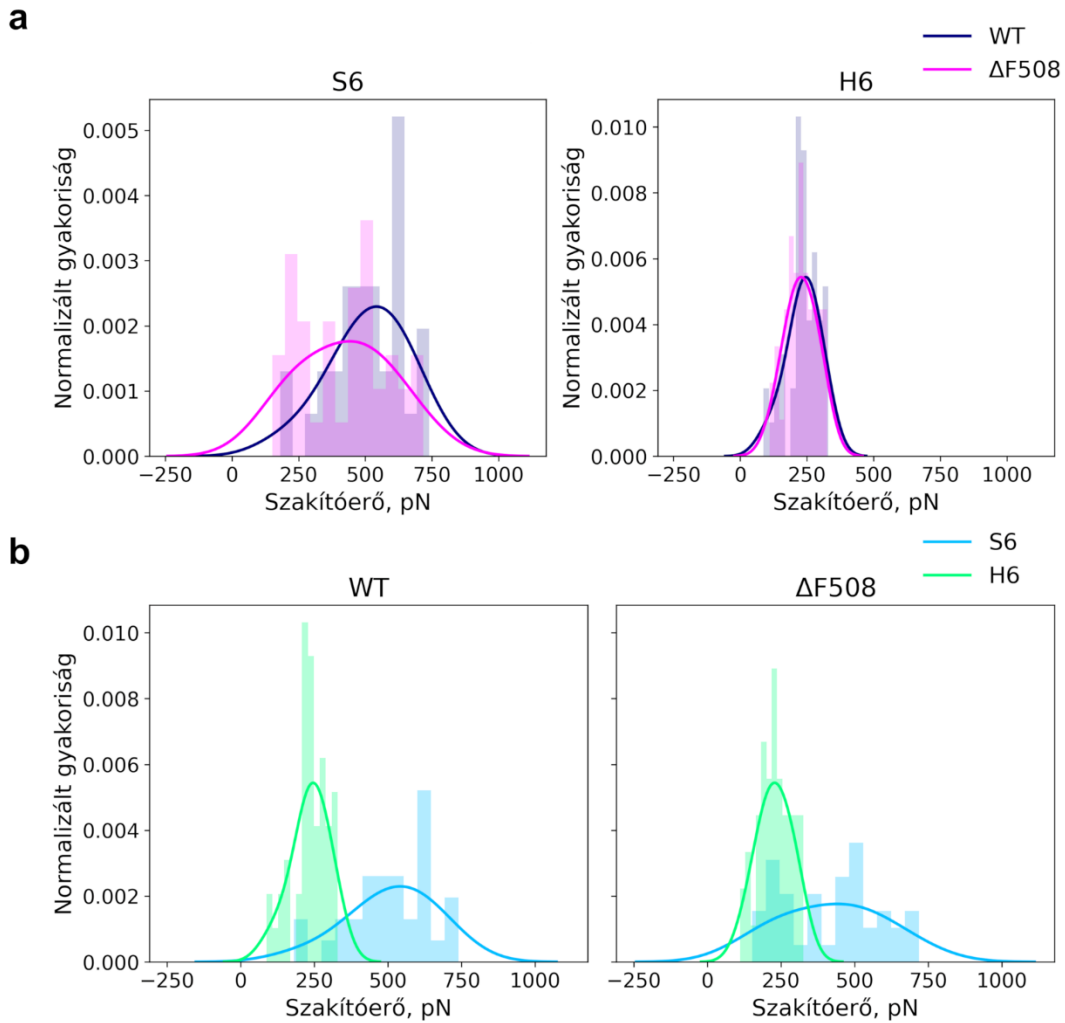
Azért, hogy pontosabban jellemezhesük az F508 aminosav és ennek deléciónak *S6- α -S8 core* régióra kiterjedő hatását, a nehéz atomokra kiterjedő, explicit oldószer jelenlétében végzett, *pulling* molekula dinamikai (HA-MD) szimulációkat végeztünk a vad típusú és a Δ F508 *S6- α -S8 core* régióval (WT *S6- α -S8* és Δ F508 *S6- α -S8*) (4.5. ábra, a). Ezek a szimulációk a nem-natív kölcsönhatásokat is figyelembe veszik, így a letekeredési útvonalak és a letekeredés köztes szerkezeti állapotainak realiztikusabb, pontosabb jellemzését tették lehetővé. Ezek a szimulációk lehetőséget adtak a letekeredés során esetlegesen kialakuló nem-natív kölcsönhatások, valamint az F508 aminosav és környezete kölcsönhatásainak vizsgálatára is. Továbbá lehetőségünk volt a szimulációs erőgörbék alapján a szakítóerők meghatározására, valamint az AFM kísérletekkel történő közvetlen összehasonlításra is.

Az NBD1 *S6- α -S8 core* régiója (4.5. ábra, a) esetén meghatároztuk a letekeredési útvonalakat. Emellett a letekeredési lépések részletesebb vizsgálatához meghatároztuk az egyes másodlagos szerkezeti elemek esetén a feltekeredett fehérjerésről történő leválási időpontban mérhető erőt, a szakítóerőt is (4.5. ábra, b) mind a vad típus (WT), mind pedig a mutáns (Δ F508) peptiddel végzett szimulációinkban. A letekeredési útvonalakat az *S6- α -S8 core* régió MD szimulációk esetén szintén a natív kontaktok aránya (Q) alapján határoztuk meg. Minden egyes szimuláció esetén (n=50-50) meghatároztuk a szerkezeti egységek letekeredési sorrendjét, majd ez alapján kiszámoltuk a különböző letekeredési útvonalak gyakoriságát (4.5. ábra). Számos útvonal figyelhető meg, melyek két fázisra oszthatók. Először a β -redők, S6, S7, S8, és a H6 α -hélix válnak le, majd a második szakaszban a többi α -hélix (H5, H4, H3) tekeredik szét. A leggyakoribb, fő letekeredési útvonal esetén az S8 β -redővel kezdődött a letekeredés. Ezt követte a H6, majd az S6 és S7 együttes letekeredése. Ez utóbbi két β -redő egymással alakít ki jelentősebb kölcsönhatásokat, így együttes szétválásuk nem meglepő eredmény. Ennek az útvonalnak a gyakorisága alacsonyabb a mutáns Δ F508 *S6- α -S8 core* esetén (4.5. ábra, d; Δ F508: 54% és WT: 78%; $p < 0.05$, χ^2 test). A letekeredés második szakaszában a vad típus esetén a H5 és a H3 α -hélixek szinkron letekeredése nagyobb arányban fordult elő a mutánséhoz képest (4.5. ábra, e; WT: 20% és Δ F508: 6%; $p = 0.074$, χ^2 test).



4.5. ábra – Az S6-a-S8 core letekeredésének jellemzése a másodlagos szerkezeti elemek vizsgálatán keresztül. (a) A vad típusú S6-a-S8 core szerkezete. Az F508 aminosavat fekete pálcika reprezentáció jelöli. A színezés a másodlagos szerkezeti elemeket jelöli. (b) A letekeredési időpontokban meghatározott szakítóerő értékek másodlagos szerkezeti elemenként a vad típusú S6-a-S8 core esetén, illetve a letekeredési időpontok és szakítóerők eloszlása (kernel density estimate, kde plot). (c) A letekeredési útvonalakat a másodlagos szerkezeti egységek letekeredéseinek sorrendjéből határoztuk meg. A szerkezeti egységek együttes letekeredését kötőjel jelzi. (d) Letekeredési útvonal gyakoriságok összesítése a letekeredés első fázisát tekintve. (e) Letekeredési útvonal gyakoriságok összesítése a letekeredés második fázisát tekintve. Az „egyéb” kategóriába kerültek azok az útvonalak, melyek esetén több szerkezeti elem letekeredése sem volt egyértelműen elkülöníthető. Ezek mindegyike önálló útvonalat képezne, így összevonásra kerültek. Ezeknél az útvonalaknál a H6 az S6-S7 után vált le minden esetben.

A vad típus és a mutáns közti legnagyobb különbség a H6 letekeredési sorrendben betöltött pozíciójában figyelhető meg. A mutánsra jellemzőbb volt egy olyan letekeredési útvonal, ahol a H6 csak az S6-S7 β -redők után vált le (4.5. ábra, d; $\Delta F508$: 40%, WT: 22%; $p=0.0517$, χ^2 test). Ez két okból lehetséges. Vagy gyengébben kötődik az S6, vagy erősebben a H6 a még feltekeredett szerkezethez a $\Delta F508$ mutáns esetében. Azért, hogy választ találjunk erre a kérdésre, elemeztük az egyes szerkezeti elemek letekeredéséhez köthető időpontokat és erőértékeket. Első lépésben összehasonlítottuk a mutáns és a vad típusú *S6- α -S8 core* szerkezeti elemei esetén kapott letekeredési időket (1. függelék ábra, 3. függelék táblázat). Az összehasonlítás azt mutatta, hogy az S6, H4 és H5 másodlagos szerkezeti elemek nagyobb arányban tekeredtek le korábbi időpontokban a mutáns S6- α -S8 esetén. A H6 letekeredési idők eltérésében nem figyeltünk meg jelentős különbséget. Második lépésként összehasonlítottuk a vad típus és mutáns fehérje esetén a letekeredési eseményekhez köthető erőket, a szakítóerőket (2. függelék ábra, 4. függelék táblázat). Ez az összehasonlítás azt mutatta, hogy az S6 a letekeredések egy része során kisebb erő hatására levált a mutáns esetén. Ezzel szemben a H6 letekeredési erőiben nem figyeltünk meg különbséget (4.6. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a $\Delta F508$ mutáció meggyengíti az S6 kötődését.

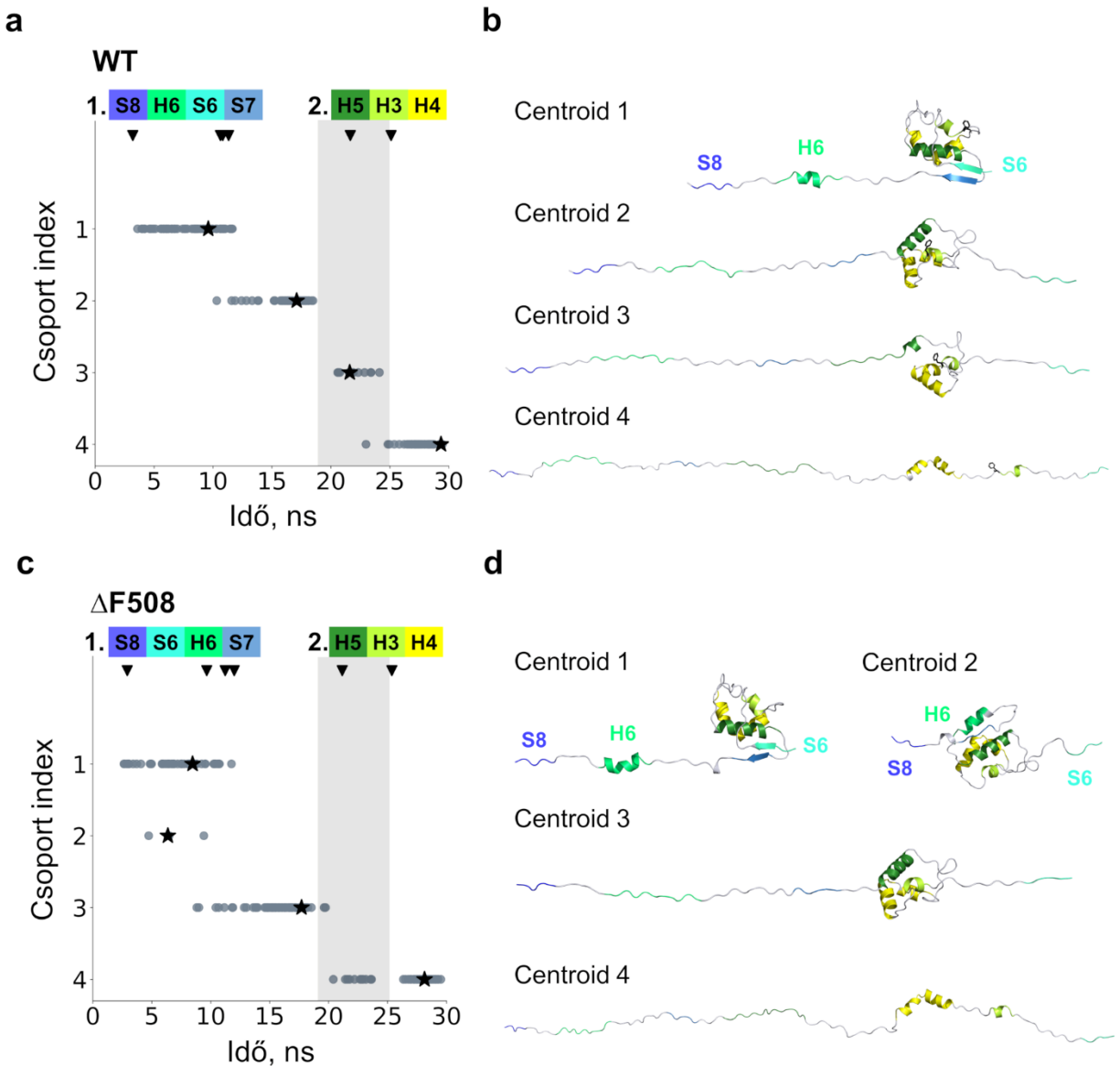


4.6. ábra – A $\Delta F508$ mutáns esetén az S6 β -redő kisebb erő hatására levált a letekeredések egy része során, míg a H6 α -hélix szakítóerők eloszlása nem különbözött. A vad típus (WT) és a mutáns ($\Delta F508$) S6- α -S8 core régióval végzett AA-MD szimulációkból számolt szakítóerők eloszlása az S6 β -redő és a H6 α -hélix másodlagos szerkezeti elemek esetén. (a) A WT (sötétkék) és $\Delta F508$ (magenta) esetén számolt S6 és H6 szakítóerők eloszlása azonos grafikonon ábrázolva. (b) A WT és a $\Delta F508$ esetén számolt S6 (világoskék) és H6 (zöld) szakítóerők eloszlása külön-külön grafikonon ábrázolva.

4.3.3. A letekeredés utolsó szakaszán kialakuló intermedier szerkezetekre emelkedett számú nem-natív kölcsönhatás jellemző a vad típus esetén

A letekeredési útvonalak mellett szeretnénk volna megvizsgálni a letekeredést jellemző intermedier szerkezeti állapotokat. Ezért egy kölcsönhatás alapú RMSD értéket használva csoportosítottuk a szimulációk során kapott szerkezeteket és kiválasztottuk az egyes csoportokat jellemző központi szerkezeteket. Ezek a szerkezetek jellemzik az *S6- α -S8 core* letekeredésének egyes lépéseit, a letekeredés intermedier szerkezeteit.

A szerkezetek csoportosításával a vad típus és a Δ F508 mutáns *S6- α -S8 core* esetén is négy köztes szerkezeti állapotot kaptunk, melyek azonban különböztek egymástól (4.7. ábra). A mutáns esetén a letekeredés elején két szerkezeti csoportot kaptunk. Az egyik esetén (4.7. ábra, Δ F508 centroid 1), mely a vad típusra is jellemző, az S8 és H6 letekeredett állapotban van jelen. A másik (4.7. ábra, Δ F508 centroid 2), csak a mutánsra jellemző szerkezeti csoportban, az S8 és S6 szerkezeti elemek tekeredtek le. Ez összhangban áll az útvonalak és erők elemzésénél tapasztaltakkal, miszerint a mutánsra jellemzőbb az S6 gyengébb kötődése és a H6 előtti letekeredése. További különbség a vad típus esetén egy intermedier szerkezet kialakulása a letekeredés második szakaszában (18-25 ns), ami egy extra letekeredési lépést eredményez. Ez azt jelenti, hogy míg a mutáns esetén H5, H4 és H3 α -hélixek széttekeredése feltehetőleg egyenletesen, jól meghatározható köztes állapot nélkül történik meg, addig a vad típus esetén egy köztes szerkezeti csoportot figyeltünk meg. A különbség oka lehet, hogy ezt az állapotot olyan kölcsönhatások stabilizálják, amik a mutáns fehérjében nem tudnak megfelelően kialakulni vagy érvényesülni.

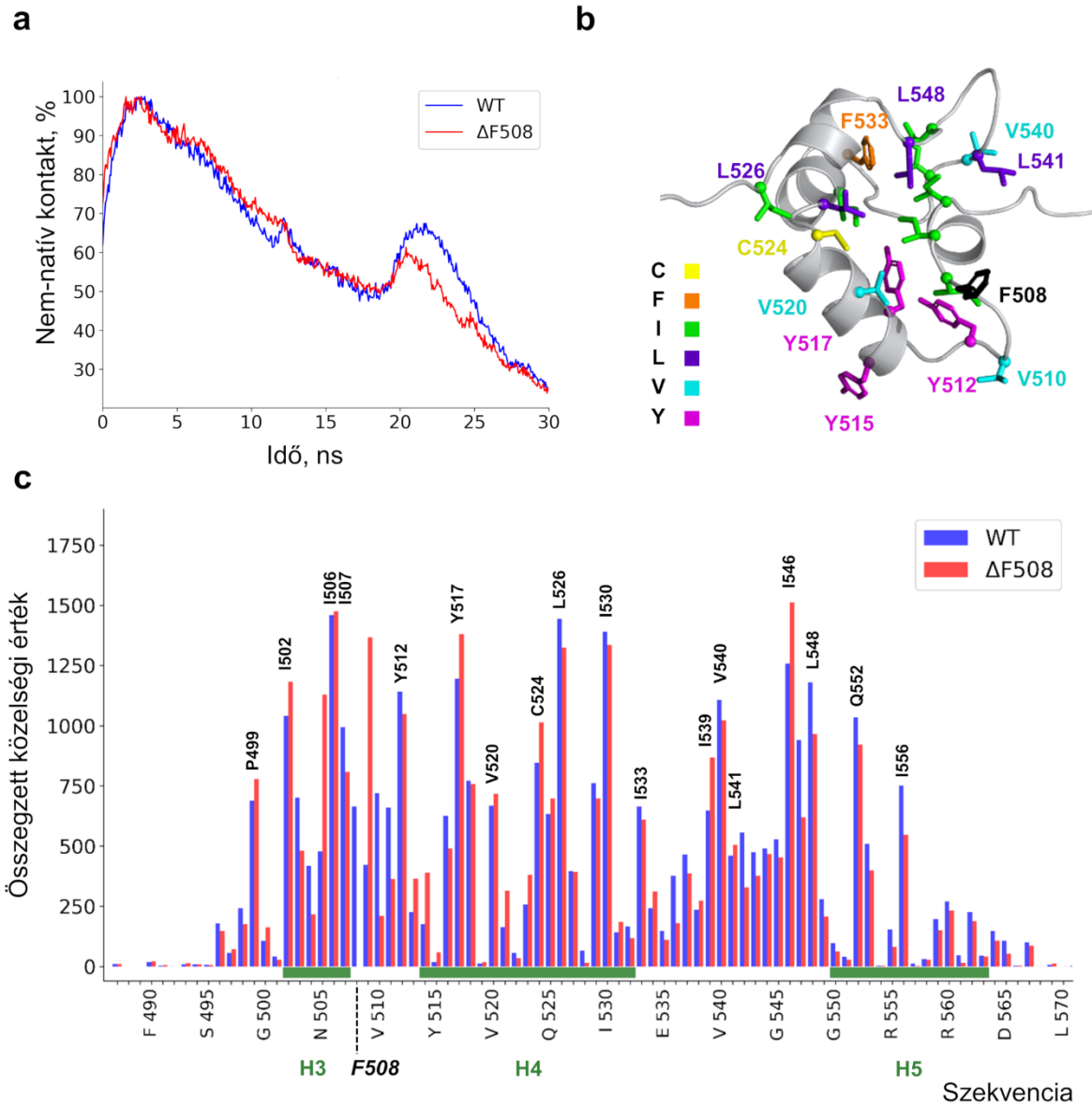


4.7. ábra – Különböző szerkezeti csoportok jellemzők a vad típus és a $\Delta F508$ mutáns S6- α -S8 core régió letekeredésére. A (a) vad típus (WT) és a (c) $\Delta F508$ mutáns szimulációkból származó köztes szerkezeteket a kontakt RMSD mint páros távolsági metrika segítségével klasztereztük. Az eredményül kapott csoportok centroid elemeit csillagok jelölik, az ezeknek megfelelő szerkezetek pedig a jobb oldali paneleken (b, d) láthatók. A szürke terület kiemeli a vad típusú S6- α -S8 core régióban jelen lévő, viszont mutánsból hiányzó szerkezeti csoportot. Nyílhegyek jelölik az egyes másodlagos szerkezeti elemek natív kontaktusok arányán alapján számított átlagos letekeredési időpontjait.

Azért, hogy megállapítsuk, mely intramolekuláris kölcsönhatások vesznek részt ennek a köztes szerkezetnek a stabilizálásában, megvizsgáltuk a natív és nem-natív kontaktokat a szimuláció során. A natív kölcsönhatások száma a vártnak megfelelően a kiindulási szerkezethez képest folyamatosan csökkent a letekeredése során mindkét peptid esetén (5. függelék ábra). A nem-natív kontaktok számában azonban növekedést figyeltünk meg a letekeredés második felénél, a trajektória azon szakaszán (18-25 ns) ahol a vad típus esetén a mutánsal ellentétben az extra szerkezeti csoport található (4.8. ábra, a). A nem-natív kölcsönhatásokban mért növekedés mértéke a vad típus esetén jelentősebb volt, mint a $\Delta F508$ mutánsnál.

A következő lépésben meghatároztuk, mely aminosavak vesznek részt a nem-natív kölcsönhatásokban a szimulációk 18-25 ns tartományában (4.8. ábra, b-c). Ezért kiszámoltuk az aminosavak páronkénti közelségi (*proximity*) értékeit ebben az időintervallumban az összes szimulációban és ezeket a vad típus és a $\Delta F508$ szimulációk esetén külön-külön ($n=50-50$) összegeztük egy összegzett közelségi mátrixot kapva (4. függelék ábra). Ez alapján határoztuk meg, hogy az egyes aminosavak milyen mértékben vettek részt nem-natív kölcsönhatások kialakításában az utolsó letekeredési intermedier szerkezet esetén. Ehhez aminosavanként összegeztük a páronkénti közelségértékeket (4.8. ábra, c, és 5. függelék táblázat). Számos aminosav alakít ki nem-natív kölcsönhatást a letekeredési szimulációk során. A H3 α -hélix, valamint a H3-H4 és a H4-H5 közötti hurkok aminosavai jelentősen hozzájárulnak a nem-natív kölcsönhatások kialakításához. Emellett a H4 α -hélix bizonyos aminosavai is részt vesznek nem-natív kontakt létrehozásában. A vad típus és a $\Delta F508$ mutáns között jelentős különbségeket mutató aminosavak (5. függelék táblázat) a H3-H4 hurokban, az F508 aminosav környezetében, illetve a H4-H5 hurokban helyezkedtek el. Az eredmények azt mutatják, hogy a vad típus esetén az F508 aminosav is részt vesz nem-natív kölcsönhatások kialakításában. Továbbá megfigyelhető, hogy az F508 aminosav környezetének aminosavai (H3-H4 hurok) megváltozott mértékben vesznek részt nem-natív kölcsönhatás kialakításában a mutánséhoz képest (4.8. ábra, c).

A különböző régiókban a kiemelkedő aminosavaknak a többsége hidrofób és ezek a szerkezet tekintetében a H3, H4 és H5 α -hélixek között helyezkednek el egy hidrofób magot kialakítva (4.8. ábra, b). Mivel ez a nem-natív intermedier szerkezet volt az utolsó még valamilyen mértékben globulárisnak tekinthető szerkezet a letekeredés során, ezért elképzelhető, hogy a fordított, feltekeredési folyamat első intermedier állapotaként egy hasonló szerkezet alakul ki. Ez azt jelentené, hogy a vad típusban megfigyelt nem-natív kölcsönhatások, melyek egy részében az F508 aminosav vesz részt, szerepet játszhatnak az NBD1 feltekeredésének (*folding*) folyamatában a korai feltekeredési lépések során. Ezért, ezt a feltevésünket *folding* szimulációk segítségével vizsgáltuk meg.



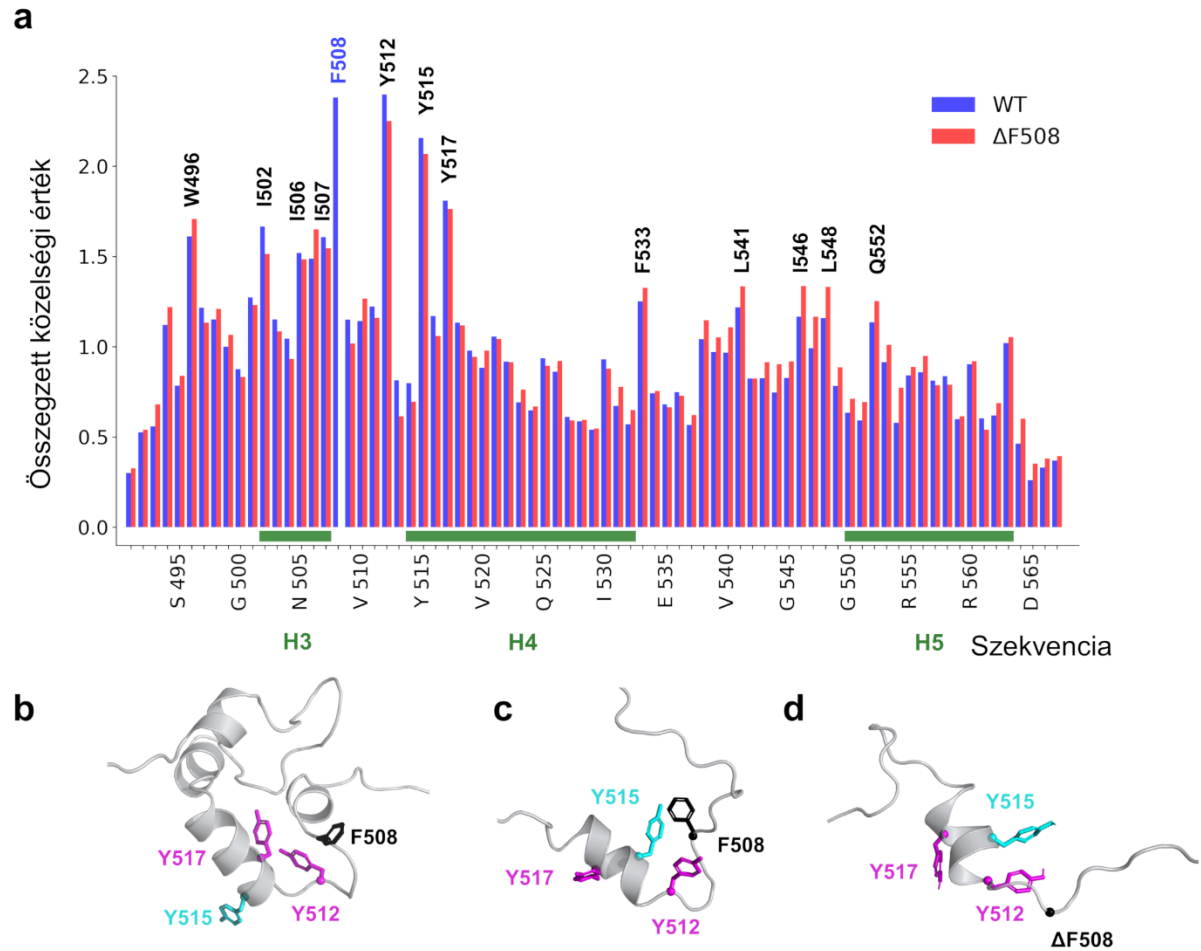
4.8. ábra – Megnövekedett számú nem-natív kölcsönhatás jellemző a vad típus S6- α -S8 core letekeredésére. A szimulációk során kapott (a) nem-natív kontaktok aránya a vad típus (WT) és a $\Delta F508$ mutáns esetén ($n=50-50$). A nem-natív kontaktok aránya a 18-25 ns időszámban mindkét peptid esetén megemelkedett, azonban ez a WT esetén jelentősebb. (b) Pálcika reprezentáció jelöli a letekeredés utolsó lépése előtti WT esetén megfigyelt szerkezeti csoportban, a hidrofób magot kialakító aminosavakat. (c) Az aminosavanként összegzett közelségi értékek. Ez alapján határoztuk meg, hogy az egyes aminosavak milyen mértékben vettek részt nem-natív kölcsönhatások kialakításában az utolsó letekeredési intermedier szerkezet esetén.

4.3.4. Az F508 aminosav és környezetének nem-natív kölcsönhatásai fontos szerepet tölthetnek be az NBD1 feltekeredése során

A vad típusú *S6- α -S8 core* letekeredése során az utolsó lépésben megfigyelt intermedier szerkezetben nem-natív kölcsönhatásokat figyeltünk meg. Ezt a szerkezetet az NBD1 α -alegysége, a H3, H4 és H5 α -hélixek alkotják, itt helyezkedik el az F508 aminosav is. Úgy gondoltuk, hogy ezek a nem-natív kölcsönhatások szerepet játszhatnak e régió (NBD1 α -aldomén) feltekeredésének korai fázisában. Azért, hogy a feltevésünket teszteljük, valamint megvizsgáljuk az F508 aminosav kölcsönhatásait, replikacsere diszkrét molekula dinamikai (REX-DMD) *fold*ing szimulációkat végeztünk a nem-natív kölcsönhatások kialakításában részt vevő fehérje szakasszal.

A szimulációk során az F508 aminosav közvetlen szomszédsága volt az a régió, ahol a legtöbb kölcsönhatást figyeltük meg (4.9. ábra, a), ahol négy aminosav mutatott kifejezetten magas kontaktszámot (F508, Y512, Y515, Y517). Ezek közül három (F508, Y512, Y517) vett részt nem-natív kölcsönhatás kialakításában a letekeredési szimulációk során. Ezek mellett számos letekeredési nem-natív kontaktot figyeltünk meg a *fold*ing szimulációkban, mint jelentős kölcsönhatási hely. A Δ F508 mutáns esetén a kölcsönhatási gyakoriságok kissé megnövekedtek az 540-550 aminosavak körül, amely a H4b és H5 α -hélixek közötti hurkot (S6c, L2) alkotja a natív szerkezetben.

A négy fő kölcsönható aminosav közelében a peptidlánc elhajlása és a H4 α -hélixnek megfelelő α -hélix szerkezet kialakulása látszódik (4.9. ábra, b-d). Ez a régió szerkezetileg hasonló volt a letekeredési szimulációkban megfigyelt, utolsóként szétnyíló köztes állapothoz. Egy lényeges különbséget figyeltünk meg, ami az Y515 oldallánc orientációja volt. A *fold*ing szimulációban a leggyakoribb kölcsönhatás az Y515-Y512 volt. Emellett az F508-Y512 és a F508-Y515 kölcsönhatás is gyakori volt. Azonban míg az Y515 aminosav kölcsönhatásokat alakított ki a *fold*ing szimulációk során, addig nem vett részt a nem-natív kölcsönhatások kialakításában a letekeredési szimulációkban. Ez azt sugallja, hogy az F508 aminosav hiánya egy, az NBD1 feltekeredésének szempontjából kedvezőtlen nem-natív kölcsönhatás, az Y515-Y512 kialakulásához vezet, ellenben az F508-Y512 kölcsönhatás fontos lehet a megfelelő hélixorientáció kialakulásához.



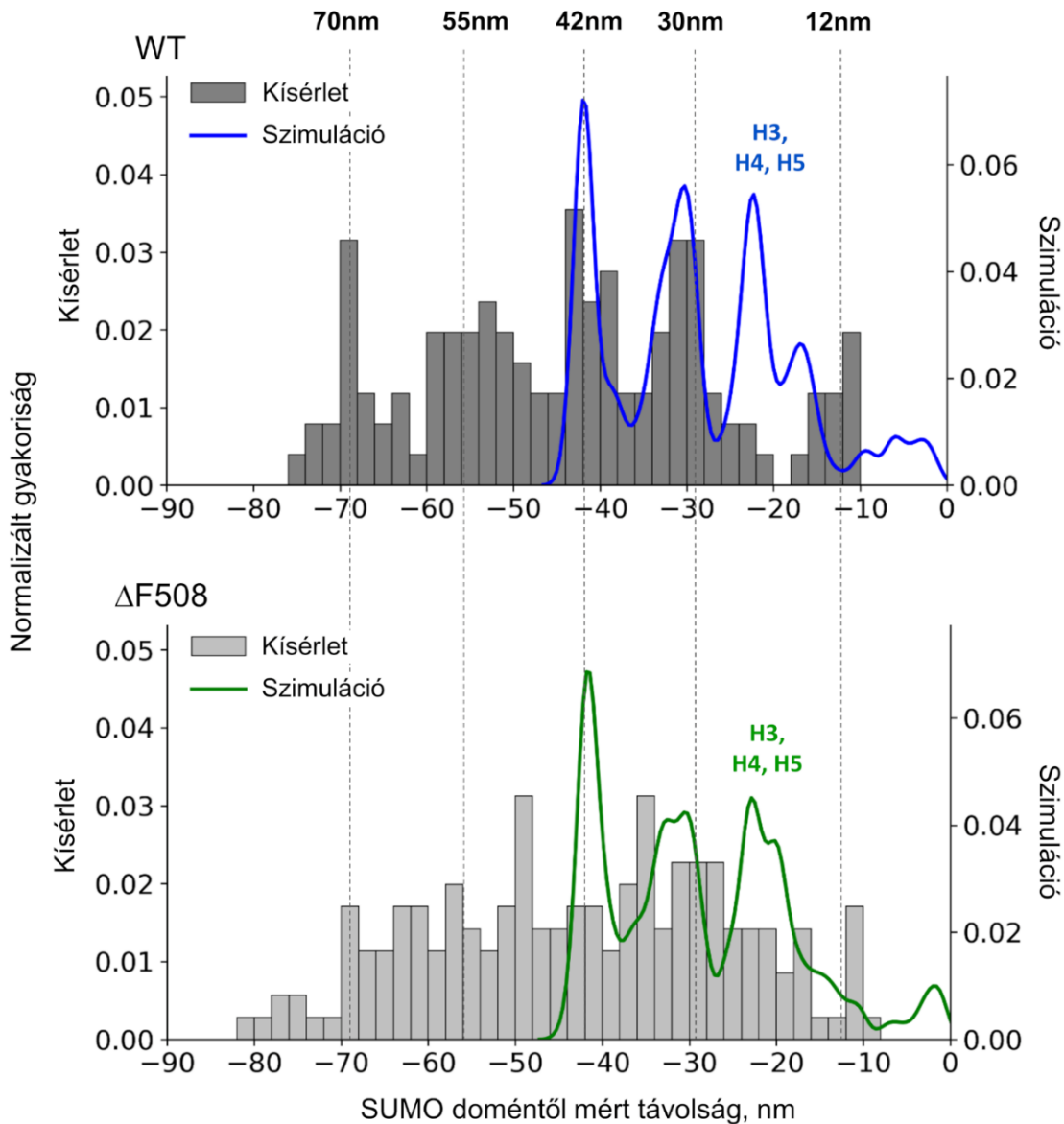
4.9. ábra – Az F508 és környezete lokális kölcsönhatásokat alakít ki a REX-DMD folding szimulációk során. (a) A REX-DMD folding szimulációkban a legmagasabb hőmérsékleten előforduló konformációkban megfigyelt páronkénti aminosav kontakt-gyakoriságot kiszámítottuk, és az egyes aminosavak összesített kontaktértékeit ábrázoltuk. (b) A hidrofób aminosavak konformációja a natívan feltekeredett NBD1-ben. (c) Az F508-Y512 és az F508-Y515 gyakori nem-natív kölcsönhatások a folding szimulációkban. (d) Az F508 aminosav hiánya az 508-512-es régió hurokképződésének kisebb valószínűségét eredményezheti, ami kedvezőtlenül befolyásolhatja az NBD1 feltekeredését.

4.3.5. A $\Delta F508$ mutáció elsősorban megakadályozza a fehérje helyes feltekeredését

A WT-NBD1 és $\Delta F508$ -NBD1 (SUMO-fúziós) fehérje konstrukciók kvantitatív összehasonlítása érdekében az erőspektroszkópiai (AFM) mérések során kapott erőgörbékből meghatározott, a referenciaponttól számolt (SUMO fehérje letekeredésétől mért) kontúrhossz-növekedéseket (Δk) hisztogramon ábrázoltuk (4.10. ábra, szürke oszlopok). Ezek adnak információt az NBD1 referenciaponthoz igazított letekeredési eseményeinek leoszlásáról.

A kísérleti adatokat tekintve a WT-NBD1 Δk hisztogramja esetén öt adatcsúcs látható (4.10. ábra, felső hisztogram). Azért, hogy ezeket a csúcsokat megfeleltethessük a molekuláris eseményeknek, a G α szimulációkkal kapott NBD1 letekeredési útvonalakat (4.4. ábra) és az NBD1 szerkezetére, topológiájára vonatkozó információkat használtuk fel (4.1. ábra). A G α szimulációkban utolsó letekeredési eseményként az *S6- α -S8 core* felbomlása történt meg (4.4. ábra). Ez a szerkezeti egység két másodlagos szerkezeti elem csoportból¹, a gS8-ból és a gS6-ból áll. Mivel a gS8 és gS6 csoportok 32, illetve 83 aminosav hosszúságú régiók, letekeredésük ~ 12 nm ($32 \times 0,35$ nm) és ~ 30 nm ($83 \times 0,35$ nm) kontúrhossz-növekedést (ΔL) eredményez. Attól függően, hogy egy adott NBD1 gS8 és gS6 régiói milyen sorrendben, illetve külön-külön vagy együtt tekeredtek le, 12, 30 és 42 (12+30) nm-es kontúrhossz-növekedést (ΔL) eredményeztek egy-egy letekeredés során (4.11. ábra). Ezek az adatok megfeleltek a kísérleti erőgörbék utolsó szakaszát jellemző jól definiált letekeredési eseményeknek (erőcsúcsok). Ez a WT-NBD1 hisztogramon a 12 nm, 30 nm és 42 nm Δk értékeknél kirajzolódó letekeredési mintázatként (adatcsúcsok) látható (4.10. ábra, felső hisztogram). Például, a letekeredés utolsó szakaszán kapott $\Delta L=12$ nm, majd $\Delta L=30$ nm hosszú szakaszok egymást követő letekeredése (12 nm \rightarrow 30 nm) egy $\Delta k=30$ nm, illetve $\Delta k=42$ nm (30+12) távolságra következtek be a referenciaponttól (SUMO letekeredése) mérve. Ezen szakaszok fordított sorrendű letekeredése (30 nm \rightarrow 12 nm) egy $\Delta k=12$ nm, illetve egy $\Delta k=42$ nm (12+30) adatcsúcsként jelenik meg a hisztogramokon.

¹ A letekeredési eseményekhez több szerkezeti elem letekeredése is köthető, amelyek „letekeredési csoportokat” alkotnak. Például az S8 β -redő és a H6 α -hélix együtt alkotják a gS8 csoportot. A letekeredési csoportokat a 4.1. táblázat foglalja össze.



4.10. ábra – A vad típus *S6-a-S8* core szimulációs és kísérleti adat-erőgörbékből meghatározott kontúrhossz-növekedés eloszlások (Δk) között nagymértékű a hasonlóság. A hisztogramok a referenciaponttól számolt (SUMO domén kezdeti letékeredésétől mért) kísérleti kontúrhossz-növekedéseket (Δk) mutatják (WT, $n = 126$; $\Delta F508$, $n = 178$). A szerkezet és a szimulációk alapján várt hossznövekedéseknek megfelelő Δk értékeket szaggatott vonalakkal jelöltük. A szimulációs erőgörbékből számolt Δk értékek eloszlását (kernel density estimate, kde) a színes vonalak mutatják (kék - WT, zöld - $\Delta F508$).

A gS3 csoport letekeredése egy ~ 13 nm (36 aminosav) hosszúságú szegmens letekeredését eredményezte. Ez az utána bekövetkező gS8 és gS6 letekeredésével együtt egy 55 (42 + 13) nm kontúrhossz-növekedést mutat. Hasonlóan a gS10 és gS9 letekeredése a teljes peptid letekeredésének kezdetén 74, illetve 72 nm-es csúcsot eredményezett. A WT-NBD1 Δk hisztogramon megfigyelhető első két csúcs 55 és 70 nm körül volt (4.10. ábra, felső hisztogram). Annak ellenére, hogy ezek a kísérleti adatok zajosak voltak, mivel a csillámfelülethez közeli, kedvezőtlen elektrosztatikus kölcsönhatásokkal járó kontúrhossz-növekedés értékeket is tartalmaztak, a kapott adatok elég jól megfeleltek a WT-NBD1 fentebb részletezett specifikus letekeredési eseményeinek.

Kísérleteink esetén a WT-NBD1 és $\Delta F508$ -NBD1 Δk eloszlás értékek között jelentős különbség látható. A vad típussal ellentétben a $\Delta F508$ -NBD1 Δk hisztogramon nem figyelhető meg ezek a csúcsok, hanem egy egyenletesebb, homogén eloszlás jelenik meg (4.10. ábra, alsó hisztogram). Emellett a $\Delta F508$ mutánsal végzett kísérletek nagy részében a vad típushoz képest váratlan kontúrhossz-növekedések jelentkeztek a ~ 20 és 35 nm-es értékek környékén. Ez utalhat arra, hogy a $\Delta F508$ -NBD1 eltérő mechanikai ellenállással jellemezhető, vagy a fehérje előállítási folyamatok során a $\Delta F508$ mutáns jelentős mértékben helytelenül tekeredett fel és így a termelt heterogén fehérjepopuláció többféle letekeredési kontúrhossz-növekedést eredményezett.

E két mechanizmus feloldása érdekében az *S6- α -S8 core* szerkezetével végzett szolvált nehéz-atom molekula dinamikai (HA-MD) szimulációink erőgörbéit a kísérletekhez hasonlóan szintén elemeztük. A szimulációs görbékre szintén a polimerek entrópikus rugalmasságát jellemző WLC modellt illesztettünk, ami alapján a szimulációs erőgörbékből is meg tudtuk határozni a letekeredett szakaszokat jellemző kontúrhossz-növekedés (ΔL) értékeket, illetve ezek referenciaponttól (teljes *S6- α -S8 core* letekeredése) számolt változatait (Δk). A szimulációs Δk értékek eloszlását (4.10. ábra, zöld és kék görbék) a kísérleti adat hisztogramokra (szürke oszlopok) vetítve ábráztuk a két módszerből kapott eredmények közvetlen összehasonlításához.

Azt találtuk, hogy a vad típus szimulációkból származó 42 nm-es és 30 nm-es Δk adatcsúcsok megegyeznek a WT-NBD1 kísérleti adatok során kapott Δk adatcsúcsokkal. Ez arra utal, hogy az AFM kísérletekkel képesek voltunk detektálni a gS8 és a gS6 csoportok letekeredését. Mivel a szimulációk során egy natív *S6- α -S8 core* szerkezetet használtunk, a Δk *in silico* és *in vitro* adatcsúcsok hasonlósága megerősítette, hogy ez a letekeredési mintázat a helyesen feltekeredett szerkezet mechanikai ellenállását jellemzi, vagyis ezek a kontúrhossz-növekedések a natív térszerkezetű fehérje letekeredéséből származnak.

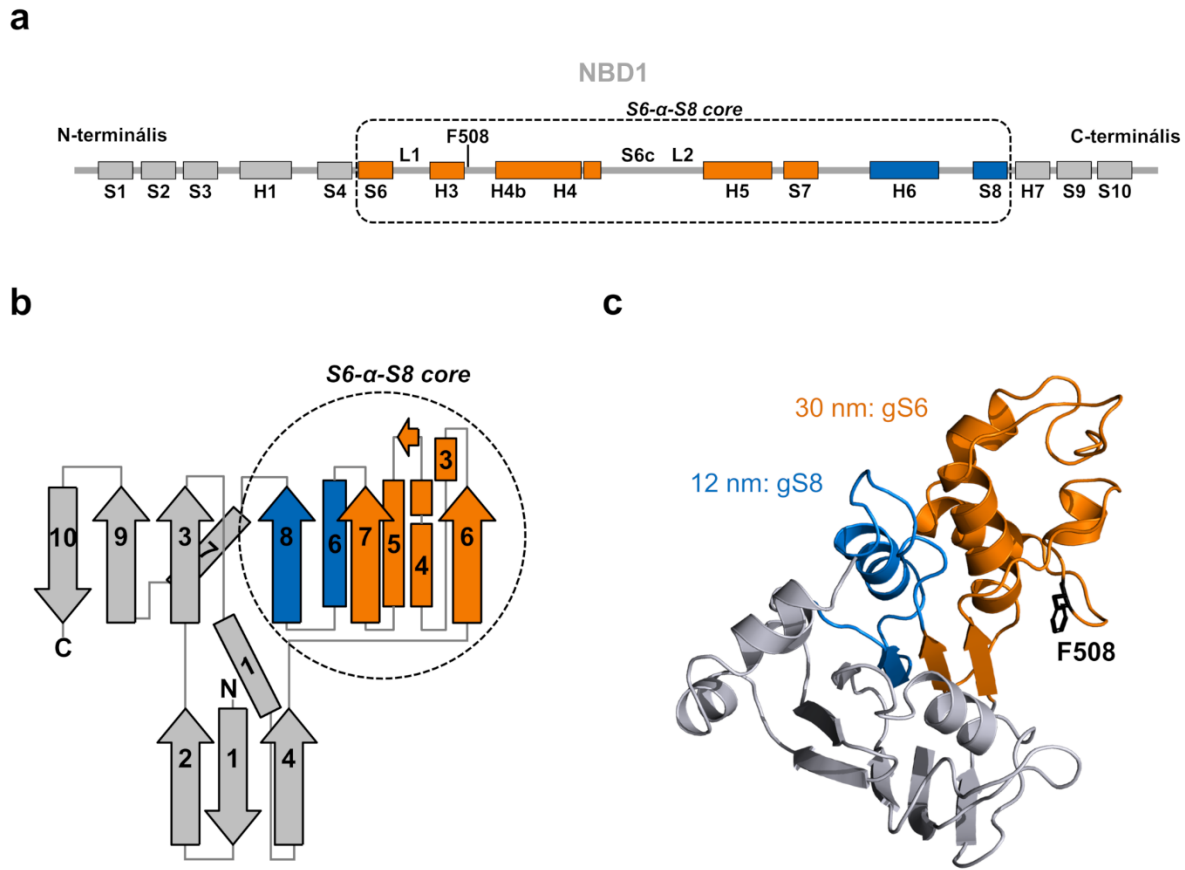
A szimulációkból kapott eredmények azt mutatják, hogy a H3, H4 és H5 α -hélixek letekeredése egy 22 nm hossz körüli Δk adatcsúcsot hoz létre a hisztogramon. Ez az adatcsúcs azonban nem figyelhető meg a kísérleteinkben. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a fehérje mechanikai erővel szembeni ellenállása

elsősorban a másodlagos szerkezeti elemeket összekötő hidrogénkötésekhez kapcsolódik. A markáns erögörbe csúcsok a β -redők közti hidrogénkötések felbomlása következtében jelennek meg [140], [141], az α -hélixek letekeredése pedig a β -redőkhöz képest 5-10-szer alacsonyabb erőhatás mellett következik be [142]. Takahashi és munkatársai emellett megmutatták, hogy az α -helikális szerkezeti elemek letekeredése egy komplex folyamat. Az α -hélixek mechanikai stressz hatására pufferként viselkedhetnek kiegyenlítve a polimer mentén terjedő erő hatását, így ezek mechanikai ellenállása kisebb húzási sebességnél elhanyagolható [143]. Feltételezzük, hogy a kísérletek során alkalmazott alacsony húzási sebesség mellett a helikális szerkezeti elemek mechanikai ellenállása elhanyagolható volt és ezért letekeredésük nem eredményezett markáns erőcsúcsokat az erögörbén a nagyobb húzási sebességű szimulációs adatokkal összehasonlítva. A megfelelő helyen kisebb emelkedéseket ugyan megfigyeltünk a kísérletek során, ezek azonban nem voltak alkalmasak WLC illesztésre és így kontúr hossz-növekedés értékek meghatározására. Ez magyarázhatja a hiányzó adatcsúcsot a kísérleti hisztogramon.

A 12 nm körüli Δk adatcsúcs a kísérletekre jellemző, ami a gS8 (S8 és H6) régió utoljára történő letekeredésének felel meg. Azonban, ezt az útvonalat nem figyeltünk meg a szimulációk során. Minden esetben a H3, H4 és H5 α -hélixek tekeredtek szét utoljára. Ezt a különbséget a két módszer esetén alkalmazott eltérő húzási sebesség okozhatta. A szimulációk során az egyes szerkezeti elemek mindig vagy a C-terminális (S8), vagy pedig az N-terminál (S6) vég felől kezdtek el letekeredni. Az utoljára letekeredő régió a H3, H4 és H5 α -hélixek (4.11. ábra, narancssárga jelölésű szakasz hélixei). Ez a régió a β -redők (S6, S8) által védve helyezkedik el. A gyorsabb húzási sebesség által eredményezett nagyobb szakítóerők eredményezhették azt, hogy a szimulációk során ezeknek a β -redőknek a „leszakítása” történt meg először.

A $\Delta F508$ szimulációkból meghatározott Δk értékek eloszlása nagymértékben hasonlított a vad típus szimulációkból számolt értékekhez. Ez nem meglepő, mivel a szimulációkban a jól feltekeredett, natív NBD1 szerkezetet használtuk. A $\Delta F508$ esetén is megfigyelhetők voltak a vad típushoz hasonló adatcsúcsok, ami azt mutatja, hogy egy helyesen feltekeredett mutáns fehérje letekeredésének lépései hasonlóak. Ebből arra következtettünk, hogy a vad típus és a $\Delta F508$ kísérleti erögörbéi közötti különbséget elsősorban nem a mutáns megváltozott mechanikai ellenállása, hanem a helyesen feltekeredett fehérjék csökkent aránya okozza.

A kísérleti és szimulációs adatok elemzése alapján a natív *S6- α -S8 core* letekeredésének tekintjük azokat a letekeredési útvonalakat, melyek a 12 nm-es, illetve a 30 nm-es ΔL értékeket eredményező letekeredett fehérje régiók (csoportok) bármely kombinációja. A 12 nm ΔL a gS8 (S8, H6), a 30 nm ΔL pedig a gS6 (S6, S6c, S7, H3, H4, H4b, H5) régióknak feleltethető meg (4.11. ábra). A natív *S6- α -S8 core* letekeredésének megfelelő AFM letekeredési események számának összegzése azt mutatta, hogy az *S6- α -S8 core* letekeredése csak a $\Delta F508$ kísérleti görbék 28%-ában volt natív jellegű, ami pontosan kétszeres csökkenést jelent a vad típus natív jellegű görbék 56%-ához képest (4.2. táblázat).



4.11. ábra – Az erőspektroszkópiai (AFM) kísérletek során azonosított letekeredési egységek ábrázolása. Az NBD1 (a) domének szekvenciális elrendeződése, (b) topológiája és (c) egy 3D röntgenszerkezeten (PDB ID: 2bbo) alapuló, a regulátor inszerciót nem tartalmazó (Δ RI) szerkezete. A másodlagos szerkezeti elemeket színes téglalapok jelölik (S: β -redő, H: α -hélix). Az S6- α -S8 core (aminosav pozíció: 487-604, fekete szaggatott keretezés), mely három β -redőből (S8, S7, S6) és öt α -hélixből (H3, H4, H4b, H5, H6) áll. Az F508 aminosavat fekete pálcika jelöli. A színek az egyszerre letekeredő másodlagos szerkezeti elemeket jelölik ki (kék, narancs). Az S6, S7 és S8 β -redők alakítják ki az α -alegység és a β -alegység közti kapcsolatot. A H3, H4 és H5, három α -hélix (narancssárga jelölésű régió hélicei) az S6 és S8 β -redők által védve helyezkedik el.

Letekeredési útvonal	WT	Δ F508
12 nm \rightarrow 30 nm	31.3%	14.7%
30 nm \rightarrow 12 nm	16.7%	8.8%
42 nm	8.3%	4.4%
	56.3%	27.9%

4.2. táblázat – A kísérleti eredmények arra utalnak, hogy az S6- α -S8 core a vad típusú NBD1 populáció jelentős részében hibásan tekeredik fel, és ezt az F508 aminosav deléciója jelentősen fokozza. A táblázat mutatja az S6- α -S8 core régió letekeredési útvonalakat, melyeket csoportunk az AFM kísérleti kontúrhossz-növekedés értékek (ΔL) alapján határozott meg.

4.4. Diskusszió

Korábbi tanulmányok vizsgálták már az NBD1 feltekeredését (*fold*ing), azonban ezek a kísérleti módszerek alacsony felbontásúak voltak [58]–[60], [115]. Az izolált vad típusú és Δ F508 mutáns NBD1 részletes vizsgálatai a mutáns domén jelentősen csökkent mértékű olvadási hőmérsékletét mutatták ki [49], [50]. Az F508 aminosav deléciója okozhat különbséget az NBD1 stabilitásában a vad típushoz képest, ami a fehérje megváltozott mechanikai ellenállásában nyilvánulhat meg. Ezért, egyik célunk volt nagyobb felbontásban vizsgálni az NBD1 mechanikai letekeredéssel szembeni ellenállását a vad típusú és a Δ F508 mutáns NBD1 esetén. Ehhez erőspektroszkópiai kísérletek és molekula dinamikai szimulációk segítségével vizsgáltuk a CFTR NBD1 domén mechanikai letekeredését. A két módszerrel kapott eredmények azt mutatják, hogy az F508 aminosav deléciója jelentős hatással van az NBD1 letekeredésére. Feltételezzük, hogy ezek a hatások úgy érvényesülnek, hogy a letekeredés késői szakaszában, feltehetőleg a feltekeredés korai szakaszában, fontos nem-natív köztes szerkezeti állapotok kialakulását akadályozza meg ez a mutáció.

Mivel sikeresen alkalmaztak egyszerűsített modelleket fehérjék letekeredésének vizsgálatára [123], [126] először egy natív szerkezeten alapuló G ϕ modellel végeztünk letekeredési szimulációkat. Ez az egyszerűsített modell lehetővé teszi az NBD1 méretű fehérjékkel végzett szimulációk során a letekeredés kivitelezéséhez szükséges számítási korlátok leküzdését. Ezek a szimulációs eredmények elengedhetetlenek voltak az AFM kísérleteink elemzéséhez. Az atomi felbontású szimulációk nélkül ugyanis nagy kihívást jelent az erőgörbe-csúcsok molekuláris eseményeknek történő megfeleltetése, és a fehérjeszakaszok letekeredési sorrendjének meghatározása. A szimulációinkban megfigyelt letekeredési mintázatok és az AFM kísérletekből nyert kísérleti adatok összehasonlításával azonosítani tudtuk a szerkezeti elemek letekeredési útvonalaikat, illetve az útvonalak megoszlását.

Az NBD1 feltekeredésének vizsgálatát leíró, spektroszkópiai módszereket alkalmazó kísérleti tanulmányban megállapították, hogy a feltekeredés során az F508 aminosav fontos kölcsönhatásokat hozhat létre, amelyeknek szerepe lehet az NBD1-feltekeredés helyes irányba történő terelésében [54]. Azt is kimutatták, hogy a Δ F508 mutáció hatással van a feltekeredés sebességére, ami a különböző régiók rosszul időzített feltekeredését okozhatja, végső soron ezen régiók doménen belüli helytelen illeszkedéséhez vezetve [56]–[60]. Ezek a kritikus szerkezeti elemek az S8 és S7 β -redők. Az S8, S7 és S6 β -redők, valamint az α -alegység és a H6 α -hélix a szerkezetben egy önálló egységet alkot és szekvenciálisan is folytonos (S6- α -S8 *core* régió). Ebben a régióban található az F508 aminosav is, melynek deléciója megakadályozza a CFTR helyes feltekeredését. A korábbi kutatások eredményeivel összhangban a csoportunk által végzett AFM kísérletekkel és a G ϕ szimulációkkal is sikerült kimutatni, hogy az NBD1 letekeredése során ez az S6- α -S8 *core* régió veszi el utoljára a globuláris szerkezetét, ennek felnyílásakor válik a domén egy teljesen denaturált polimerláncá.

Kiemelt fontossága révén nagyobb felbontásban terveztük megvizsgálni az *S6- α -S8 core* letekeredését, valamint az F508 aminosav környezetének kölcsönhatásait a vad típusú és a Δ F508 mutáns fehérjében. Azonban a hagyományos (minden atomra kiterjedő, explicit oldószer jelenlétében végzett) molekula dinamikai szimulációhoz képest a G \ddot{o} modellel végzett szimulációk pontosságát csökkenti az explicit vízmolekulák hiánya és a nem-natív kölcsönhatások elhanyagolása. Ezért teljesen szolvált, nehéz atomokra kiterjedő letekeredési szimulációkat végeztünk az *S6- α -S8 core* régióval. A szimulációinkban a Δ F508 mutáns *S6- α -S8 core* esetén megváltozott letekeredési útvonal-gyakoriságot és bizonyos másodlagos szerkezeti elemek gyorsabb leválását figyeltük meg. A megfigyeltek a mutáns és vad típus különbségére utalnak mind a β -redők (főleg S6 körüli), illetve a letekeredés utolsó lépése során felbomló, a H4, H5 és H3 α -hélixek által kialakított szerkezeti állapot kölcsönhatási hálózatában. A letekeredés során azt tapasztaltuk, hogy az F508 aminosav szinte a letekeredés végéig a vad típusú *S6- α -S8 core* még feltekeredett részének összetevője maradt. A vad típus a letekeredés késői szakaszában több nem-natív kölcsönhatást mutatott, mint a Δ F508. Ez arra utal, hogy a nem-natív kölcsönhatások hozzájárulnak a vad típus letekeredési intermedier szerkezetek stabilitásához. Ezek a kölcsönhatások olyan ismert cisztás fibrózist okozó mutációpozíciókat tartalmaznak (Δ I507, V520F, L558S és A559T), melyekről kimutatták, hogy befolyásolják az NBD1 α -alegységének hajtogatódását a feltekeredés kritikus intervallumában [60].

Eredményeink arra utalnak, hogy az F508 aminosav jelenléte támogatja a nem-natív kölcsönhatások kialakulását és fennmaradását, ami fontos tényező lehet az *off-pathway* intermedierek kialakulásának elkerülése szempontjából. A nem-natív kölcsönhatásokról Clementi és munkatársai leírták, hogy befolyásolják a feltekeredés folyamatát jellemző szabadenergia-felszint [144], valamint Shao és munkatársai eredményei alapján a fehérje feltekeredésének sebességkorlátozó tényezői lehetnek [145]. Ezek a nem-natív kölcsönhatások valószínűleg lassító mechanizmusként szolgálnak, hogy időt biztosítsanak az NBD1 polipeptid számára a megfelelő köztes állapot eléréséhez, mielőtt megkezdne a feltekeredés következő lépését. Ezt támasztják alá Kim és munkatársai *in vitro* translációs kísérletei is, amelyek azt mutatták, hogy a gyorsabb kodonok gátolták a megfelelő feltekeredést [59]. Továbbá Serohijos és munkatársai megfigyelték, hogy a Δ F508-NBD1 G \ddot{o} *fold*ing szimulációikban csökkent a feltekeredéshez szükséges idő arra utalva, hogy az NBD1 *self-chaperoning* aktivitása csökkent mértékű a mutánsban [1]. Azok az aminosavak, amelyek a nem-natív kölcsönhatások kialakulásában részt vettek a letekeredési szimulációink során, a *fold*ing szimulációinkban is gyakori kölcsönható partnernek bizonyultak. Ez megerősíti, hogy az F508 aminosav és környezete egy lokális feltekeredési gócpontként szolgálhat.

Bár az *S6- α -S8 core* letekeredési szimulációink és az AFM kísérleteink kvantitatív összehasonlítása a kontúrhossz-növekedések vizsgálatának tekintetében korrelációt mutatott, felhívja a figyelmet a módszerek korlátaira és különbségeire is. Míg a Δ F508 szimulációkból származó adatok a vad típushoz hasonló mintázatot mutattak, addig a kísérleti Δ F508-NBD1 eredmények nem. Ennek oka, hogy a

szimulációkat a natívan feltekeredett *S6- α -S8 core* régióval végeztük, és egy homogén populációból indultunk ki. Ezzel szemben a kísérletekben a sejtekben termelt fehérjék vegyes populációt alkotnak, helyesen feltekeredett és nem jól feltekeredett domének keverékéből állnak. Tehát, különböző populáció állt rendelkezésünkre a két módszer esetén. Ennek előnye, hogy a kísérleti adatok információt tartalmaznak az NBD1 feltekeredésének folyamatáról is. Az, hogy a vad típus esetében a kísérleti és szimulációs eredmények sokkal közelebb állnak egymáshoz, mint a mutáns esetében, azt mutatják, hogy a vad típusú fehérjék szerkezete jobban megfelel a natív szerkezetnek, mint a Δ F508, ahol kevés a helyesen feltekeredett *S6- α -S8 core* régió.

További különbség, hogy a kísérletekből hiányoznak az α -hélixek *in silico* letekeredésének megfeleltethető események. Az általunk megfigyelt különbség adódhat a szimulációk esetén használt lényegesen nagyobb húzási sebességből. Ugyanis Rief és munkatársai megfigyelték, hogy az α -hélixek letekeredése a β -redőkhöz képest 5-10-szer alacsonyabb erőhatás mellett bekövetkezhet a negyedleges szerkezetet stabilizáló hidrogénkötések hiánya miatt [142]. Takahashi és munkatársai pedig megmutatták, hogy az α -hélixek mechanikai stressz hatására pufferként viselkedhetnek kiegyenlítve a polimer mentén terjedő erő hatását, így az α -hélixek mechanikai ellenállása kisebb húzási sebességnél elhanyagolható [143]. Ennek következtében az α -hélixek letekeredése valószínűleg nem eredményez jelentős csúcsokat a kísérleti erőgörbéken.

Az AFM kísérleti eredmények arra utalnak, hogy az *S6- α -S8 core* a vad típusú NBD1 populáció egy részében helytelenül tekeredik fel, és ezt a Δ F508 mutáció nagymértékben fokozza. A kísérletek és a szimulációs eredmények összevetése alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az α -alegység a feltekeredés során nagymértékben instabil. Lehetséges, hogy az α -alegység célzott stabilizálásával fokozható lenne a teljes NBD1 stabilizálása is. Ezt a BIA kis molekula jelenlétében végzett AFM kísérleteink, valamint a BIA *in silico* dokkolásunk, illetve hidrogén-deutérium-csere tömegspektrometriai kísérleteink (HDX-MS) is megerősítették [146]. Ezek a kísérletek megmutatták, hogy a BIA az α -alegységhez kötődik. A BIA nélkül elvégzett kísérletekkel szemben a BIA-NBD1 letekeredési mintázatok esetén meg tudtuk figyelni az α -hélixek letekeredését is. Ez a jelenség azt sugallja, hogy a BIA növeli a Δ F508-NBD1 mechanikai letekeredéssel szembeni ellenállását. A HDX-MS kísérletek is arra utalnak, hogy a BIA kötődése a mutáns NBD1-hez nagymértékben stabilizálja az α -alegységet, mind a BIA nélküli vad típus, mind pedig a Δ F508-NBD1 esetén.

4.5. Összefoglalás

A munka során a CFTR kloridcsatorna első nukleotidkötő domén (NBD1) mechanikai letekeredését vizsgáltuk. Csoportunk erőspektroszkópiái (AFM) kísérleteihez hasonlóan, azonban nagyobb felbontásban, letekeredési (*pulling*) molekula dinamikai szimulációkkal jellemeztük az NBD1 mechanikai letekeredését egy szerkezet alapú G α modell alkalmazásával. A szimulációs adatokból meghatároztuk az NBD1 másodlagos szerkezeti elemeinek letekeredési sorrendjét, a letekeredési útvonalakat, melynek eredménye jelentősen hozzájárult az AFM kísérletekkel kapott letekeredési mintázatok értelmezéséhez.

Az *S6- α -S8 core* régió a szerkezetben egy önálló egységet alkotó és szekvenciálisan is folytonos szakasz, ebben a régióban található az F508 aminosav is. Azért, hogy pontosabban jellemezhesük az F508 aminosav *S6- α -S8 core* régióra kiterjedő hatását, nehéz atomokra kiterjedő, explicit oldószer jelenlétében végzett MD szimulációkkal vizsgáltuk ennek a régióknak a mechanikai letekeredését. Emellett tanulmányoztuk a letekeredés köztes szerkezeti állapotait, a letekeredés során létrejövő nem-natív kölcsönhatásokat, valamint az F508 aminosav szerepét az NBD1 intermedier szerkezeteinek stabilizálásában. A szimulációk elemzése megmutatta, hogy az F508 aminosav és annak környezete nem-natív kölcsönhatásokat alakít ki, melyeknek fontos szerepe lehet a CFTR érése során az NBD1 feltekeredésének elindításában, helyes irányba terelésében és támogatásában. A letekeredési MD szimulációink megmutatták, hogy a Δ F508 mutánsban az F508 hiánya az S6 β -redő egy kisebb mértékű meggyengülését okozza. Az AFM kísérleteknél alkalmazott módszerhez hasonlóan a szimulációs adatok esetén is meghatároztuk az *S6- α -S8 core* letekeredését jellemző kontúrhossz-növekedés értékeket. Ez a kísérleti és szimulációs adatok közvetlen összehasonlítását tette lehetővé, ami azt mutatja, hogy a Δ F508 mutáció megakadályozza az NBD1 helyes feltekeredését, valamint a Δ F508 mutáns esetén a feltekeredés során az α -alegység nagymértékben instabil. Ezt alátámasztják további kísérleti eredményeink is, valamint a BIA vegyület jelenlétében végzett AFM kísérleteink is.

Összességében, az NBD1 kísérleti és szimulációs módszerek kombinálásával történő vizsgálata lehetővé tette számunkra a Δ F508 mutáció hatásának atomi szintű jellemzését. Az eredményeink azt mutatják, hogy a feltekeredés során a Δ F508 mutáció kedvezőtlen intramolekuláris kölcsönhatások kialakulásához vezet, ami az NBD1 α -alegységének csökkent stabilitását eredményezi. Ez a jelenség felhasználható lehet korrekciós hatóanyagok tervezéséhez. Továbbá megállapítottuk, hogy az α -alegység potenciális célpontja lehet allosztérikus hatású kis molekuláknak, melyek a Δ F508 és más NBD1 domént destabilizáló mutációk hatásának ellensúlyozására lehetnek alkalmasak. Az ilyen típusú célzott korrektorok segíthetik a CFTR fehérje feltekeredését az NBD1 domén stabilizálásán keresztül.

5. Tudományos eredmények összegzése

I. rész - A CFTR kloridútvonal azonosítása és az ioncsatorna-működés szerkezeti hátterének feltérképezése

A disszertáció első felében a CFTR-kloridvezetés szerkezeti hátterének vizsgálatával, a kloridionok áteresztésére alkalmas ioncsatorna atomi szintű feltérképezésével és jellemzésével kapcsolatos eredményeket mutattam be. Egyfelől egyensúlyi molekula dinamikai szimulációkat végeztünk az aktív állapotban megoldott, ATP-kötött és foszforilált CFTR szerkezettel (PDB ID: 5w81). A módszer segítségével előállított szerkezeti sokaságban meghatároztuk a kloridion CFTR fehérjén belüli átjutási útvonalát. A munka során jellemeztük az ioncsatorna szerkezeti tulajdonságait, a fehérje és kloridionok közötti kölcsönhatásokat. A CFTR ioncsatorna funkciójára vonatkozóan összegyűjtöttük a publikált kísérleti adatokat és validáltuk a szimulációkkal kapott eredményeinket. Másfelől megvizsgáltuk a TM8 ioncsatorna-nyitásra gyakorolt hatását. A TM8 egy atipikus szerkezeti elem, az ABC fehérjékre nem jellemző módon a membrán régióban megtört. Emellett a szerkezetben a TM8 szokatlan helyzete a TM7-et is kimozdítja a homológ ABC fehérjékre jellemző pozíciójából.

Tézis I.1. A CFTR citoszolikus részén két alternatív belépési hely is található.

A CFTR szerkezeti sokaságban a nyitott szerkezetek esetén két intracelluláris bemeneti pórust is megfigyeltünk (TM4/6 és TM10/12), melyeket pozitív töltésű aminosavak vesznek körül. Ezeknek fontos szerepe lehet a negatív töltésű kloridionok elektrosztatikus vonzásában. A szimulációk során a kedvező elektrosztatikus kölcsönhatásoknak köszönhetően gyakran tartózkodtak a kloridionok ezekben a régiókban. A meghatározott kloridion-útvonalak a szakirodalomban található kísérleti eredményekkel is összhangban vannak.

Tézis I.2. Az ioncsatorna citoszolikus bemeneti szakaszán a szubsztrát mérete és töltése határozza meg a szelektivitást.

Közvetlenül az ioncsatorna bemeneti szakaszán alacsony ioncsatorna-sugárértékeket figyeltünk meg, ami arra utal, hogy az ioncsatorna-szubsztrát méretét ez a bemeneti régió jelentősen korlátozza. A szimulációk során a citoszolikus bemeneti pórusok körüli kloridion-kölcsönhatási helyeket határoztunk meg. Továbbá megfigyeltük, hogy a kloridionok sikeresen bejutottak az ioncsatornába, míg ezzel szemben a pozitív töltésű káliumionok nem alakítottak ki jelentős kölcsönhatásokat a CFTR fehérjével, és ezek az ionok nem is jutottak be a fehérje belsejébe.

Tézis I.3. A kloridvezetés potenciális korlátozó tényezője az úgynevezett szűk keresztmetszeti régió.

A kloridion-útvonal szűk keresztmetszeti régiójában jellemzően hidrofób aminosavak helyezkednek el. Az ioncsatorna átmérője ebben a régióban a nyitott konformációkban csak kismértékben haladta meg a kloridion méretét. Emellett, az egyensúlyi szimulációk során nem figyeltünk meg spontán ionátjutást, a fehérje belsejébe bejutó kloridionok nem jutottak át a szűk keresztmetszeti régión. Ezek alátámasztják azt a feltételezést, hogy ennek a szűk szakasznak szerepe van az ionáteresztés korlátozásában, szabályozásában.

Tézis I.4. A CFTR krio-EM szerkezetekben megfigyelhető 8-as transzmembrán hélix (TM8) megtörése és a 7-es transzmembrán hélix (TM7) elmozdulása gátolhatja az ioncsatorna működését.

A zebrahal szerkezettel végzett egyensúlyi szimulációk során azt tapasztaltuk, hogy rendkívül alacsony volt az ioncsatorna-nyitás aránya (0.047%). A 8-as transzmembrán hélix (TM8) törése a transzmembrán régióban a lipidek ioncsatornába történő betüremkedését okozzák, ami szintén hozzájárulhat a ritka ioncsatorna-nyitáshoz. Ezt a homológiamodellezéssel történő TM8 kiegyenesítése és a TM7 homológ ABC fehérjékre jellemző pozícióba mozdítása után kapott szerkezeti modellel végzett egyensúlyi szimulációkkal vizsgáltuk. Ezekben a szimulációkban megnövekedett a kloridionok által átjárhatóvá váló szerkezetek aránya (2.038%), illetve a lipid molekulák ebben az esetben nem tudtak betüremkedni a hélixek közé az ioncsatornába. Az eredmények azt sugallják, hogy a TM8 megtörése a szerkezetmeghatározáskor fennálló körülmények következménye lehet.

Kapcsolódó publikációk: J1, J2**II. rész - A CFTR kloridcsatorna NBD1 domén mechanikai letekeredésének vizsgálata**

A disszertáció második felében a CFTR kloridcsatorna NBD1 domén mechanikai letekeredésének vizsgálatával kapott eredmények kerültek bemutatásra. Csoportunk erőspektroszkópiái (AFM) kísérleteihez hasonlóan, azonban nagyobb felbontásban, irányított molekula dinamikai szimulációkkal vizsgáltuk az NBD1 mechanikai letekeredését egy egyszerűsített HA-Gö modell (*heavy-atom Gö*) alkalmazásával. Ezekből a szimulációs adatokból meghatároztuk az NBD1 másodlagos szerkezeti elemeinek letekeredési sorrendjét, a letekeredési útvonalakat, melynek eredménye jelentősen hozzájárult az erőspektroszkópiái (AFM) kísérletekből kapott letekeredési mintázatok értelmezéséhez. Az *S6- α -S8 core* régió a szerkezetben egy önálló egységet alkotó és szekvenciálisan is folytonos szakasz, ebben a régióban található az F508 aminosav is. Azért, hogy pontosabban jellemezhessük az F508 aminosav *S6- α -S8 core*

régióra kiterjedő hatását, nehéz atomokra kiterjedő, explicit oldószer jelenlétében végzett (HA-MD) szimulációkkal modelleztük az *S6- α -S8 core* mechanikai letekeredését. Emellett vizsgáltuk a letekeredés köztes szerkezeti állapotait, a letekeredés során létrejövő nem-natív kölcsönhatásokat, valamint az F508 aminosav szerepét az NBD1 letekeredési intermedier szerkezetek stabilizálásában. Továbbá, az erőspektroszkópiai kísérleti eredményekhez hasonlóan meghatároztuk a HA-MD szimulációkból származó, *S6- α -S8 core* régió letekeredését jellemző kontúrhossz és kontúrhossz-növekedés értékeket. Ez a kísérleti és szimulációs adatok közvetlen összehasonlítását és a kísérleti eredmények könnyebb megértését tette lehetővé.

Tézis II.1. A Δ F508 mutáns *S6- α -S8 core* régióban az F508 aminosav hiánya az S6 β -redő egy kisebb mértékű meggyengülését okozza letekeredési molekula dinamikai szimulációk során.

A másodlagos szerkezeti elemek natív kölcsönhatásainak letekeredés során bekövetkező változása alapján meghatároztuk az *S6- α -S8 core* régió letekeredési útvonalait. Az útvonalak elemzése azt mutatta, hogy a Δ F508 mutáns esetén nagyobb arányban fordul elő a H6 α -hélix S6 β -redő előtti letekeredése (Δ F508: 40%, WT: 22%). Ezt a szerkezetek csoportosítása is alátámasztotta, ugyanis míg a vad típus letekeredésének kezdeti szakaszán csupán egy kezdeti szerkezeti csoportot kaptunk eredményül, mely során az S6 β -redő H6 α -hélix előtt tekeredett le (WT centroid 1), addig a Δ F508 mutáns esetén két kezdeti szerkezeti csoportot sikerült azonosítani, melyek egyikére a H6 α -hélix S6 β -redő előtti letekeredése volt jellemző (Δ F508 centroid 1 és 2). Megvizsgáltuk a másodlagos szerkezeti elemek letekeredési időpontjainak eloszlását és azt tapasztaltuk, hogy a mutánsra jellemző az S6 β -redő korábbi időpontokban történő leválása. A másodlagos szerkezeti elemek leválási időpontjaiban mérhető szakítóerők eloszlásának vizsgálata megmutatta, hogy a mutánsra jellemző az S6 β -redő kisebb erőhatásra történő leválása. A H6 α -hélix esetén nem volt jelentős az eltérés a vad típus és a mutáns leválási időpontok és szakítóerők eloszlásában. Ezek alapján az S6 β -redő gyengébb kötődése, nem pedig a H6 α -hélix erősebb kötődése jellemzi a Δ F508 mutánst a mechanikai letekeredés során.

Tézis II.2. Az F508 aminosav és annak környezete nem-natív kölcsönhatásokat alakít ki, melyeknek fontos szerepe lehet a CFTR érése során az NBD1 feltekeredésének elindításában, helyes irányba terelésében és támogatásában.

Az *S6- α -S8 core* régió letekeredésének elemzése megmutatta, hogy minden esetben a letekeredés utolsó lépésében bomlik fel az F508 aminosavat is tartalmazó α -alegység. Tehát, az *S6- α -S8 core* letekeredése alatt a vad típusú szerkezet esetén az F508 aminosav végig a még feltekeredett peptidszakasz részét képezi. A letekeredés szerkezeteinek csoportosításával megfigyeltük, hogy a vad típus a letekeredése utolsó lépése előtt egy tartósabb köztes szerkezeti állapotot is felvesz a mutánssal szemben. A kölcsönhatások

vizsgálatával azt tapasztaltuk, hogy az F508 és annak környezete a natív szerkezetben nem szereplő, azaz nem-natív kölcsönhatások kialakításában vesz részt a letekeredés során. Ezek száma megemelkedik a letekeredés utolsó lépése előtt, és ez az emelkedés a vad típus esetén jelentősen nagyobb mértékű. Azaz, ez a letekeredés során kialakuló intermedier szerkezet nem-natív kölcsönhatások révén stabilizálódhat. Ezekben a nem-natív kölcsönhatásokban részt vevő aminosavak jelentős része hidrofób, melyek fontos szerepet játszhatnak az NBD1 feltekeredésének korai szakaszában, a kezdeti lokális feltekeredés elindításában, illetve a feltekeredés helyes irányba történő terelésében. Ezt *fold*ing szimulációkkal is vizsgáltuk, melyek során az F508 és annak környezete számos kölcsönhatást létesített. A *fold*ing szimulációk azt sugallják, hogy az F508 hiánya egy, a feltekeredés szempontjából kedvezőtlen nem-natív kölcsönhatás (Y515-Y512) kialakulásához vezet, ellenben a megfelelő hélixorientáció kialakulásához fontos lehet az F508-Y512 kölcsönhatás.

Tézis II.3. A Δ F508 mutáció elsősorban az NBD1 helyes feltekeredését akadályozza meg.

A csoportunk által végzett kísérletek eredménye azt mutatta, hogy a vad típus és a Δ F508 mutáns esetén eltérő letekeredési mintázat jellemző. Ez utalhat arra, hogy a Δ F508-NBD1 eltérő mechanikai ellenállással jellemezhető, vagy a fehérje előállítási folyamatok során a Δ F508 mutáns jelentős mértékben helytelenül tekeredett fel. Ennek feloldása érdekében letekeredési molekula dinamikai szimulációkat végeztünk a vad típusú és a Δ F508 mutáns *S6- α -S8 core* régióval és a kísérletekhez hasonlóan meghatároztuk a letekeredési események eloszlását. A két módszer által kapott eredmények összehasonlítása azt mutatta, hogy a vad típusra jellemző, kísérletek során kapott letekeredési mintázat jól megfeleltethető a vad típus, szimulációs adatokból meghatározott letekeredési mintázatával. A Δ F508 mutáns kísérleti letekeredési mintázata viszont jelentősen eltért a Δ F508 mutáns szimulációs letekeredési mintázattól. A két módszer által kapott eredmény közötti eltérést a Δ F508 mutáns esetén az okozta, hogy míg a szimulációkban a jól feltekeredett, natív NBD1 szerkezetből indultunk ki a mutáns esetében is, addig a kísérletek során *in vitro* termelt fehérje tartalmazhatott jól feltekert és többféle, hibásan feltekert fehérjepopulációt is. Az összehasonlítással megmutattuk, hogy a kísérletekben megfigyelt eltérést nem a Δ F508 mutáns csökkent mechanikai ellenállása, hanem a helyesen feltekeredett fehérjék csökkent aránya okozza. Ezt alátámasztja a kísérleti eredményeinkből számolt adat is, miszerint a kísérleti erőgörbék kétszerese volt a vad típus esetén a natív *S6- α -S8 core* letekeredésére jellemző a Δ F508 mutánshoz képest (WT: 56%, Δ F508: 28%). Továbbá a BIA molekula jelenlétében végzett AFM kísérleteink is azt mutatják, hogy a BIA növeli a Δ F508-NBD1 mechanikai letekeredéssel szembeni ellenállását és nagymértékben stabilizálja az α -alegységet.

Kapcsolódó publikáció: J3

Publikációk jegyzéke

Tézisek alapjául szolgáló folyóirat publikációk

- [J1] B. Farkas, H. Tordai, R. Padányi, A. Tordai, J. Gera, G. Paragi, T. Hegedűs. (2019) Discovering the chloride pathway in the CFTR channel. *Cell. Mol. Life Sci.* 77:765–778.
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03211-4>
- [J2] T. Hegedűs, M. Geisler, G.L. Lukács, B. Farkas. (2022) Ins and outs of AlphaFold2 transmembrane protein structure predictions. *Cell. Mol. Life Sci.* 79:73.
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-04112-1>
- [J3] R. Padányi*, B. Farkas*, H. Tordai, B. Kiss, H. Grubmüller, N. Soya, G. L. Lukács, M. Kellermayer, T. Hegedűs. (2022) Nanomechanics combined with HDX reveals allosteric drug binding sites of CFTR NBD1. *Computational and structural biotechnology journal*, 20, 2587-2599, *equally contributed
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.05.036>

Tézisek alapjául szolgáló konferencia publikációk

- [C1] B. Farkas, R. Padányi, H. Tordai, B. Kiss, M. Kellermayer, T. Hegedűs. Nanomechanics of the CFTR NBD1.
ABC2020 - 8th FEBS Special Meeting, ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, 2020, Innsbruck, Austria
- [C2] B. Farkas, H. Tordai, R. Padányi, A. Tordai, J. Gera, G. Paragi, T. Hegedűs. Discovering the conducting pathway of the CFTR channel using *in silico* methods. *FEBS Advanced Lecture Course, Biochemistry of Membrane Proteins – Structure, Trafficking, Regulation*, August 2019, Budapest, Hungary
- [C3] B. Farkas, H. Tordai, R. Padányi, A. Tordai, J. Gera, G. Paragi, T. Hegedűs. Discovering the conducting pathway of the CFTR channel using *in silico* methods. *Gordon Research Conference, Mechanisms of Membrane Transport*, June 2019, New London, NH, United States
- [C4] B. Farkas, H. Tordai, J. Gera, G. Paragi, T. Hegedűs. Characterization of the CFTR chloride channel. *ITTS Inaugural Conference*, September 2018, Vienna, Austria
- [C5] B. Farkas. Investigation of intramolecular interactions of the disordered CFTR regulatory domain. *EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00002 Workshop – In memoriam Hámori József*, 2021, Budapest, Hungary
- [C6] B. Farkas, R. Padányi, H. Tordai, B. Kiss, M. Kellermayer, T. Hegedűs. Characterisation of the mechanical unfolding of CFTR NBD1 using computational and experimental methods. (in Hungarian) *MaBiT - Bioinformatika 2020*, 2020, Budapest, Hungary
- [C7] B. Farkas, H. Tordai, R. Padányi, A. Tordai, J. Gera, G. Paragi, T. Hegedűs. Discovering the conducting pathway of the CFTR channel using *in silico* methods. *FEBS Advanced Lecture*

Course, Biochemistry of Membrane Proteins – Structure, Trafficking, Regulation, August 2019, Budapest, Hungary

- [C8] B. Farkas, H. Tordai, R. Padányi, A. Tordai, J. Gera, G. Paragi, T. Hegedűs. Discovering the chloride conducting pathway of the CFTR channel using *in silico* methods. *GPU Day 2019 – The future of Computing, Graphics and Data Analysis*, July 2019, Budapest, Hungary

Egyéb folyóirat publikációk

- [J4] B. Farkas and G. Csizmadia, E. Katona, G. Tusnády, T. Hegedűs. (2019) MemBlob database and server for identifying transmembrane regions using cryo-EM maps. *Bioinformatics* 36:2595–2598. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz539>
- [J5] G. Csizmadia, B. Farkas, Z. Spagina, H. Tordai, T. Hegedűs. (2018) Quantitative comparison of ABC membrane protein type I exporter structures in a standardized way. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.10.008>

PhD Proceedings – Annual Issues of the Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics

- [P1] B. Farkas. Characterization of the CFTR chloride channel using *in silico* methods. *PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* vol. 13 : 2018 p. 21 (2018)
- [P2] B. Farkas. Describing the ion passage through the CFTR ion channel. *PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* vol. 14 : 2019 p. 31 (2019)
- [P3] B. Farkas. Mechanical unfolding of the CFTR chloride channel NBD1 domain using force probe simulations. *PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* vol. 15 : 2020 p. 33 (2020)
- [P4] B. Farkas. Effect of F508 deletion on the CFTR NBD1 nanomechanics. *PhD Proceedings Annual Issues of the Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* vol. 16 : 2021 p. 33 (2021)

Köszönetnyilvánítás

Doktori tanulmányaim során számos, különböző forrásból származó segítséget és tanácsot kaptam. Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Hegedűs Tamásnak, a lehetőséget, hogy a csoportjában dolgozhattam és megismerkedhettem az ABC membránfehérjék világával. Munkám során rengeteg segítséget, tanácsot és nem utolsósorban építő kritikát kaptam. Azt gondolom, hogy ezekből sokat tanultam és hasznos útravalónak bizonyulnak a további kutatás során is. Hálás vagyok azért is, amiért szorgalmazta és támogatta konferenciákon történő részvételemet is, ahol lehetőségem volt új kutatási területekkel és eredményekkel megismerkedni, valamint saját prezentációs készségemen javítani.

Sok köszönettel tartozom Padányi Ritának, akihez bátran fordulhattam kérdéseimmel, és amiért mindig meghallgatott, amikor csak hangosan ki kellett mondanom a gondolataimat, hogy átgondolhassam a felmerülő problémákat. Számomra rendkívül motiváló volt együtt dolgozni vele az NBD1 mechanikai letekeredésének vizsgálatán. Továbbá szeretném megköszönni a csoportunk többi tagjának, Tordai Hélinek, Lőr Krisztinek, Csizmadia Ginának és Berta Blankának is a támogatását, és hogy mindig jó hangulatot teremtettek az irodában. Emellett szeretném megköszönni a Semmelweis Egyetem Biofizika Intézetének és munkatársainak, hogy befogadtak az intézetbe és lehetőségem volt részt venni az intézeti programokon.

Szeretném megköszönni a Doktori Iskolának, hogy részt vehettem a doktori képzésben. Köszönöm Gáspári Zoltánnak, hogy vállalta a konzulensi feladatkört, valamint Katinka néninek kedvességét és segítők munkáját az adminisztratív ügyek intézésében. Továbbá köszönettel tartozom a Pázmány Péter Katolikus Egyetem támogatásának is (KAP, ÚNKP-20-3 Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválóság Program, Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap).

Végül szeretném megköszönni barátaim, családom és férjem támogatását, akik lehetővé tették, hogy a nehéz, ugyanakkor érdekes utat járjam és azzal foglalkozhassak, amivel szeretnék. Köszönöm, hogy mindig mellettem állnak és bármikor számíthatok rájuk.

Irodalomjegyzék

- [1] A. W. R. Serohijos, T. Hegedus, J. R. Riordan, and N. V. Dokholyan, “Diminished self-chaperoning activity of the DeltaF508 mutant of CFTR results in protein misfolding,” *PLoS Comput Biol*, vol. 4, no. 2, p. e1000008, Feb. 2008, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000008.
- [2] V. Saint-Criq and M. A. Gray, “Role of CFTR in epithelial physiology,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 74, no. 1, pp. 93–115, Jan. 2017, doi: 10.1007/s00018-016-2391-y.
- [3] L. S. Hanssens, J. Duchateau, and G. J. Casimir, “CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel?,” *Cells*, vol. 10, no. 11, p. 2844, Oct. 2021, doi: 10.3390/cells10112844.
- [4] K. De Boeck and M. D. Amaral, “Progress in therapies for cystic fibrosis,” *The Lancet Respiratory Medicine*, vol. 4, no. 8, pp. 662–674, Aug. 2016, doi: 10.1016/S2213-2600(16)00023-0.
- [5] G. Veit *et al.*, “From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations,” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 27, no. 3, pp. 424–433, Feb. 2016, doi: 10.1091/mbc.E14-04-0935.
- [6] X. Meng, J. Clews, E. R. Martin, A. D. Ciuta, and R. C. Ford, “The structural basis of cystic fibrosis,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 46, no. 5, pp. 1093–1098, Oct. 2018, doi: 10.1042/BST20180296.
- [7] L. Csanády, P. Vergani, and D. C. Gadsby, “Structure, Gating, and Regulation Of The CFTR Anion Channel,” *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 1, pp. 707–738, 01 2019, doi: 10.1152/physrev.00007.2018.
- [8] D. Muallem and P. Vergani, “ATP hydrolysis-driven gating in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 364, no. 1514, pp. 247–255, Jan. 2009, doi: 10.1098/rstb.2008.0191.
- [9] H. A. Lewis *et al.*, “Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,” *EMBO J*, vol. 23, no. 2, pp. 282–293, Jan. 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600040.
- [10] R. J. P. Dawson and K. P. Locher, “Structure of a bacterial multidrug ABC transporter,” *Nature*, vol. 443, no. 7108, pp. 180–185, Sep. 2006, doi: 10.1038/nature05155.
- [11] A. W. R. Serohijos *et al.*, “Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, no. 9, pp. 3256–3261, Mar. 2008, doi: 10.1073/pnas.0800254105.
- [12] J.-P. Mornon, P. Lehn, and I. Callebaut, “Molecular models of the open and closed states of the whole human CFTR protein,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 21, pp. 3469–3486, Nov. 2009, doi: 10.1007/s00018-009-0133-0.
- [13] V. Corradi, P. Vergani, and D. P. Tieleman, “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR): Closed and Open State Channel Models,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 38, pp. 22891–22906, Sep. 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.665125.
- [14] J.-P. Mornon, B. Hoffmann, S. Jonic, P. Lehn, and I. Callebaut, “Full-open and closed CFTR channels, with lateral tunnels from the cytoplasm and an alternative position of the F508 region, as revealed by molecular dynamics,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 7, pp. 1377–1403, Apr. 2015, doi: 10.1007/s00018-014-1749-2.
- [15] H. Tordai, I. Leveles, and T. Hegedűs, “Molecular dynamics of the cryo-EM CFTR structure,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 491, no. 4, pp. 986–993, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.165.
- [16] B. Kleizen *et al.*, “CFTR: New insights into structure and function and implications for modulation by small molecules,” *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 19, pp. S19–S24, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jcf.2019.10.021.

- [17] L. Csanády, K. W. Chan, A. C. Nairn, and D. C. Gadsby, “Functional roles of nonconserved structural segments in CFTR’s NH₂-terminal nucleotide binding domain,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 125, no. 1, pp. 43–55, Jan. 2005, doi: 10.1085/jgp.200409174.
- [18] A. A. Aleksandrov *et al.*, “Regulatory insertion removal restores maturation, stability and function of DeltaF508 CFTR,” *J. Mol. Biol.*, vol. 401, no. 2, pp. 194–210, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.jmb.2010.06.019.
- [19] É. Bakos and L. Homolya, “Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1),” *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, vol. 453, no. 5, pp. 621–641, Jan. 2007, doi: 10.1007/s00424-006-0160-8.
- [20] B. Hoffmann *et al.*, “Combining theoretical and experimental data to decipher CFTR 3D structures and functions,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 75, no. 20, pp. 3829–3855, Oct. 2018, doi: 10.1007/s00018-018-2835-7.
- [21] E. Cormet-Boyaka, M. Jablonsky, A. P. Naren, P. L. Jackson, D. D. Muccio, and K. L. Kirk, “Rescuing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by transcomplementation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 101, no. 21, pp. 8221–8226, May 2004, doi: 10.1073/pnas.0400459101.
- [22] S. H. Cheng, D. P. Rich, J. Marshall, R. J. Gregory, M. J. Welsh, and A. E. Smith, “Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel,” *Cell*, vol. 66, no. 5, pp. 1027–1036, Sep. 1991.
- [23] Z. Zhang and J. Chen, “Atomic Structure of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator,” *Cell*, vol. 167, no. 6, pp. 1586–1597.e9, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.014.
- [24] F. Liu, Z. Zhang, L. Csanády, D. C. Gadsby, and J. Chen, “Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel,” *Cell*, vol. 169, no. 1, pp. 85–95.e8, 23 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.02.024.
- [25] J. F. Fay *et al.*, “Cryo-EM visualization of an active high open probability CFTR ion channel,” *bioRxiv*, p. 274316, Mar. 2018, doi: 10.1101/274316.
- [26] Z. Zhang, F. Liu, and J. Chen, “Conformational Changes of CFTR upon Phosphorylation and ATP Binding,” *Cell*, vol. 170, no. 3, pp. 483–491.e8, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.06.041.
- [27] Z. Zhang, F. Liu, and J. Chen, “Molecular structure of the ATP-bound, phosphorylated human CFTR,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 115, no. 50, pp. 12757–12762, 11 2018, doi: 10.1073/pnas.1815287115.
- [28] F. Liu *et al.*, “Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation,” *Science*, vol. 364, no. 6446, pp. 1184–1188, Jun. 2019, doi: 10.1126/science.aaw7611.
- [29] X. Gao and T.-C. Hwang, “Localizing a gate in CFTR,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 112, no. 8, pp. 2461–2466, Feb. 2015, doi: 10.1073/pnas.1420676112.
- [30] P. Linsdell, “Functional architecture of the CFTR chloride channel,” *Molecular Membrane Biology*, vol. 31, no. 1, pp. 1–16, Feb. 2014, doi: 10.3109/09687688.2013.868055.
- [31] T.-C. Hwang, J.-T. Yeh, J. Zhang, Y.-C. Yu, H.-I. Yeh, and S. Destefano, “Structural mechanisms of CFTR function and dysfunction,” *Journal of General Physiology*, vol. 150, no. 4, pp. 539–570, Apr. 2018, doi: 10.1085/jgp.201711946.
- [32] V. Corradi, R.-X. Gu, P. Vergani, and D. P. Tieleman, “Structure of Transmembrane Helix 8 and Possible Membrane Defects in CFTR,” *Biophysical Journal*, vol. 114, no. 8, pp. 1751–1754, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.bpj.2018.03.003.
- [33] S. Chin *et al.*, “Lipid interactions enhance activation and potentiation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR),” *bioRxiv*, Dec. 2018, doi: 10.1101/495010.

- [34] E. Hildebrandt, N. Khazanov, J. C. Kappes, Q. Dai, H. Senderowitz, and I. L. Urbatsch, “Specific stabilization of CFTR by phosphatidylserine,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1859, no. 2, pp. 289–293, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.bbamem.2016.11.013.
- [35] A.-R. R. Habib, M. Kajbafzadeh, S. Desai, C. L. Yang, K. Skolnik, and B. S. Quon, “A Systematic Review of the Clinical Efficacy and Safety of CFTR Modulators in Cystic Fibrosis,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 7234, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-43652-2.
- [36] J. C. Davies *et al.*, “VX-659-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, no. 17, pp. 1599–1611, 25 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1807119.
- [37] G. Veit *et al.*, “Structure-guided combination therapy to potently improve the function of mutant CFTRs,” *Nat Med*, vol. 24, no. 11, pp. 1732–1742, Nov. 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0200-x.
- [38] G. Veit *et al.*, “Allosteric folding correction of F508del and rare CFTR mutants by elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor (Trikafta) combination,” *JCI Insight*, vol. 5, no. 18, p. 139983, Sep. 2020, doi: 10.1172/jci.insight.139983.
- [39] H. G. M. Heijerman *et al.*, “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*, vol. 394, no. 10212, pp. 1940–1948, Nov. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32597-8.
- [40] L. Kirwan *et al.*, “Longitudinal Trends in Real-World Outcomes after Initiation of Ivacaftor. A Cohort Study from the Cystic Fibrosis Registry of Ireland,” *Ann Am Thorac Soc*, vol. 16, no. 2, pp. 209–216, Feb. 2019, doi: 10.1513/AnnalsATS.201802-149OC.
- [41] K. Keown *et al.*, “Airway Inflammation and Host Responses in the Era of CFTR Modulators,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 17, p. E6379, Sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21176379.
- [42] K. Fiedorczuk and J. Chen, “Mechanism of CFTR correction by type I folding correctors,” *Cell*, vol. 185, no. 1, pp. 158–168.e11, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.cell.2021.12.009.
- [43] C. L. Ward and R. R. Kopito, “Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins,” *J Biol Chem*, vol. 269, no. 41, pp. 25710–25718, Oct. 1994.
- [44] X. Wang *et al.*, “Hsp90 Cochaperone Aha1 Downregulation Rescues Misfolding of CFTR in Cystic Fibrosis,” *Cell*, vol. 127, no. 4, pp. 803–815, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.09.043.
- [45] G. L. Lukacs, A. Mohamed, N. Kartner, X. B. Chang, J. R. Riordan, and S. Grinstein, “Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP,” *The EMBO Journal*, vol. 13, no. 24, pp. 6076–6086, Dec. 1994, doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06954.x.
- [46] K. Du, M. Sharma, and G. L. Lukacs, “The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 12, no. 1, pp. 17–25, Jan. 2005, doi: 10.1038/nsmb882.
- [47] K. Du and G. L. Lukacs, “Cooperative assembly and misfolding of CFTR domains in vivo,” *Mol Biol Cell*, vol. 20, no. 7, pp. 1903–1915, Apr. 2009, doi: 10.1091/mbc.e08-09-0950.
- [48] P. H. Thibodeau, C. A. Brautigam, M. Machius, and P. J. Thomas, “Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 12, no. 1, pp. 10–16, Jan. 2005, doi: 10.1038/nsmb881.
- [49] W. M. Rabeh *et al.*, “Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore ΔF508 CFTR folding and function,” *Cell*, vol. 148, no. 1–2, pp. 150–163, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2011.11.024.

- [50] C. Wang *et al.*, “Integrated biophysical studies implicate partial unfolding of NBD1 of CFTR in the molecular pathogenesis of F508del cystic fibrosis,” *Protein Sci*, vol. 19, no. 10, pp. 1932–1947, Oct. 2010, doi: 10.1002/pro.480.
- [51] L. He *et al.*, “Restoration of NBD1 Thermal Stability Is Necessary and Sufficient to Correct Δ F508 CFTR Folding and Assembly,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 427, no. 1, pp. 106–120, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.jmb.2014.07.026.
- [52] T. Okiyoneda *et al.*, “Mechanism-based corrector combination restores Δ F508-CFTR folding and function,” *Nat Chem Biol*, vol. 9, no. 7, pp. 444–454, Jul. 2013, doi: 10.1038/nchembio.1253.
- [53] R. P. Hudson *et al.*, “Direct Binding of the Corrector VX-809 to Human CFTR NBD1: Evidence of an Allosteric Coupling between the Binding Site and the NBD1:CL4 Interface,” *Mol Pharmacol*, vol. 92, no. 2, pp. 124–135, Aug. 2017, doi: 10.1124/mol.117.108373.
- [54] B. H. Qu and P. J. Thomas, “Alteration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding pathway,” *J Biol Chem*, vol. 271, no. 13, pp. 7261–7264, Mar. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.13.7261.
- [55] B. H. Qu, E. H. Strickland, and P. J. Thomas, “Localization and suppression of a kinetic defect in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding,” *J Biol Chem*, vol. 272, no. 25, pp. 15739–15744, Jun. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.25.15739.
- [56] R. A. Bartoszewski *et al.*, “A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein,” *J Biol Chem*, vol. 285, no. 37, pp. 28741–28748, Sep. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.154575.
- [57] V. Bali, A. Lazrak, P. Guroji, L. Fu, S. Matalon, and Z. Bebok, “A synonymous codon change alters the drug sensitivity of Δ F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,” *FASEB J*, vol. 30, no. 1, pp. 201–213, Jan. 2016, doi: 10.1096/fj.15-273714.
- [58] A. Khushoo, Z. Yang, A. E. Johnson, and W. R. Skach, “Ligand-driven vectorial folding of ribosome-bound human CFTR NBD1,” *Mol Cell*, vol. 41, no. 6, pp. 682–692, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.027.
- [59] S. J. Kim *et al.*, “Translational tuning optimizes nascent protein folding in cells,” *Science*, vol. 348, no. 6233, pp. 444–448, Apr. 2015, doi: 10.1126/science.aaa3974.
- [60] H. Shishido, J. S. Yoon, Z. Yang, and W. R. Skach, “CFTR trafficking mutations disrupt cotranslational protein folding by targeting biosynthetic intermediates,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 4258, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18101-8.
- [61] L. Cui *et al.*, “Domain Interdependence in the Biosynthetic Assembly of CFTR,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 365, no. 4, pp. 981–994, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.jmb.2006.10.086.
- [62] M. Sharma, M. Benharouga, W. Hu, and G. L. Lukacs, “Conformational and Temperature-sensitive Stability Defects of the Δ F508 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Post-endoplasmic Reticulum Compartments,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 12, pp. 8942–8950, Mar. 2001, doi: 10.1074/jbc.M009172200.
- [63] T. Darden, D. York, and L. Pedersen, “Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems,” *J. Chem. Phys.*, vol. 98, no. 12, pp. 10089–10092, Jun. 1993, doi: 10.1063/1.464397.
- [64] K. A. Feenstra, B. Hess, and H. J. C. Berendsen, “Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulations of hydrogen-rich systems,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 20, no. 8, pp. 786–798, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199906)20:8<786::AID-JCC5>3.0.CO;2-B.
- [65] P. C. Whitford, J. K. Noel, S. Gosavi, A. Schug, K. Y. Sanbonmatsu, and J. N. Onuchic, “An all-atom structure-based potential for proteins: Bridging minimal models with all-atom empirical forcefields,” *Proteins*, vol. 75, no. 2, pp. 430–441, May 2009, doi: 10.1002/prot.22253.

- [66] C. Clementi, “Coarse-grained models of protein folding: toy models or predictive tools?,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 18, no. 1, pp. 10–15, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.sbi.2007.10.005.
- [67] J. K. Noel, P. C. Whitford, K. Y. Sanbonmatsu, and J. N. Onuchic, “SMOG@ctbp: simplified deployment of structure-based models in GROMACS,” *Nucleic Acids Research*, vol. 38, no. suppl_2, pp. W657–W661, Jul. 2010, doi: 10.1093/nar/gkq498.
- [68] F. Ding, D. Tsao, H. Nie, and N. V. Dokholyan, “Ab initio folding of proteins with all-atom discrete molecular dynamics,” *Structure*, vol. 16, no. 7, pp. 1010–1018, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.str.2008.03.013.
- [69] E. A. Proctor and N. V. Dokholyan, “Applications of Discrete Molecular Dynamics in biology and medicine,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 37, pp. 9–13, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.sbi.2015.11.001.
- [70] Y. Okamoto, “Generalized-ensemble algorithms: enhanced sampling techniques for Monte Carlo and molecular dynamics simulations,” *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 22, no. 5, pp. 425–439, May 2004, doi: 10.1016/j.jmgm.2003.12.009.
- [71] D. Branduardi, F. L. Gervasio, and M. Parrinello, “From A to B in free energy space,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 126, no. 5, p. 054103, Feb. 2007, doi: 10.1063/1.2432340.
- [72] M. Abraham *et al.*, “GROMACS 2023 Manual,” Feb. 2023, doi: 10.5281/ZENODO.7588711.
- [73] J. Das, A. A. Aleksandrov, L. Cui, L. He, J. R. Riordan, and N. V. Dokholyan, “Transmembrane helical interactions in the CFTR channel pore,” *PLOS Computational Biology*, vol. 13, no. 6, p. e1005594, Jun. 2017, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005594.
- [74] G. Csizmadia, B. Farkas, Z. Spagina, H. Tordai, and T. Hegedűs, “Quantitative comparison of ABC membrane protein type I exporter structures in a standardized way,” *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 16, pp. 396–403, 2018, doi: 10.1016/j.csbj.2018.10.008.
- [75] M. A. Lomize, A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, and H. I. Mosberg, “OPM: orientations of proteins in membranes database,” *Bioinformatics*, vol. 22, no. 5, pp. 623–625, Mar. 2006, doi: 10.1093/bioinformatics/btk023.
- [76] S. Pronk *et al.*, “GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit,” *Bioinformatics*, vol. 29, no. 7, pp. 845–854, Apr. 2013, doi: 10.1093/bioinformatics/btt055.
- [77] J. Huang *et al.*, “CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins,” *Nat Methods*, vol. 14, no. 1, pp. 71–73, Jan. 2017, doi: 10.1038/nmeth.4067.
- [78] R. B. Best *et al.*, “Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 dihedral angles,” *J Chem Theory Comput*, vol. 8, no. 9, pp. 3257–3273, Sep. 2012, doi: 10.1021/ct300400x.
- [79] J. Lee *et al.*, “CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 12, no. 1, pp. 405–413, Jan. 2016, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00935.
- [80] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, and W. Im, “CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 29, no. 11, pp. 1859–1865, Aug. 2008, doi: 10.1002/jcc.20945.
- [81] B. R. Brooks *et al.*, “CHARMM: The biomolecular simulation program,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 30, no. 10, pp. 1545–1614, Jul. 2009, doi: 10.1002/jcc.21287.
- [82] Y. Komuro, S. Re, C. Kobayashi, E. Muneyuki, and Y. Sugita, “CHARMM Force-Fields with Modified Polyphosphate Parameters Allow Stable Simulation of the ATP-Bound Structure of Ca(2+)-ATPase,” *J Chem Theory Comput*, vol. 10, no. 9, pp. 4133–4142, Sep. 2014, doi: 10.1021/ct5004143.

- [83] T. Darden, D. York, and L. Pedersen, "Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 98, no. 12, pp. 10089–10092, Jun. 1993, doi: 10.1063/1.464397.
- [84] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, and J. G. E. M. Fraaije, "LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 18, no. 12, pp. 1463–1472, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.
- [85] O. S. Smart, J. G. Neduveilil, X. Wang, B. A. Wallace, and M. S. P. Sansom, "HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models," *Journal of Molecular Graphics*, vol. 14, no. 6, pp. 354–360, Dec. 1996, doi: 10.1016/S0263-7855(97)00009-X.
- [86] M. Petřek, M. Otyepka, P. Banáš, P. Košinová, J. Koča, and J. Damborský, "CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities," *BMC Bioinformatics*, vol. 7, p. 316, Jun. 2006, doi: 10.1186/1471-2105-7-316.
- [87] G. A. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi, C. Camilloni, and G. Bussi, "PLUMED 2: New feathers for an old bird," *Computer Physics Communications*, vol. 185, no. 2, pp. 604–613, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.cpc.2013.09.018.
- [88] Z. L. Johnson and J. Chen, "ATP Binding Enables Substrate Release from Multidrug Resistance Protein 1," *Cell*, vol. 172, no. 1–2, pp. 81–89.e10, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2017.12.005.
- [89] M. A. Larkin *et al.*, "Clustal W and Clustal X version 2.0," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2947–2948, Nov. 2007, doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- [90] A. Fiser and A. Sali, "Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models," *Methods Enzymol*, vol. 374, pp. 461–491, 2003, doi: 10.1016/S0076-6879(03)74020-8.
- [91] N. Michaud-Agrawal, E. J. Denning, T. B. Woolf, and O. Beckstein, "MDAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations," *J Comput Chem*, vol. 32, no. 10, pp. 2319–2327, Jul. 2011, doi: 10.1002/jcc.21787.
- [92] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, "VMD: visual molecular dynamics," *J Mol Graph*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, 27–28, Feb. 1996.
- [93] J. D. Hunter, "Matplotlib: A 2D Graphics Environment," *Computing in Science & Engineering*, vol. 9, no. 3, pp. 90–95, 2007, doi: 10.1109/MCSE.2007.55.
- [94] G. Gyimesi, S. Ramachandran, P. Kota, N. V. Dokholyan, B. Sarkadi, and T. Hegedűs, "ATP hydrolysis at one of the two sites in ABC transporters initiates transport related conformational transitions," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1808, no. 12, pp. 2954–2964, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.07.038.
- [95] Y. El Hiani and P. Linsdell, "Functional Architecture of the Cytoplasmic Entrance to the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channel Pore," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, no. 25, pp. 15855–15865, Jun. 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.656181.
- [96] Y. Norimatsu *et al.*, "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: A Molecular Model Defines the Architecture of the Anion Conduction Path and Locates a 'Bottleneck' in the Pore," *Biochemistry*, vol. 51, no. 11, pp. 2199–2212, Mar. 2012, doi: 10.1021/bi201888a.
- [97] W. Wang, Y. El Hiani, and P. Linsdell, "Alignment of transmembrane regions in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore," *The Journal of General Physiology*, vol. 138, no. 2, pp. 165–178, Aug. 2011, doi: 10.1085/jgp.201110605.
- [98] X. Gao, Y. Bai, and T.-C. Hwang, "Cysteine scanning of CFTR's first transmembrane segment reveals its plausible roles in gating and permeation," *Biophys. J.*, vol. 104, no. 4, pp. 786–797, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.bpj.2012.12.048.

- [99] Y. El Hiani and P. Linsdell, "Tuning of CFTR chloride channel function by location of positive charges within the pore," *Biophys. J.*, vol. 103, no. 8, pp. 1719–1726, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.bpj.2012.09.020.
- [100] N. Ge, C. N. Muise, X. Gong, and P. Linsdell, "Direct Comparison of the Functional Roles Played by Different Transmembrane Regions in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channel Pore," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 53, pp. 55283–55289, Dec. 2004, doi: 10.1074/jbc.M411935200.
- [101] D. N. Sheppard, S. M. Travis, H. Ishihara, and M. J. Welsh, "Contribution of proline residues in the membrane-spanning domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to chloride channel function," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 25, pp. 14995–15001, Jun. 1996.
- [102] C. Alexander *et al.*, "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: using differential reactivity toward channel-permeant and channel-impermeant thiol-reactive probes to test a molecular model for the pore," *Biochemistry*, vol. 48, no. 42, pp. 10078–10088, Oct. 2009, doi: 10.1021/bi901314c.
- [103] J.-J. Zhou, M.-S. Li, J. Qi, and P. Linsdell, "Regulation of conductance by the number of fixed positive charges in the intracellular vestibule of the CFTR chloride channel pore," *J. Gen. Physiol.*, vol. 135, no. 3, pp. 229–245, Mar. 2010, doi: 10.1085/jgp.200910327.
- [104] C. N. S. Aubin and P. Linsdell, "Positive charges at the intracellular mouth of the pore regulate anion conduction in the CFTR chloride channel," *J. Gen. Physiol.*, vol. 128, no. 5, pp. 535–545, Nov. 2006, doi: 10.1085/jgp.200609516.
- [105] G. Cui, Z.-R. Zhang, A. R. W. O'Brien, B. Song, and N. A. McCarty, "Mutations at arginine 352 alter the pore architecture of CFTR," *J. Membr. Biol.*, vol. 222, no. 2, pp. 91–106, Mar. 2008, doi: 10.1007/s00232-008-9105-9.
- [106] P. Linsdell, "Architecture and functional properties of the CFTR channel pore," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 74, no. 1, pp. 67–83, Jan. 2017, doi: 10.1007/s00018-016-2389-5.
- [107] A. Negoda, M. S. Hogan, E. A. Cowley, and P. Linsdell, "Contribution of the eighth transmembrane segment to the function of the CFTR chloride channel pore," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 76, no. 12, pp. 2411–2423, Jun. 2019, doi: 10.1007/s00018-019-03043-2.
- [108] Z. W. Zeng, P. Linsdell, and R. Pomès, "Molecular Dynamics Study of Cl⁻ Permeation through Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)," In Review, preprint, Aug. 2021. doi: 10.21203/rs.3.rs-771352/v1.
- [109] Y. El Hiani, A. Negoda, and P. Linsdell, "Cytoplasmic pathway followed by chloride ions to enter the CFTR channel pore," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 73, no. 9, pp. 1917–1925, May 2016, doi: 10.1007/s00018-015-2113-x.
- [110] Z. He, H. Cui, S. Hao, L. Wang, and J. Zhou, "Electric-Field Effects on Ionic Hydration: A Molecular Dynamics Study," *J Phys Chem B*, vol. 122, no. 22, pp. 5991–5998, Jun. 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b02773.
- [111] A. Negoda, E. A. Cowley, Y. El Hiani, and P. Linsdell, "Conformational change of the extracellular parts of the CFTR protein during channel gating," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 75, no. 16, pp. 3027–3038, Aug. 2018, doi: 10.1007/s00018-018-2777-0.
- [112] J. Zhang, Y.-C. Yu, J.-T. Yeh, and T.-C. Hwang, "Functional characterization reveals that zebrafish CFTR prefers to occupy closed channel conformations," *PLoS ONE*, vol. 13, no. 12, p. e0209862, Dec. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0209862.
- [113] K. Carveth, T. Buck, V. Anthony, and W. R. Skach, "Cooperativity and Flexibility of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Transmembrane Segments Participate in Membrane Localization of a Charged Residue," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 42, pp. 39507–39514, Oct. 2002, doi: 10.1074/jbc.M205759200.

- [114] T. Hegedűs, A. Aleksandrov, L. Cui, M. Gentsch, X.-B. Chang, and J. R. Riordan, “F508del CFTR with two altered RXR motifs escapes from ER quality control but its channel activity is thermally sensitive,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1758, no. 5, pp. 565–572, May 2006, doi: 10.1016/j.bbamem.2006.03.006.
- [115] I. Protasevich *et al.*, “Thermal unfolding studies show the disease causing F508del mutation in CFTR thermodynamically destabilizes nucleotide-binding domain 1: Thermal Unfolding Mechanism for (F508del)NBD1,” *Protein Science*, vol. 19, no. 10, pp. 1917–1931, Oct. 2010, doi: 10.1002/pro.479.
- [116] R. H. Pires, M. J. Saraiva, A. M. Damas, and M. S. Z. Kellermayer, “Force spectroscopy reveals the presence of structurally modified dimers in transthyretin amyloid annular oligomers: Force spectroscopy of misfolded dimers in amyloid TTR oligomers,” *J Mol Recognit*, vol. 30, no. 3, p. e2587, Mar. 2017, doi: 10.1002/jmr.2587.
- [117] R. B. Best *et al.*, “Force mode atomic force microscopy as a tool for protein folding studies,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 479, no. 1, pp. 87–105, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0003-2670(02)01572-6.
- [118] S. P. Ng *et al.*, “Mechanical Unfolding of TNfn3: The Unfolding Pathway of a fnIII Domain Probed by Protein Engineering, AFM and MD Simulation,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 350, no. 4, pp. 776–789, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2005.04.070.
- [119] L. Li, H. H.-L. Huang, C. L. Badilla, and J. M. Fernandez, “Mechanical Unfolding Intermediates Observed by Single-molecule Force Spectroscopy in a Fibronectin Type III Module,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 345, no. 4, pp. 817–826, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2004.11.021.
- [120] J. Strzelecki, “AFM Force Spectroscopy and Steered Molecular Dynamics Simulation of Protein Contactin 4,” *Acta Phys. Pol. A*, vol. 116, no. Supplement, p. S-156-S-159, Dec. 2009, doi: 10.12693/APhysPolA.116.S-156.
- [121] E. Paci and M. Karplus, “Forced unfolding of fibronectin type 3 modules: an analysis by biased molecular dynamics simulations,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 288, no. 3, pp. 441–459, May 1999, doi: 10.1006/jmbi.1999.2670.
- [122] D. E. Shaw *et al.*, “Anton, a special-purpose machine for molecular dynamics simulation,” *Commun. ACM*, vol. 51, no. 7, pp. 91–97, Jul. 2008, doi: 10.1145/1364782.1364802.
- [123] M. Habibi, J. Rottler, and S. S. Plotkin, “As Simple As Possible, but Not Simpler: Exploring the Fidelity of Coarse-Grained Protein Models for Simulated Force Spectroscopy,” *PLoS Comput Biol*, vol. 12, no. 11, p. e1005211, Nov. 2016, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005211.
- [124] H. A. Lewis *et al.*, “Structure and Dynamics of NBD1 from CFTR Characterized Using Crystallography and Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 396, no. 2, pp. 406–430, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jmb.2009.11.051.
- [125] J. K. Noel *et al.*, “SMOG 2: A Versatile Software Package for Generating Structure-Based Models,” *PLoS Comput Biol*, vol. 12, no. 3, p. e1004794, Mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004794.
- [126] M. Habibi, J. Rottler, and S. S. Plotkin, “The unfolding mechanism of monomeric mutant SOD1 by simulated force spectroscopy,” *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, vol. 1865, no. 11 Pt B, pp. 1631–1642, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.06.009.
- [127] P. Larsson, B. Hess, and E. Lindahl, “Algorithm improvements for molecular dynamics simulations,” *WIREs Comput Mol Sci*, vol. 1, no. 1, pp. 93–108, Jan. 2011, doi: 10.1002/wcms.3.
- [128] R. B. Best, G. Hummer, and W. A. Eaton, “Native contacts determine protein folding mechanisms in atomistic simulations,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 44, pp. 17874–17879, Oct. 2013, doi: 10.1073/pnas.1311599110.
- [129] D. Mercadante, F. Gräter, and C. Daday, “CONAN: A Tool to Decode Dynamical Information from Molecular Interaction Maps,” *Biophys J*, vol. 114, no. 6, pp. 1267–1273, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.bpj.2018.01.033.

- [130] M. Ester, H.-P. Kriegel, J. Sander, and X. Xu, “A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise,” AAAI Press, 1996, pp. 226–231.
- [131] R. T. McGibbon *et al.*, “MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories,” *Biophysical Journal*, vol. 109, no. 8, pp. 1528–1532, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.bpj.2015.08.015.
- [132] P. M. Stasik, “Euclidean proximity function in image processing,” in *2016 Signal Processing: Algorithms, Architectures, Arrangements, and Applications (SPA)*, Poznan: IEEE, Sep. 2016, pp. 254–258. doi: 10.1109/SPA.2016.7763623.
- [133] F. Ding and N. V. Dokholyan, “Emergence of Protein Fold Families through Rational Design,” *PLoS Comput Biol*, vol. 2, no. 7, p. e85, Jul. 2006, doi: 10.1371/journal.pcbi.0020085.
- [134] L. Cui *et al.*, “The role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator phenylalanine 508 side chain in ion channel gating,” *J Physiol*, vol. 572, no. Pt 2, pp. 347–358, Apr. 2006, doi: 10.1113/jphysiol.2005.099457.
- [135] H. C. Kotamarthi, R. Sharma, and S. R. Koti Ainaravapu, “Single-molecule studies on PolySUMO proteins reveal their mechanical flexibility,” *Biophys J*, vol. 104, no. 10, pp. 2273–2281, May 2013, doi: 10.1016/j.bpj.2013.04.008.
- [136] R. Hertadi *et al.*, “Unfolding Mechanics of Multiple OspA Substructures Investigated with Single Molecule Force Spectroscopy,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 333, no. 5, pp. 993–1002, Nov. 2003, doi: 10.1016/j.jmb.2003.09.010.
- [137] M. Rabbi and P. E. Marszalek, “Measuring Protein Mechanics by Atomic Force Microscopy: Figure 1.,” *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2007, no. 12, p. pdb.prot4901, Dec. 2007, doi: 10.1101/pdb.prot4901.
- [138] F. Rico, A. Rigato, L. Picas, and S. Scheuring, “Mechanics of proteins with a focus on atomic force microscopy,” *J Nanobiotechnol*, vol. 11, no. Suppl 1, p. S3, 2013, doi: 10.1186/1477-3155-11-S1-S3.
- [139] C. Bustamante, J. Marko, E. Siggia, and S. Smith, “Entropic elasticity of lambda-phage DNA,” *Science*, vol. 265, no. 5178, pp. 1599–1600, Sep. 1994, doi: 10.1126/science.8079175.
- [140] H. Lu, B. Isralewitz, A. Krammer, V. Vogel, and K. Schulten, “Unfolding of Titin Immunoglobulin Domains by Steered Molecular Dynamics Simulation,” *Biophysical Journal*, vol. 75, no. 2, pp. 662–671, Aug. 1998, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77556-3.
- [141] H. Lu and K. Schulten, “The Key Event in Force-Induced Unfolding of Titin’s Immunoglobulin Domains,” *Biophysical Journal*, vol. 79, no. 1, pp. 51–65, Jul. 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76273-4.
- [142] M. Rief, J. Pascual, M. Saraste, and H. E. Gaub, “Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 286, no. 2, pp. 553–561, Feb. 1999, doi: 10.1006/jmbi.1998.2466.
- [143] H. Takahashi, F. Rico, C. Chipot, and S. Scheuring, “ α -Helix Unwinding as Force Buffer in Spectrins,” *ACS Nano*, vol. 12, no. 3, pp. 2719–2727, Mar. 2018, doi: 10.1021/acsnano.7b08973.
- [144] C. Clementi and S. S. Plotkin, “The effects of nonnative interactions on protein folding rates: Theory and simulation,” *Protein Sci.*, vol. 13, no. 7, pp. 1750–1766, Jul. 2004, doi: 10.1110/ps.03580104.
- [145] Q. Shao and W. Zhu, “Nonnative contact effects in protein folding,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 21, no. 22, pp. 11924–11936, 2019, doi: 10.1039/C8CP07524G.
- [146] R. Padányi *et al.*, “Nanomechanics combined with HDX reveals allosteric drug binding sites of CFTR NBD1,” *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 20, pp. 2587–2599, 2022, doi: 10.1016/j.csbj.2022.05.036.

Függelék

1. függelék táblázat

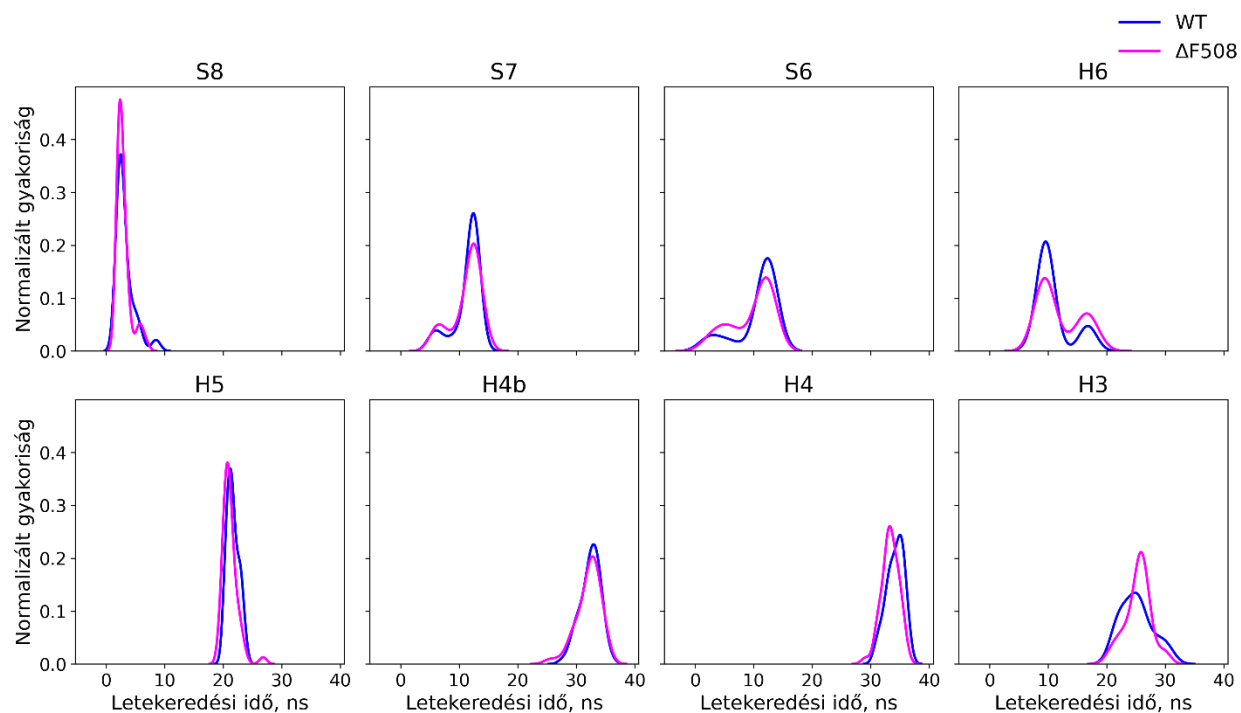
aa#	z-koord., Å	Ioncsatorna sugár, Å	Konduktancia befolyásolása*	Szerep a kapuzásban**
336	109	2.9	+	+
915	109	2.9		
337	108	2.7	+	+
322	108	2.7		
918	105	2.2		
102	104	2.2	+	
917	104	2.2		
319	103	2.4		
340	103	2.4	+	
99	102	2.6	+	+
318	101	2.5		
341	101	2.5	+	+
921	100	2.2		
922	100	2.2		
98	100	2.2	+	
315	99	2.2		
1138	98	2.4	+	
1137	98	2.4	+	
344	97	2.7	+	
96	97	2.7		
345	95	3.0	+	

A szűk keresztmetszeti régióban található aminosavak, melyek a CFTR kloridcsatorna külső és belső üregeit választják el. Aminosavak, melyek kísérleti tanulmányok szerint befolyásolják a CFTR kloridion-vezetőképességét (), illetve szerepük van az ioncsatorna nyitás-zárás (kapuzás) folyamatában (**), szintén fel vannak tüntetve.*

2. függelék táblázat

Régió	Állapot	Aminosav 1				Aminosav 2			
		aa# humán	aa humán	aa zebrahal	TM#	aa# humán	aa humán	aa zebrahal	TM#
2	zárt	303	R	R	5	352	R	R	6
	zárt	303	R	R	5	989	L	L	9
	zárt	307	S	S	5	352	R	R	6
	zárt	310	F	Y	5	352	R	R	6
	zárt	347	R	R	6	924	D	E	8
	zárt	348	M	M	6	352	R	R	6
	zárt	990	T	L	9	1152	D	A	12
	zárt	997	L	L	9	1145	W	W	12
	zárt	1001	V	V	9	1142	T	T	12
	nyitott	310	F	Y	5	347	R	R	6
	nyitott	311	F	F	5	1145	W	W	12
	nyitott	347	R	R	6	351	T	T	6
	nyitott	997	L	L	9	1145	W	W	12
	nyitott	997	L	L	9	1149	S	T	12
	nyitott	1140	M	L	12	1144	Q	Q	12
	nyitott	1145	W	W	12	1149	S	T	12
3	zárt	88	L	L	1	200	F	F	3
	zárt	146	H	HSD	2	192	D	D	3
	zárt	146	H	HSD	2	1089	W	W	11
	zárt	194	G	S	3	360	T	M	6
	zárt	197	L	M	3	356	W	M	6
	zárt	197	L	M	3	357	A	S	6
	zárt	197	L	M	3	360	T	M	6
	zárt	200	F	F	3	357	A	S	6
	zárt	1093	L	L	11	1097	R	R	11
	nyitott	143	F	F	2	1097	R	R	11
	nyitott	197	L	M	3	353	Q	Q	6
	nyitott	1041	K	K	10	1092	Y	Y	11
1	zárt	106	I	I	1	337	F	F	6
	zárt	318	V	I	5	340	I	L	6
	zárt	337	F	F	6	341	S	S	6
	nyitott	99	P	P	1	341	S	S	6
	nyitott	211	L	C	3	345	V	V	6
	nyitott	314	G	A	5	344	I	M	6
	nyitott	317	V	V	5	340	I	L	6
	nyitott	321	S	A	5	340	I	L	6
	nyitott	345	V	V	6	349	A	T	6
	nyitott	917	Y	Y	8	1134	T	C	12

A nyitott és zárt állapotokra jellemző aminosavkölcsonhatások területenként: szűk keresztmetszeti régió (1), a TM régió közepén elhelyezkedő (2) és intracelluláris oldalhoz közel eső (3) terület.



1. függelék ábra

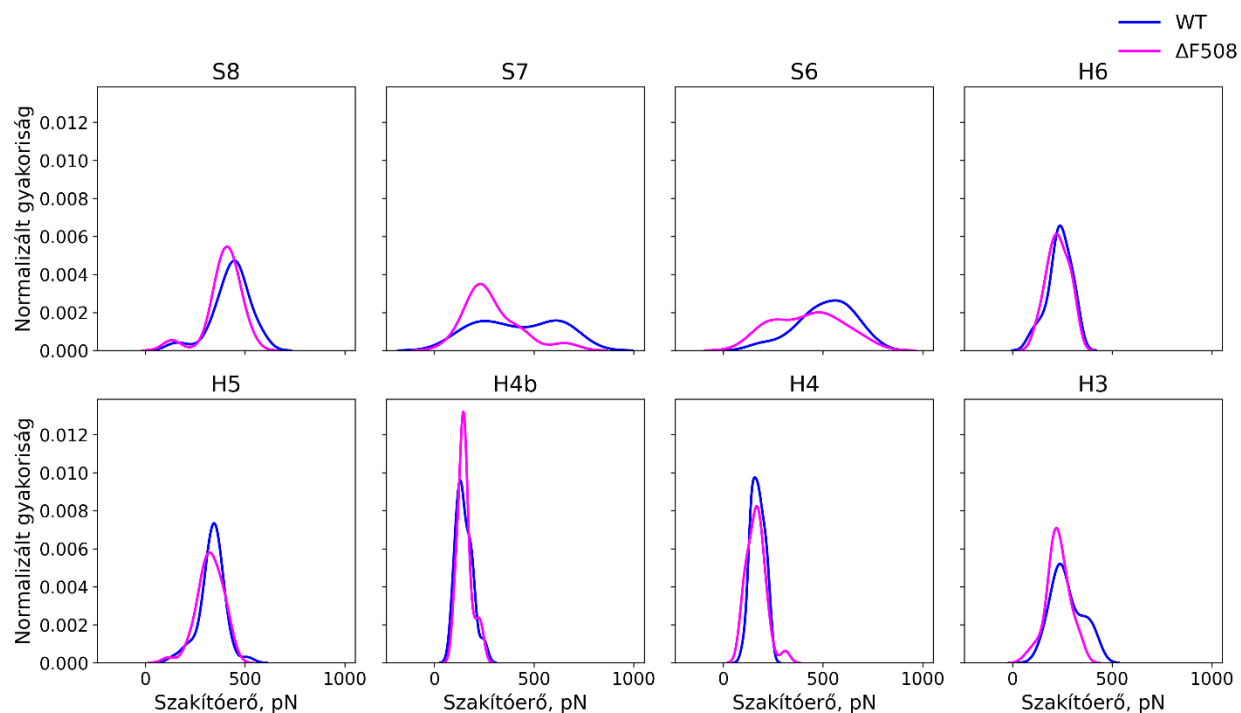
Letekeredési időpontok eloszlása (kde plot) a vad típus (WT) és mutáns ($\Delta F508$) S6- α -S8 core régióval végzett szimulációk esetén.

3. függelék táblázat

Letekeredési idők összehasonlítása

	n_W	n_{Δ}	D	p
S6	50	50	0.32	0.01
S7	50	50	0.18	0.40
S8	50	50	0.22	0.18
H3	50	50	0.20	0.27
H4	50	48	0.29	0.03
H4b	50	48	0.08	0.99
H5	50	50	0.28	0.04
H6	50	50	0.20	0.27

A táblázat mutatja a vad típus (WT) és mutáns ($\Delta F508$) S6- α -S8 core régió másodlagos szerkezeti elemenkénti letekeredési időkre számolt Kolmogorov-Smirnov (K-S) próba eredményét. n_W , n_{Δ} : elemszám a vad típus és a mutáns esetén; **D** és **p**: számolt K-S statisztika és p-érték.



2. függelék ábra

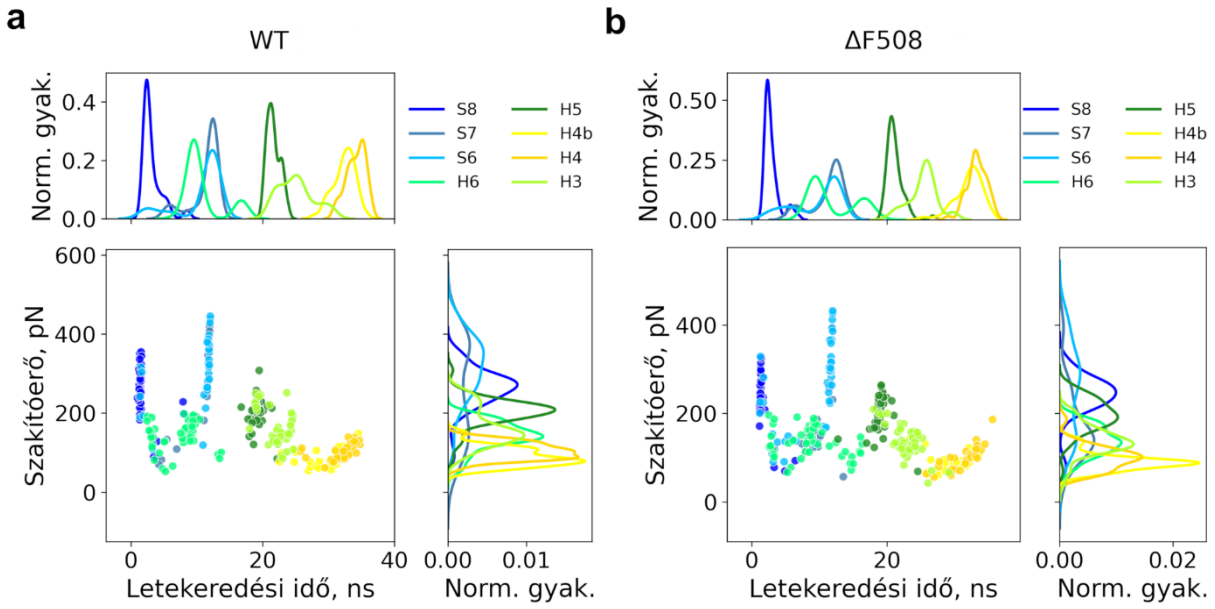
Szakítóerők eloszlása (kde plot) a vad típus (WT) és mutáns ($\Delta F508$) S6- α -S8 core régióval végzett szimulációk esetén.

4. függelék táblázat

Szakítóerők összehasonlítása

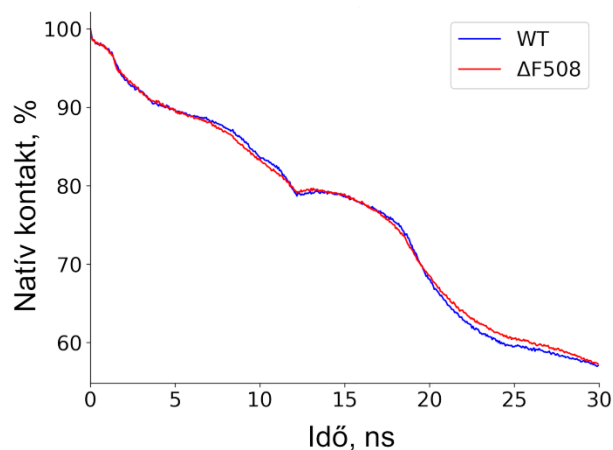
	n _w	n _{Δ}	D	p
S6	33	41	0.29	0.08
S7	18	15	0.38	0.15
S8	50	48	0.27	0.04
H3	37	43	0.29	0.06
H4	29	27	0.23	0.39
H4b	34	30	0.27	0.16
H5	43	44	0.20	0.31
H6	48	50	0.15	0.56

A táblázat mutatja a vad típus (WT) és mutáns ($\Delta F508$) S6- α -S8 core régió másodlagos szerkezeti elemenkénti szakítóerőkre számolt Kolmogorov-Smirnov (K-S) próba eredményét. n_w, n _{Δ} : elemszám a vad típus és a mutáns esetén; D, p: számolt K-S statisztika és p-érték.



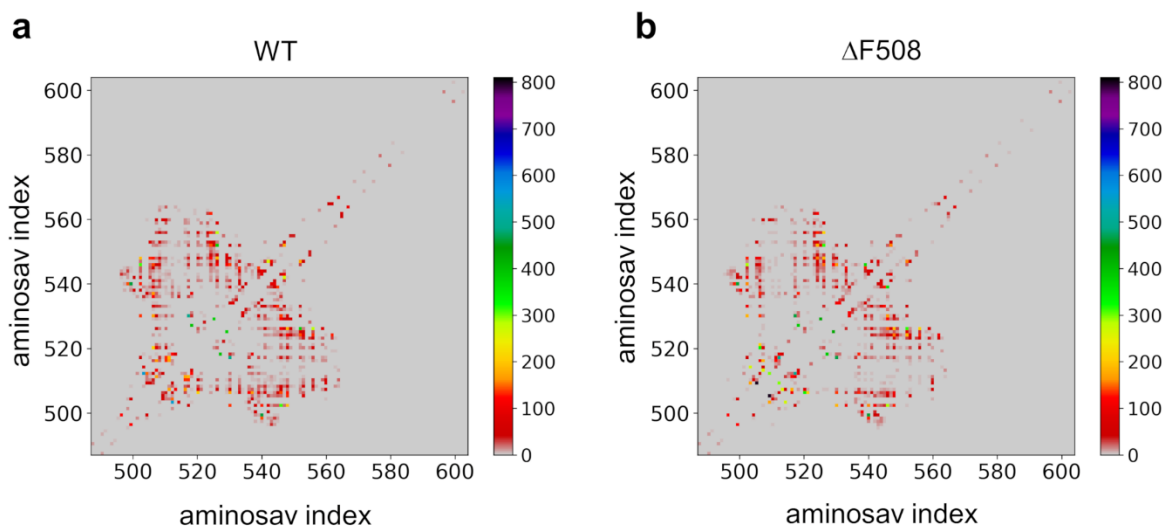
3. függelék ábra

Az S6- α -S8 core régióval végzett letekeredési szimulációkból ($n=50-50$) számolt másodlagos szerkezeti elemek letekeredési időpontjainak és a letekeredést jellemző szakítóerők ábrázolása, valamint ezek eloszlása (kde görbék) a (a) vad típus és a (b) $\Delta F508$ mutáns konstrukciók esetén.



5. függelék ábra

Az S6- α -S8 core régióval végzett letékeredési szimulációkból ($n=50-50$) számolt natív kontaktok aránya a vad típus (WT) és a $\Delta F508$ esetén.



4. függelék ábra

Nem-natív kölcsönhatások jellemzése páronkénti közelségértékek számításával. Az S6- α -S8 core régióval végzett letékeredési szimulációkból ($n=50-50$) számolt, a (a) vad típus és a (b) $\Delta F508$ mutáns szimulációk esetén összegzett páronkénti közelségértékek. Az értékeket a szimulációk 18-25 ns időintervallumán számoltuk ki.

5. függelék táblázat

WT				$\Delta F508$				$\Delta F508$ -WT		
aa	aa#	proximity	nem-natív	aa	aa#	proximity	nem-natív	aa	aa#	proximity
I	506	1460		I	546	1511		G	509	945
L	526	1443		I	506	1476		F	508	-665
I	530	1389		Y	517	1379		N	505	649
I	546	1257		G	509	1367	+	V	510	-512
Y	517	1196		I	530	1335		T	547	-320
L	548	1180		L	526	1325		S	511	-297
Y	512	1142		I	502	1182		I	546	254
V	540	1107		N	505	1128	+	G	542	-228
I	502	1041		Y	512	1049		I	539	220
Q	552	1035		V	540	1023		K	503	-219
I	507	995		C	524	1014		L	548	-215
T	547	941		L	548	965		E	514	213
C	524	846		Q	552	922		I	556	-206
R	518	772		I	539	868		E	504	-201
D	529	762		I	507	808		K	536	-195
I	556	753		P	499	778		I	507	-186
V	510	721	+	R	518	759		Y	517	183
K	503	701	+	V	520	717		C	524	167
P	499	689		D	529	698		I	521	153
V	520	668		Q	525	697		I	502	141
F	508	665	+	T	547	621		D	513	138
F	533	665		F	533	611		R	516	-135
S	511	659	+	I	556	547		A	523	124
I	539	649		L	541	504	+	L	526	-118
Q	525	633						Q	552	-113
R	516	626	+					R	553	-109
G	542	556	+					E	543	-100
G	545	528	+							
R	553	509	+							

A letekeredés során megfigyelt jellemző nem-natív kontaktusok az S6- α -S8 core MD szimulációk esetén. A vad típus (WT) és a $\Delta F508$ mutáns S6- α -S8 core magas (>500) közelségértékű aminosavai a szimulációkból. A nem-natív kölcsönhatások kialakításában részt vevő aminosavakat '+' karakter jelöli. Továbbá azok az aminosavak, amelyeknél a mutáns és a vad típus közelség-különbségének abszolút értéke egy küszöbérték felett van: abs(közelség-különbség) > 100.