

A CFTR kloridcsatorna vizsgálata molekula dinamikai szimulációk segítségével

A PhD Disszertáció Tézisei



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 háttérében 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 kloridútvonala 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 háttérének *in silico* módszerekkel történő vizsgálatára. Az itt bemutatott munka során molekula dinamikai szimulációk segítségével meghatároztuk a CFTR ioncsatorna kloridion áteresztésére alkalmas útvonala. 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.

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

1.1. 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 [1]. 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 [2]. Ezek azonban jelentősen eltérnek az ismert ABC fehérjeszerkezetektől [3]. Mások molekula dinamikai 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 [4], illetve egy másik publikáció a CFTR lipidekkel kialakított kölcsönhatásairól számol be [5]. 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 [6]. 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 [6]), 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 [6]–

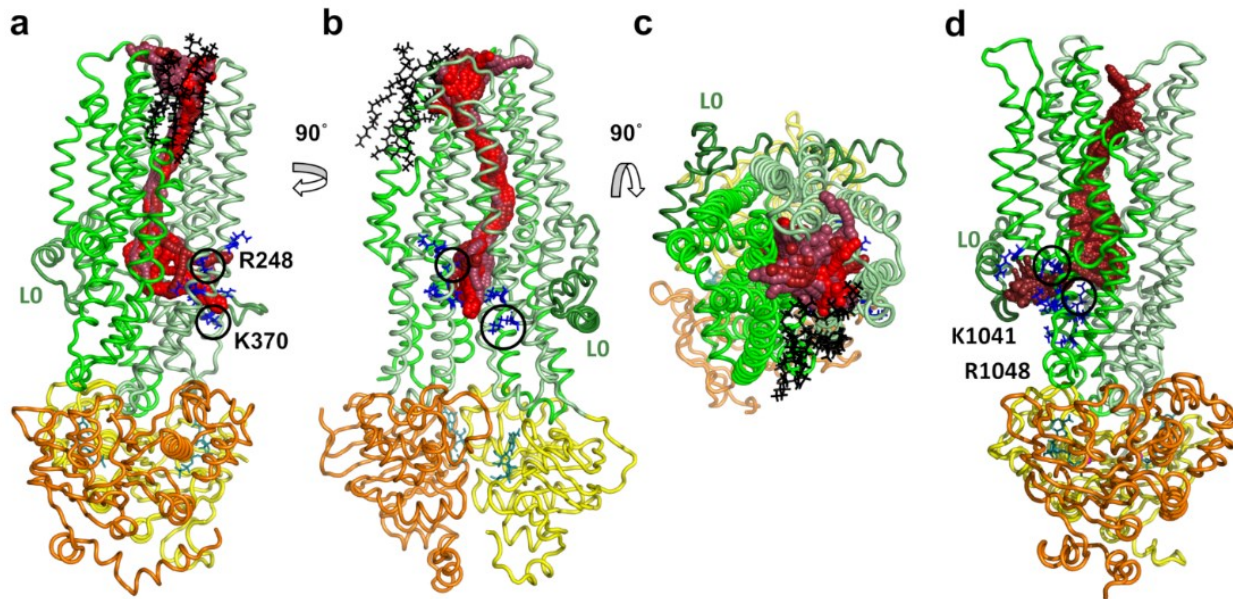
[9]. A krio-EM CFTR szerkezetekben megfigyelt szokatlan tulajdonságok azonban okozhatják a kloridcsatorna zárt állapotát eme térszerkezetek esetén. A TM7 és TM8 ioncsatorna-nyitásra gyakorolt hatásának vizsgálata céljából egy közeli CFTR rokon fehérje (MRP1) szerkezete alapján homológiamodellezéssel 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.

1.2. Eredmények ismertetése

A disszertáció első felében a CFTR-kloridvezetés szerkezeti hátterének vizsgálatával, a kloridionok áteresztésére alkalmas ioncsatorna atomi szintű feltérképezésével és jellemzésével kapcsolatos eredményeket mutatom 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.

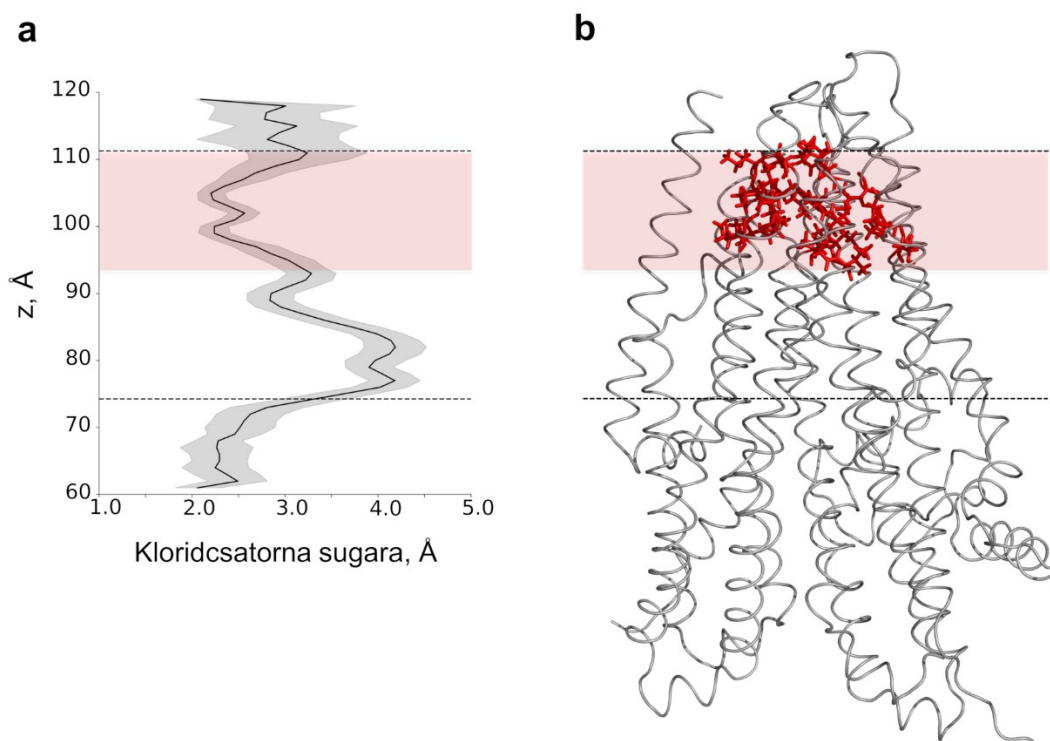
A CFTR szerkezeti sokaságban a nyitott szerkezetek esetén két intracelluláris bemeneti pórust is megfigyeltünk (TM4/6 és TM10/12), melyeket pozitív töltésű aminosavak vesznek körül. Ezeknek fontos szerepe lehet a negatív töltésű kloridionok elektrosztatikus vonzásában. A szimulációk során a kedvező elektrosztatikus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



1. ábra – A konformációs sokaságban detektált kloridion-útvonalt két belépési ponttal rendelkezik az intracelluláris oldalon. A kloridvezetésre alkalmas útvonalat az ATP-hez kötött CFTR-szerkezettel (PDB ID: 5w81) végzett 22 egyensúlyi szimulációból egy trajektóriában sikerült azonosítani. A legjobb pontszámot elért útvonalat az ionsatornát bélelő aminosavak helyzete alapján csoportosítottuk. Piros színű gyöngyök reprezentálják a Caver program segítségével azonosított útvonalat. 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) oldalnézetet a lipid kettősréteg síkjából, és a (c) felülnézetet az extracelluláris tér irányából.

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

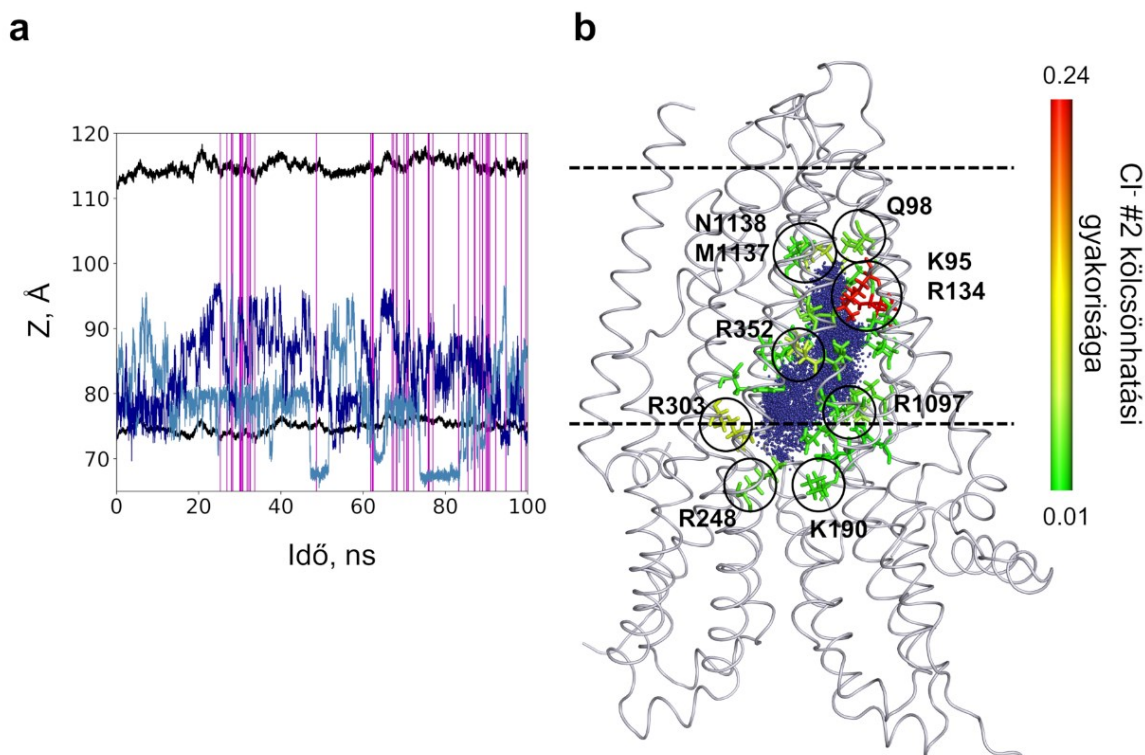
Közvetlenül az ioncsatorna bemeneti szakaszán alacsony ioncsatorna-sugárértékeket figyeltünk meg, ami arra utal, hogy az ioncsatorna-szubsztrát méretét ez a bemeneti régió jelentősen korlátozza. A szimulációk során a citoszolikus bemeneti pórusok körüli kloridion-kölcsönhatási helyeket határoztunk meg. 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.



2. 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 $r=4$ Å), míg a citoszolikus régióban, valamint az extracelluláris oldali membrán réteg magasságában lévő szűk keresztmetszetű szakaszok 2-2,5 Å 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 ioncsatornaalkotó aminosavakat piros pálcikák jelölik.

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

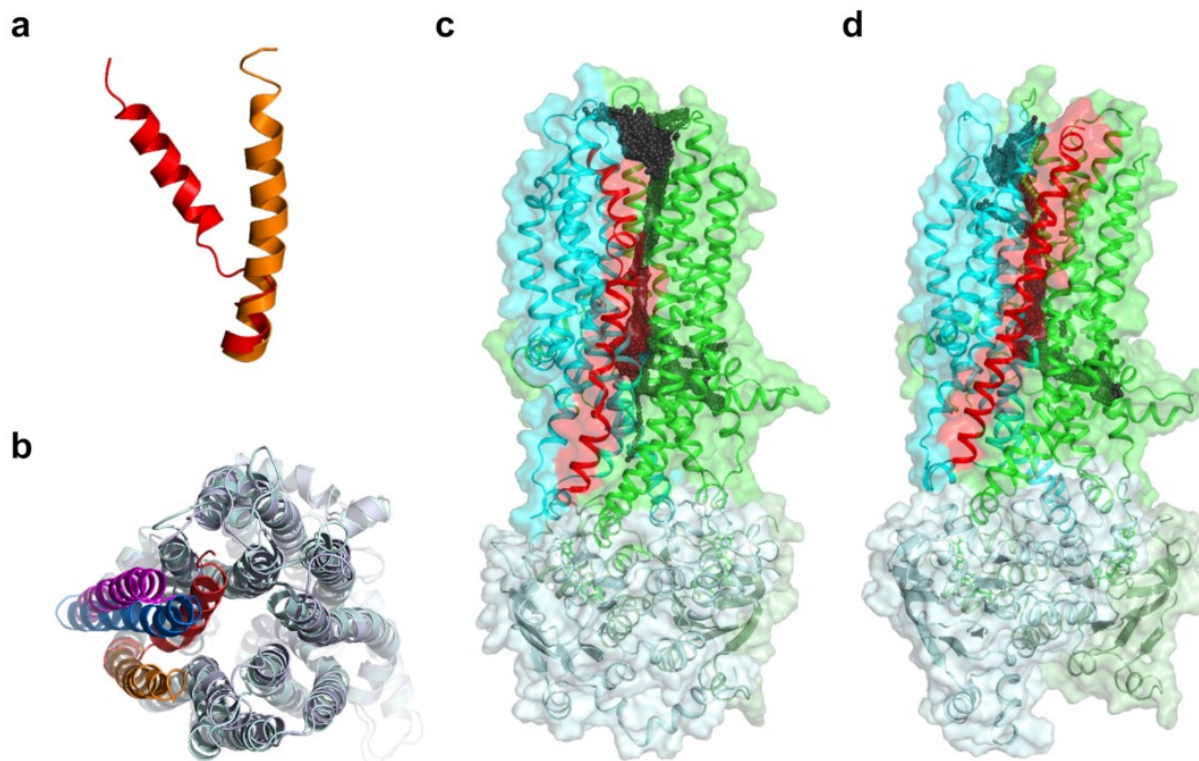
A kloridion-útvonal szűk keresztmetszeti régiójában jellemzően hidrofób aminosavak helyezkednek el. Az ioncsatorna átmérője ebben a régióban a nyitott konformációkban csak kismértékben haladta meg a kloridion méretét. Emellett, az egyensúlyi szimulációk során nem figyeltünk meg spontán ionátjutást, a 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.



3. ábra – Az egyensúlyi szimulációk során a kloridionok bejutottak az ioncsatornába, de nem haladtak át a membrán régión. (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 vetítettem (pálcika jelölésű aminosavak), zöldtől (alacsony) pirosig (magas) szinkódoltam. A legmagasabb kölcsönhatási frekvenciájú aminosavak a K95 és az R134 (piros).

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.



4. ábra – A kiegyenesített TM8 gyakoribb ioncsatorna-nyitást eredményez a szimulációkban, valamint az ioncsatorna sem nyitott a lipidmolekulák felé az extracelluláris oldalon. A (a) megtört TM8 a zebrahal szerkezetben (piros) és az egyenes TM8 az MRP1 szerkezetén alapuló homológiamodell (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 homológiamodell (halványlila) szerkezeteknek (TMD1-2). CFTR TM8 (piros) és TM7 (magenta), homológiamodell TM8 (narancssárga) és TM7 (kék).

Kapcsolódó publikációk: J1, J2

2. A CFTR kloridcsatorna NBD1 domén mechanikai letekeredésének vizsgálata

2.1. 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 ($\Delta F508$). A $\Delta F508$ mutáció a fehérje érése során rossz irányba tereli az NBD1 feltekeredését, melynek következtében a termelt fehérje jelentős mennyisége degradálódik [10], [11]. Kisebb hányada eljuthat ugyan a sejtmembránba, azonban a mutáció a hibás feltekeredés mellett a CFTR funkcióját és stabilitását is csökkenti [12]. A jelenleg használatban lévő, a CFTR funkcionális expresszióját helyreállító gyógyszerek hosszútávú hatékonysága még kétséges [13]–[15]. Az alkalmazott vegyületek többnyire az érett, sejtmembránba kijutott fehérjék stabilizálását célozzák, azonban a fehérjék nem megfelelő feltekeredése esetén nem nyújtanak tökéletes megoldást. A mutációk ezen típusa esetén a terápiás hatékonyság fokozását a fehérje feltekeredésébe beavatkozva, a helyes szerkezetkialakítás támogatásán keresztül lehetne elérni. Hatékony vegyületek tervezéséhez azonban elengedhetetlen a CFTR szerkezetének és dinamikájának atomi szintű ismerete, valamint az NBD1 feltekeredésének részletes leírása.

Korábbi tanulmányok vizsgálták az NBD1 feltekeredését [16]–[19], 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 [20], [21]. A $\Delta F508$ 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.

Erőspektroszkópai módszerek alkalmazásával sikeresen vizsgálták már fehérjék mechanikai letekeredését, a letekeredési erővel szemben mutatott ellenállását [22]–[25]. Ezért csoportunk atomerő-mikroszkóp (AFM) kísérletekkel tanulmányozta az NBD1 letekeredését. Habár ezek a kísérletek valósághoz közeli adatokat szolgáltatnak, sokszor nehezen értelmezhetőek és felbontásuk is alacsony. Ezek a problémák kiküszöbölhetőek irányított molekula dinamikai szimulációk alkalmazásával. A módszer előnye, hogy az erőspektroszkópai 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 [26], [27]. Így a kísérletekhez képest nagyobb felbontásban, pontosabban leírhatók 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, szerkezet alapú Gō modellt [28] alkalmazva vizsgáltuk az NBD1 letekeredését. Az egyszerűsített modellre az NBD1 méretéből (~205 aminosav) adódóan volt szükségünk.

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 kialakulásához. Mások spektroszkópai 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 *foldings* helyes irányba történő terelésében. 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 [16]–[18], [29], [30]. A *foldings* 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 *foldings* folyamatát vizsgáló kutatások eredményei arra utalnak, hogy ezt az illeszkedést az α -alegység gyors feltekeredése, illetve nem megfelelő kölcsönhatások kialakítása gátolhatja [17], [18].

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. Azért, hogy pontosabban jellemezhesük az F508 aminosav *S6- α -S8 core* régióra kiterjedő hatását, nehéz atomokra kiterjedő, explicit víz molekulák jelenlétében végzett 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 $\Delta F508$ 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 az NBD1 feltekeredésére. Mivel a BIA stabilizálta az NBD1-et a termikus letekeredéssel szemben [31], 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.

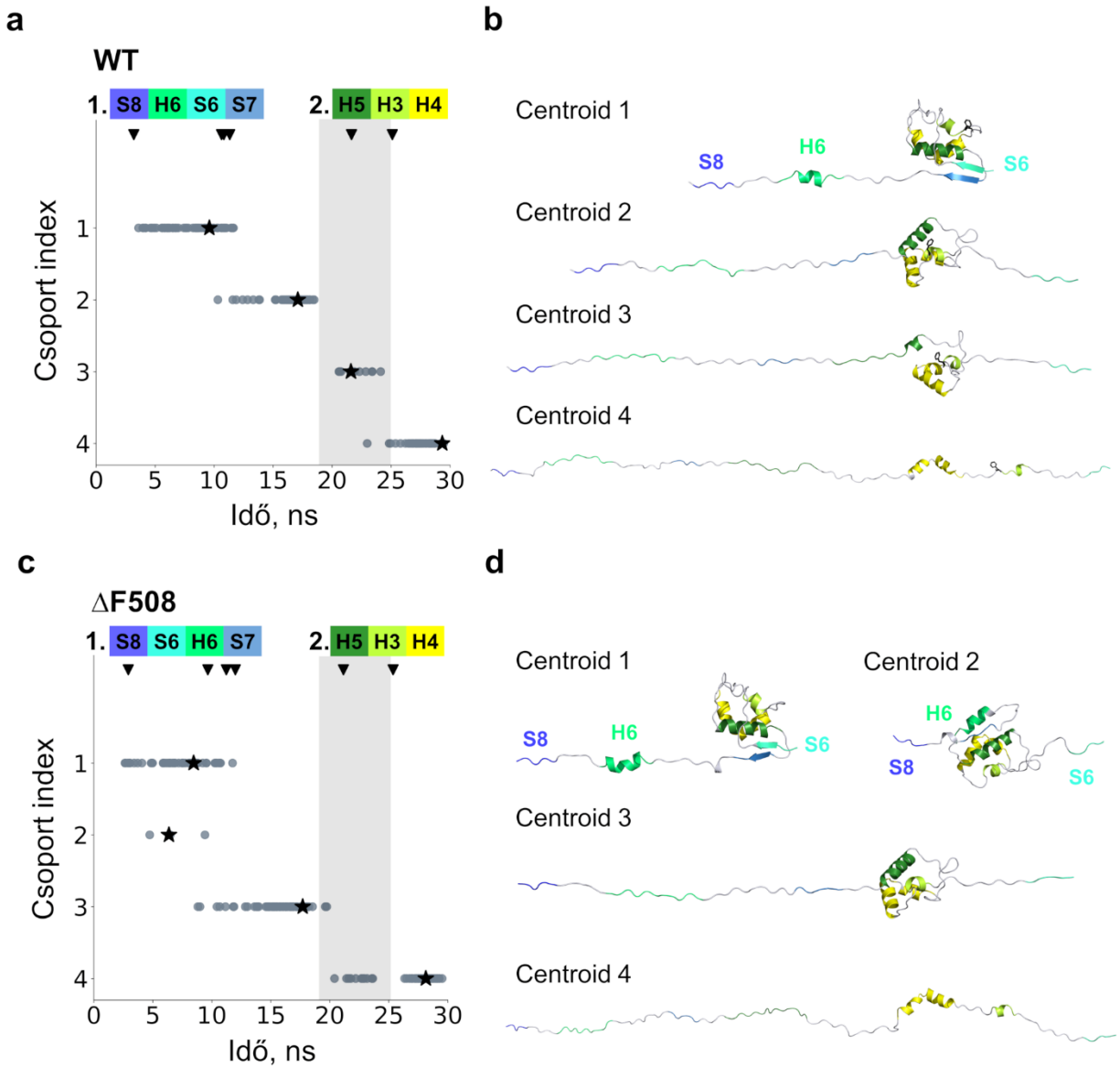
2.2. Eredmények ismertetése

A disszertáció második felében a CFTR kloridcsatorna NBD1 domén mechanikai letekeredésének vizsgálatával kapott eredményeket mutatom be. Csoportunk erőspektroszkópiái (AFM) kísérleteihez hasonlóan, azonban nagyobb felbontásban, irányított (letekeredési) 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 F508 aminosav *S6- α -S8 core* régióra kiterjedő hatásának vizsgálata céljából 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 intermediér szerkezetek stabilizálásában. Továbbá, az erőspektroszkópiái 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.

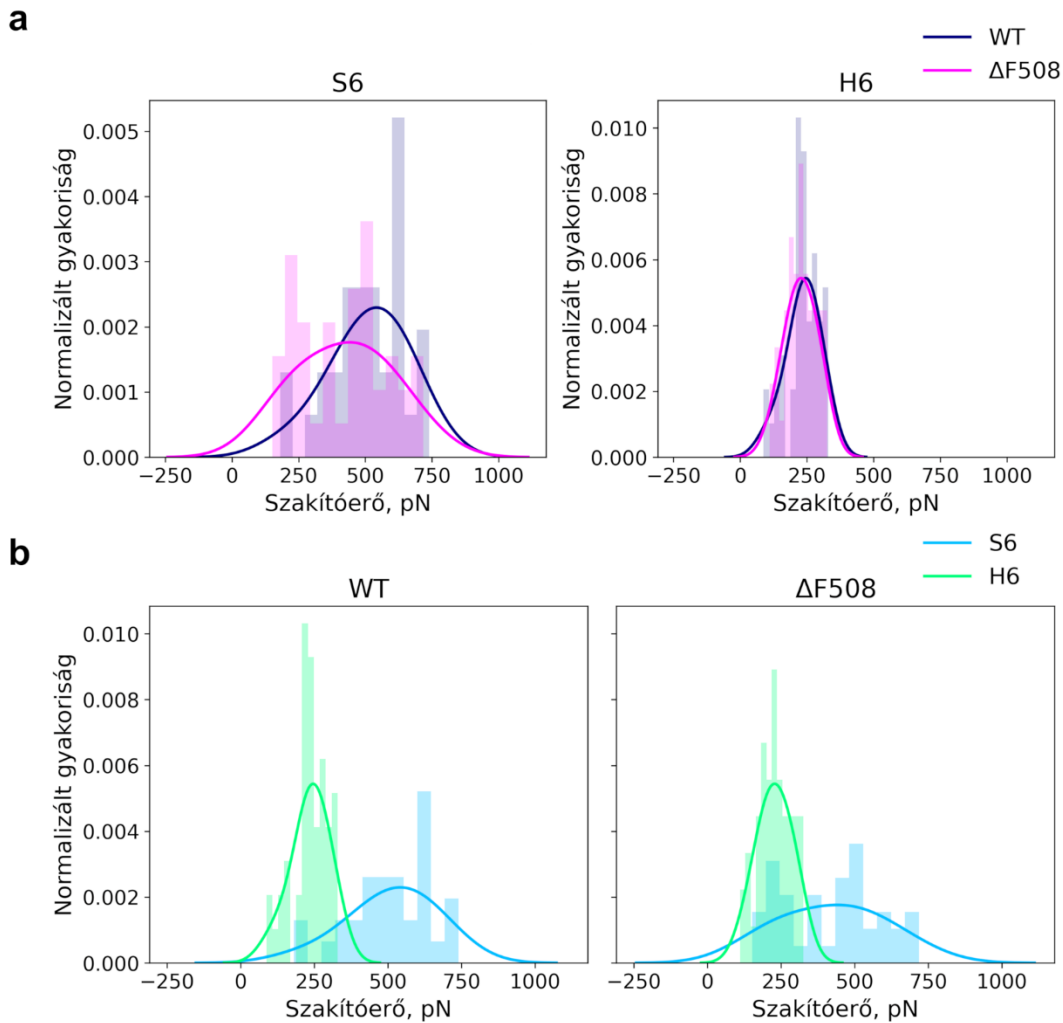
Tézis II.1. A Δ F508 mutáns *S6- α -S8 core* régióban az F508 aminosav hiánya az *S6 β -redő* egy kisebb mértékű meggyengülését okozza letekeredési molekula dinamikai szimulációk során.

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 $\Delta F508$ mutánst a mechanikai letékeredés során.



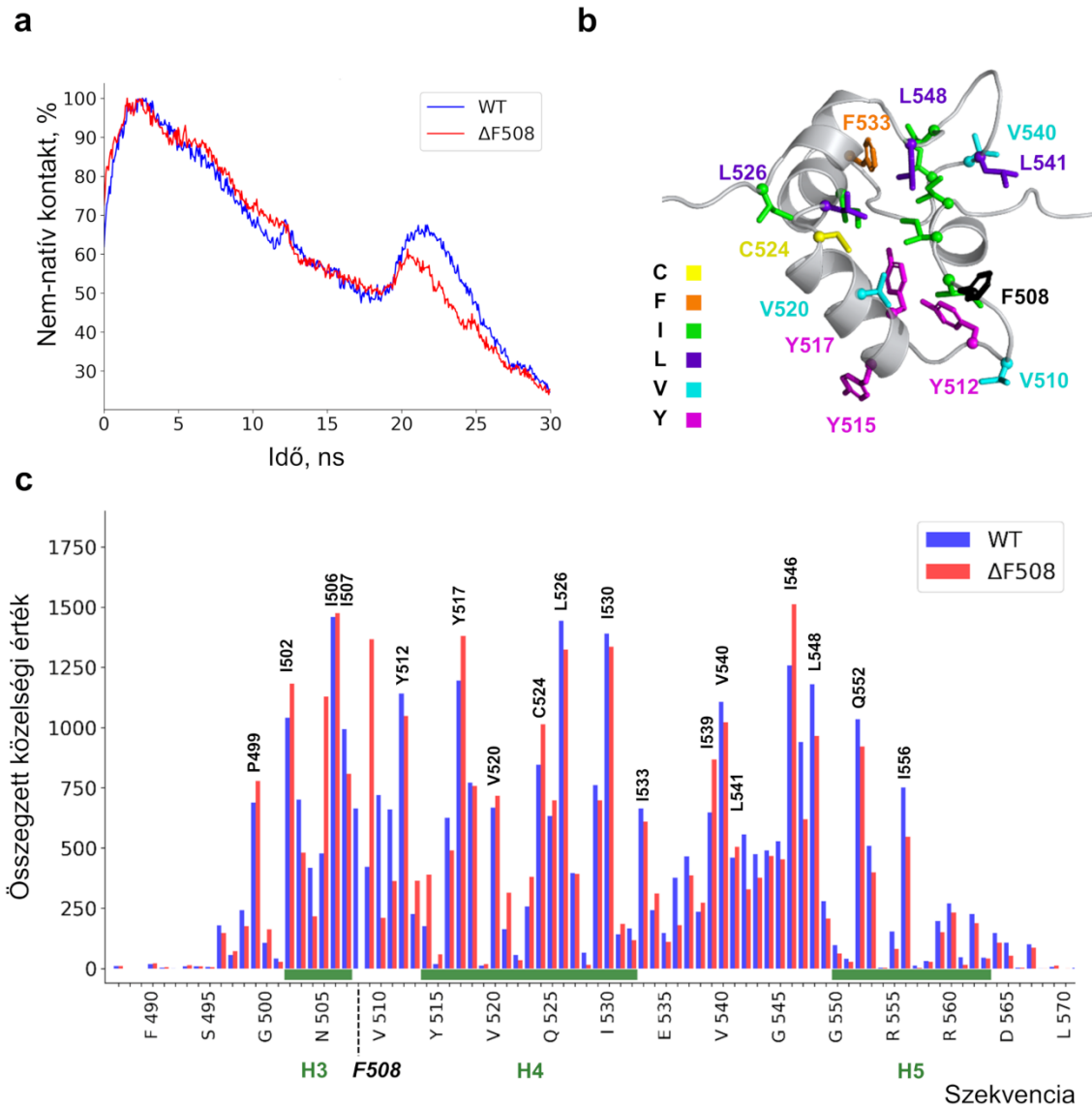
5. ábra – Különböző szerkezeti csoportok jellemzők a vad típus és a $\Delta F508$ mutáns S6- α -S8 core régió letékeredésére. A (a) vad típus (WT) és a (c) $\Delta F508$ mutáns szimulációkból származó köztes szerkezeteket a kontakt RMSD mint páros távolsági metrika segítségével klasztereztük. Az eredményül 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 számított átlagos letékeredési időpontjait.



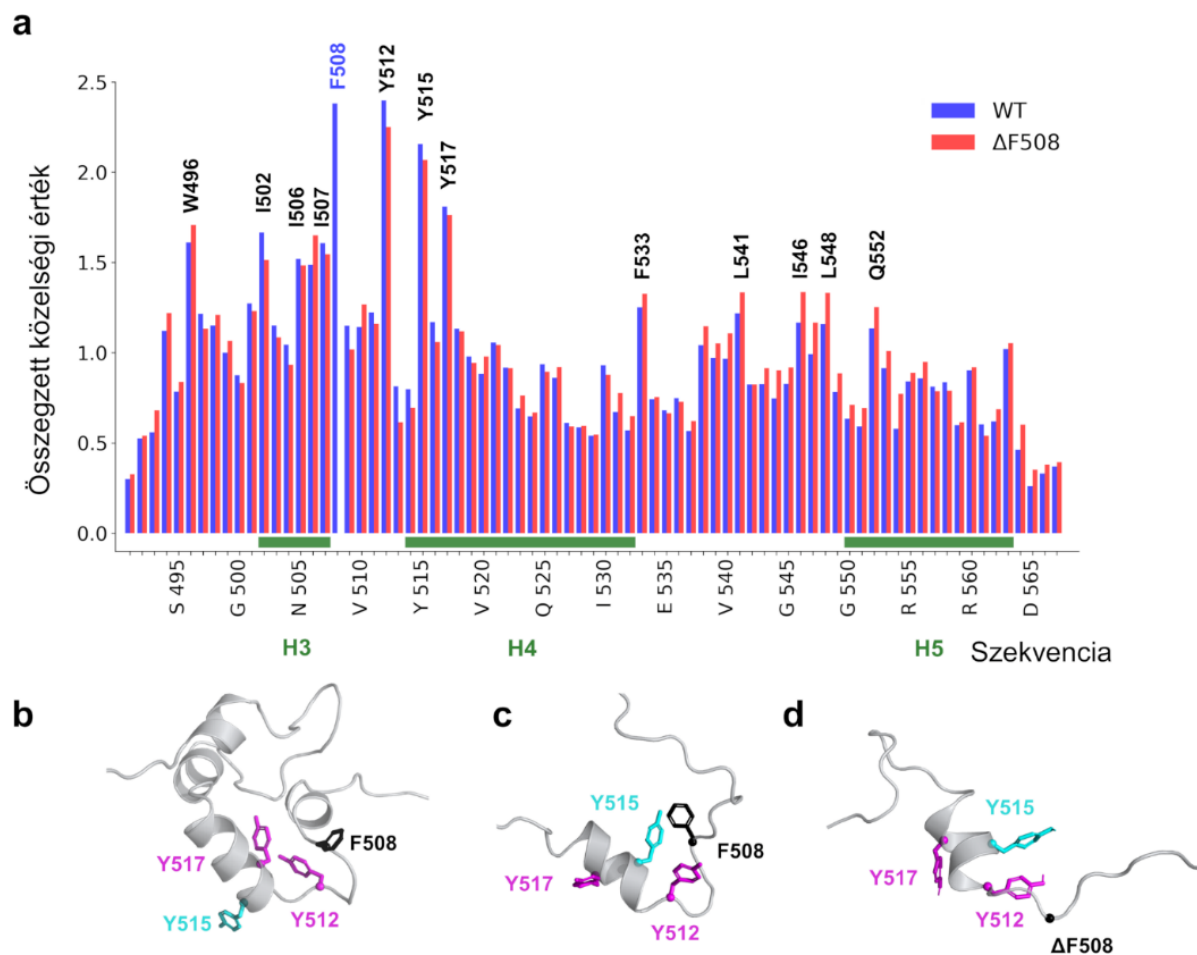
6. ábra – A $\Delta F508$ mutáns esetén az S6 β -redő kisebb erő hatására levált a letekeredések egy része során, míg a H6 α -hélix szakítóerők eloszlása nem különbözött. A vad típus (WT) és a mutáns ($\Delta F508$) S6- α -S8 core régióval végzett AA-MD szimulációkból számolt szakítóerők eloszlása az 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.

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 mutánsal 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.



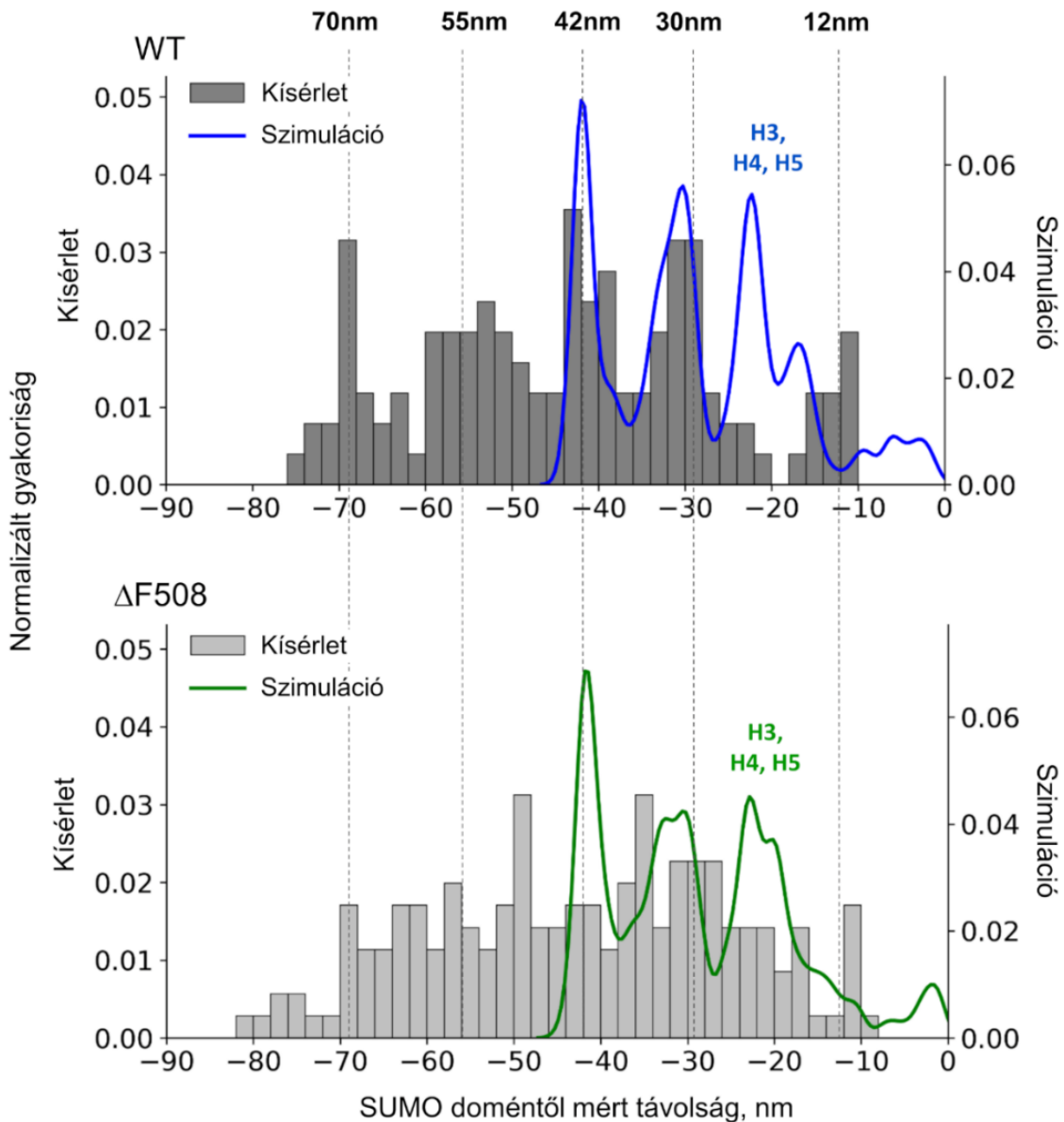
7. ábra – Megnövekedett számú nem-natív kölcsönhatás jellemző a vad típus S6-a-S8 core régió letekeredésére. A szimulációk során kapott (a) nem-natív kontaktok aránya a vad típus (WT) és a $\Delta F508$ mutáns esetén ($n=50-50$). A nem-natív kontaktok aránya a 18-25 ns időszámban mindkét peptid konstrukció 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.



8. ábra – Az F508 és környezete lokális kölcsönhatásokat alakít ki a REX-DMD folding szimulációk során. (a) A REX-DMD (replikacsere diszkrét molekula dinamika) 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 eredményezi, ami kedvezőtlenül befolyásolhatja az NBD1 feltekeredését.

Tézis II.3. A $\Delta F508$ mutáció elsősorban az NBD1 helyes feltekeredését akadályozza meg.

A csoportunk által végzett kísérletek eredménye azt mutatta, hogy a vad típus és a $\Delta F508$ mutáns esetén eltérő letekeredési mintázat jellemző. 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. Ennek feloldása érdekében letekeredési molekula dinamikai szimulációkat végeztünk a vad típusú és a $\Delta F508$ 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 $\Delta F508$ mutáns kísérleti letekeredési mintázata viszont jelentősen eltért a $\Delta F508$ mutáns szimulációs letekeredési mintázattól. A két módszer által kapott eredmény közötti eltérést a $\Delta F508$ 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 $\Delta F508$ 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 $\Delta F508$ mutánshoz képest (WT: 56%, $\Delta F508$: 28%). Továbbá a BIA molekula jelenlétében végzett AFM kísérleteink is azt mutatják, hogy a BIA növeli a $\Delta F508$ -NBD1 mechanikai letekeredéssel szembeni ellenállását és nagymértékben stabilizálja az α -alegységet.



9. ábra – A vad típus *S6- α -S8* core szimulációs és kísérleti adat-erőgörbékből meghatározott kontúrhossz-növekedés eloszlások (Δk) között nagymértékű a hasonlóság. A hisztogramok a referencia ponttól számolt (SUMO domén letekeredési eseménytől mért) kísérleti kontúrhossz-növekedéseket (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 - $\Delta F508$).

Kapcsolódó publikáció: J3

3. Összefoglalás

Molekula dinamikai szimulációink lehetővé tették a CFTR kloridcsatorna kloridion-útvonalának atomi szintű jellemzését, valamint a CFTR NBD1 domén letekeredésének szintén atomi részletességű vizsgálatát, melyek kísérleti módszerekkel rendkívül nehezen és csupán alacsony felbontással vizsgálhatók. A dolgozatomban bemutatott eredmények azt mutatják, hogy a számításon és kísérleti módszerek kombinálása, összehasonlítása segítheti molekuláris szintű biológiai folyamatok megértését.

A kloridútvonal feltérképezése során kapott, a szerkezetre vonatkozó atomi szintű eredmények hozzájárulhatnak a CFTR fehérje funkcióját vizsgáló kísérletek eredményeinek értelmezéséhez. Emellett hasznos adatokkal szolgálhatnak a kloridcsatorna működését gátló mutációk hatásmechanizmusának megértéséhez és ezek helyreállítását célzó vegyületek fejlesztéséhez.

Az NBD1 kísérleti és szimulációs módszerek kombinálásával történő vizsgálata lehetővé tette számunkra a $\Delta F508$ mutáció hatásának atomi szintű jellemzését. Az eredményeink azt mutatják, hogy a feltekeredés során a $\Delta F508$ mutáció kedvezőtlen intramolekuláris kölcsönhatások kialakulásához vezet, ami az NBD1 α -alegységének csökkent stabilitását eredményezi. Ez a jelenség felhasználható korrekciós hatóanyagok tervezéséhez. Továbbá megállapítottuk, hogy az α -alegység potenciális célpontja lehet allostérikus hatású kis molekuláknak, melyek alkalmasak lehetnek a $\Delta F508$ és más NBD1 domént destabilizáló mutációk hatásának ellensúlyozására.

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)

Irodalomjegyzék

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] S. Chin *et al.*, “Lipid interactions enhance activation and potentiation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR),” *bioRxiv*, Dec. 2018, doi: 10.1101/495010.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.

- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] W. M. Rabeh *et al.*, “Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore Δ F508 CFTR folding and function,” *Cell*, vol. 148, no. 1–2, pp. 150–163, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2011.11.024.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] R. A. Bartoszewski *et al.*, “A synonymous single nucleotide polymorphism in Δ F508 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.
- [30] 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.
- [31] 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.