

# A nukleotidkötő domének kölcsönhatásainak szerepe a CFTR ioncsatorna kapuzásában

Doktori értekezés

**Dr. Mihályi Csaba**

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Czirják Gábor, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Mike Árpád, Ph.D.,  
tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Geiszt Miklós, az MTA doktora,  
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Homolya László, az MTA doktora,  
tudományos főmunkatárs  
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2017

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Bevezetés.....</b>	<b>6</b>
1.1 A CFTR élettani és kórélettani szerepe.....	6
1.2 A CFTR szerkezete és működése .....	7
1.2.1 A nukleotidkötő domének szerkezete .....	9
1.2.2 A transzmembrán domének szerkezete .....	13
1.2.3 A regulációs domén és a foszforilációfüggő szabályozás.....	18
1.2.4 Az ATP-függő kapuzási ciklus .....	21
<b>2 Célkitűzések .....</b>	<b>29</b>
2.1 A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata .....	29
2.2 A degenerált ATP-kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltásainak vizsgálata.....	29
<b>3 Módszerek .....</b>	<b>30</b>
3.1 Molekuláris biológia .....	30
3.2 Elektrofiziológia .....	30
3.2.1 <i>Xenopus laevis</i> petesejtek preparálása és injektálása .....	30
3.2.2 Izolált membrános inside-out patch clamp mérések .....	30
3.3 Adatelemzés .....	32
3.3.1 Makroszkópos mérések kiértékelése .....	32
3.3.1.1 Áramlecsengések exponenciális illesztése.....	32
3.3.1.2 Feszültség-áram diagramok illesztése a Goldman-Hodgkin-Katz egyenlettel.....	32
3.3.1.3 Koncentráció-hatás diagramok illesztése a Michaelis-Menten egyenlettel .....	33
3.3.2 Steady-state mikroszkópikus mérések kinetikai elemzése.....	33
3.3.3 Egyedi-csatornás mérések burst időtartam eloszlásainak elemzése...	33
3.3.4 Termodinamikai mutáns ciklus analízis.....	34
3.3.5 Statisztika .....	36

<b>4</b>	<b>Eredmények .....</b>	<b>37</b>
4.1	A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata .....	37
4.1.1	A funkciónyeréssel járó mutációk lehetővé teszik a CFTR spontán kapuzásának kvantitatív elemzését .....	37
4.1.2	A 2-es ATP-kötőhely szorosan dimerizált a csatorna spontán nyitott állapotában .....	39
4.1.3	A 2-es ATP-kötőhely már az átmeneti állapotban is szorosan dimerizált a csatorna spontán megnyílásakor .....	43
4.2	A degenerált ATP-kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltozásainak vizsgálata.....	44
4.2.1	A P-ATP nagy affinitású ATP analóg, amely megnyújtja a steady-state burst időtartamát.....	44
4.2.2	A H1348A CFTR steady-state burst időtartama független az ATP koncentrációtól.....	45
4.2.3	A P-ATP és a H1348A mutáció csökkentik a nem-hidrolitikus záródási sebességet.....	46
4.2.4	A hidrolitikus záródást az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP lassítja.....	48
4.2.5	A nem-hidrolitikus záródást az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP lassítja.....	50
4.2.6	A P-ATP és a H1348A mutáció nem változtatják meg az egy burst-re eső ATP kötések számát.....	52
4.2.7	A P-ATP és a H1348A mutáció az $O_1 \rightarrow O_2$ átmenet lassítása révén nyújtják meg a burst időtartamát.....	55
<b>5</b>	<b>Megbeszélés .....</b>	<b>58</b>
5.1	A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata .....	58
5.1.1	A spontán pórusmegnyílások mechanizmusa megerősíti, hogy a CFTR ATP-függő kapuzása nem követi a mikroszkópikus reverzibilitás elvét .....	58
5.1.2	A funkciónyeréssel járó mutációk eltérő mértékben stabilizálják az átmeneti és a nyitott állapotot .....	61
5.1.3	A kötött ATP-k eltérő mértékben stabilizálják az átmeneti és a nyitott állapotot.....	62

5.2	A degenerált ATP-kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltozásainak vizsgálata.....	63
5.3	A kompozit kötőhelyek szerepe a CFTR kapuzásában.....	68
<b>6</b>	<b>Következtetések .....</b>	<b>74</b>
6.1	A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata .....	74
6.2	A degenerált ATP-kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltozásainak vizsgálata.....	74
<b>7</b>	<b>Összefoglalás .....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>78</b>
<b>10</b>	<b>Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>101</b>
10.1	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	101
10.2	Egyéb közlemények .....	101
<b>11</b>	<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>102</b>
	<b>Ábrajegyzék .....</b>	<b>103</b>

## Rövidítések jegyzéke

$\tau_b$	átlagos burst-hossz
$\tau_{ib}$	átlagos interburst-hossz
ABC	ATP kötő kazetta (ATP binding cassette)
ADP	adenozin-5'-difoszfát
AMP	adenozin-5'-monofoszfát
AMP-PCP	$\beta,\gamma$ -metilénadenozin 5'-trifoszfát
AMP-PNP	adenozin 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)-trifoszfát
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
ATP $\gamma$ S	adenozin-5'-( $\gamma$ -tio)-trifoszfát
B	blokkolt (blocked)
BeF <sub>3</sub>	berilium-trifluorid
BG	P355A-K978C háttérmutációk ("background")
C	zárt (closed)
cAMP	3'-5'-ciklikus-adenozin-monofoszfát
CF	cisztás fibrózis
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
CTP	citidin-5'-trifoszfát
GTP	guanozin-5'-trifoszfát
<i>i</i>	egyedi nyitott ioncsatorna póruson áthaladó átlagos áram
ITP	inozin-5'-trifoszfát
<i>k</i>	Boltzmann állandó
$k_{cat}$	katalitikus sebességi állandó
$K_{eq}$	egyensúlyi állandó (equilibrium constant)
$K_m$	Michaelis-Menten állandó
MTS	metántioszulfonát
NBD	nukleotidkötő domén (nucleotide binding domain)
NMDG	N-metil-D-glukamin
O	nyitott (open)
P-ATP	N <sup>6</sup> -(2-feniletil)-adenozin-trifoszfát

PKA	protein kináz A
$P_o$	nyitvatartási valószínűség (open probability)
PP	protein foszfatáz
rco	nyitási sebességi állandó
R-domén	regulációs domén
RE	regulációs toldalék (regulatory extension)
RI	regulációs beékelődés (regulatory insertion)
roc	zárási sebességi állandó
SCAM	behelyettesített cisztein elérhetőségi módszer (substituted-cysteine accessibility method)
SEM	standard hiba (standard error of the mean)
$T$	abszolút hőmérséklet
$T^\ddagger$	átmeneti állapot (transition state)
TM	transzmembrán
TMD	transzmembrán domén
UTP	uridin-5'-trifoszfát
$V_m$	membránpotenciál
$VO_4^{3-}$	vanadát
WT	vad típus (wild type)
$\Delta\Delta G$	szabadentalpia-változás
$\Delta\Delta G_{int}$	kölcsönhatási energia változás

# 1 Bevezetés

## 1.1 A CFTR élettani és kóreltani szerepe

„Jaj annak a gyermeknek, aki homlokon csókolva sósnak találják. El van átkozva és hamarosan meg kell halnia.” – tartotta az észak-európai népi hiedelem. A kórképet később, annak első klinikai alaposságú leírója, a hasnyálmirigy önemésztése miatt keletkező ciszták és kiterjedt, progresszív fibrotikus elváltozása után a pancreas cisztás fibrózisának (CF) nevezte el [1]. Azonban a betegségben nemcsak a hasnyálmirigy, hanem az összes, de különösképpen a magas fehérje tartalmú szekrétumot előállító, exokrin szerv érintett. A CF hátterében a hámrétegek só-víz transzportfolyamatainak a Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) anioncsatorna funkcióvesztéssel járó mutációi következtében megbomló egyensúlya áll: a besűrűsödő szekrétum elzárja a lumeneket, ami a szervek működési zavarát, és hosszútávon azok károsodását okozza [2-7]. A betegséget ezért, főleg az európai szakirodalomban, mucoviscidosisnak is nevezik. Visszatérő tüdőfertőzések, bronchiectasia és a kis légutak elzáródása, a hasnyálmirigy önemésztése következtében emésztési zavarok, majd a  $\beta$ -sejtek pusztulását követően diabetes, a máj biliáris cirrhosisa, újszülöttekben meconium ileus, valamint infertilitás [8, 9] képezik a legsúlyosabb tüneteket. A verejték sótartalma megemelkedett – 60 mM-nál magasabb verejték klorid koncentráció diagnosztikus CF-re [6] –, emiatt fokozott verejtékkelválasztás esetén a CF-es betegek hypotóniásan dehidratálódnak. A betegek várható élettartama a javuló tüneti kezelések ellenére sem éri el a 40 évet. A leggyakoribb halálok a fertőzések következtében kialakuló légzési elégtelenség. A CF az észak-európai népek leszármazottai körében a leggyakoribb örökletes betegség, incidenciája Európában és Észak-Amerikában ~ 1:3000-hez, míg a világ többi részén ennél jóval alacsonyabb (pl. Japánban 1:350 000-hez) [8]. Klasszikus mendeli autoszómális recesszív öröklődésmentet mutat. A CFTR génnek eddig több mint 2000 mutációja ismert, amelyből számos CF-hez vezet [10]. A betegséget okozó mutációk a fehérje funkciójára gyakorolt hatásai alapján négy osztályba sorolhatók: a fehérjeszintézist, a fehérjeérést, a kapuzást, illetve a permeációt megzavarókra. Ez az elkülönítés azonban nem éles: pl. a hibás alléloknak az északi népek körében mintegy 70%-át kitevő mutáció, az 508-as pozícióban található fenilalanin delécióna, egyrészt megzavarja a fehérje érését és annak lebomlásához vezet [11], másrészt ugyan a  $\Delta F508$

CFTR fehérjének ~3%-a kijut a membránba, de sérült kapuzású csatornákat alkot [12-14]. Az első két osztályra általánosságban jellemző, hogy hasnyálmirigy elégtelenséggel járó súlyosabb lefolyású kórképhez vezetnek, míg a második két osztályba tartozó mutációk gyakran enyhébb lefolyású betegséget okoznak, megtartott hasnyálmirigy működéssel [4].

A CFTR-nek nem csak az alul-, hanem a túlműködése is betegséghez, fokozott elektrolit transzporttal járó szekréción hasmenéshez vezet, amely a fejlődő országokban a mai napig jelentős problémát okoz, és a gyermekek halálkozásának vezető okai közé sorolható [15-17]. A kórképet rendszerint a vékonybélkripták sejtjeinek szekréción aktivitását fokozó bakteriális toxinok okozzák. A gram negatív *Vibrio cholerae* toxinja a heterotrimer G-fehérjék  $\alpha_s$  alegységét adenzin-difoszfát(ADP)-ribozilálja. Az ADP-ribóz kötés megakadályozza a G-fehérjék saját, aktív élettartamukat korlátozó, guanozin-5'-trifoszfát aktivitását, és így folyamatosan aktívan tartják az adenilát-cikláz enzimet. A tartósan megemelkedő intracelluláris 3'-5'-ciklikus-adenozin-monofoszfát (cAMP) szint aktiválja a protein kináz A-t (PKA), amely a CFTR-t foszforilálva fokozza annak ioncsatorna aktivitását [4, 18]. Az enterotoxikus *Escherichia coli* egyik hőlabilis enterotoxinja (LT-I) szerkezeti homológiát mutat a kolera toxinjával, és ennek megfelelően hasonló patomechanizmussal okoz szekréción hasmenést [19]. A CFTR gén mutációinak kiugróan magas incidenciája alapján felmerül, hogy a heterozigóta tünetmentes hordozók csökkent klorid transzport kapacitása esetleg szelekcion előnyt jelenthet ezen kórképekkel szemben [20, 21].

## 1.2 A CFTR szerkezete és működése

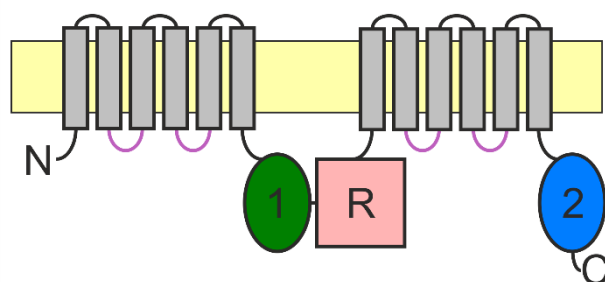
A CF-es betegekben károsodott gént 1989-ben klónozták [22], és az általa kódolt CFTR fehérjét szekvencia homológia alapján az ABC fehérjék családjába sorolták. Több mint 2000 ismert tagjával ez az egyik legnépesebb membránfehérje család. A humán genomban megtalálható 48 ABC fehérje [23] hét alcsaládba (ABC-A ... -G) osztható [24]. Nevüket a jellegzetes és erősen konzervált nukleotidkötő doménjeik (nucleotide binding domain, NBD), az ún. adenzin-trifoszfát (ATP) kötő kazetták (ATP binding cassette, ABC) után kapták. A minden ABC fehérjében megtalálható NBD doménekhez változatos szerkezetű és funkciójú effektor domének tartozhatnak. Az ABC-E és -F fehérjék effektor doménjei enzimatis feladatokat látnak el, mint pl. a DNS hibajavítás vagy riboszóma



funkció szabályozása ("ABC enzimek") [25-29], a fehérjecsalád többi tagjai viszont elsődleges aktív transzporterek. Doménfelépítésük moduláris szerkezetet mutat: minden ABC transzporter két NBD-t és két transzmembrán domént (TMD) tartalmaz, de ez az együttes különböző számú polipeptid láncból épülhet össze, mint például négy önálló doménből, két TMD-NBD párból (homodimer vagy homológ felekből felépülő heterodimer), vagy egyetlen polipeptidláncból. A prokariótákban kettő vagy négy, eukariótákban egy vagy kettő fehérjelánc a jellemző. Egyes esetekben a négy "kanonikus" domént további regulációs vagy szubsztrátkötő domének egészítik ki. Az ABC fehérjék a sejtmembránban és – a mitokondrium és a kloroplaszt kivételével – az organellumok membránjaiban is úgy helyezkednek el, hogy az NBD-ik a membrán citoplazmatikus oldalán található. A szubsztrát transzlokációs utat alkotó TMD-k konformációváltozásait az NBD-kben zajló ATP kötési/hasítási ciklus hajtja [30-34].

A szubsztrát mozgásának irányától függően az ABC transzporterek két családra oszthatók: importerekre és exporterekre. Az importerek csak prokariótákban találhatóak meg, ezek táplálékfelvételének elengedhetetlen transzporterei. Jól definiált szubsztrátkötőhelyük szelektív a transzportálandó molekulára nézve. A legrészletesebben tanulmányozott szerkezetű ABC fehérje a maltóz importer [35-40]. Az exporterek prokariótákban és eukariótákban is megtalálhatók. Változatos feladatokat ellátó fehérjék, amelyek valószínűleg nem tartalmaznak jól körülhatárolható szubsztrátkötőhelyet, mert sokféle molekulát szállíthatnak, és egy részük nem csak a citoszolból, de a membrán belső rétegéből is felveheti szubsztrátját [31, 33].

A CFTR az ABC fehérjék C alcsaládjába tartozó 1480 aminosavból álló integráns glikoprotein, amely az ABC fehérjékre jellemző tipikus topológiával rendelkezik. Az egyetlen peptidláncra felfűzött két TMD-NBD felet egyedi, csak a CFTR-re jellemző, regulációs domén (R-domén) kapcsolja össze (*I. ábra*), amely protein kinázok számára felismerhető foszforilációs helyeket tartalmaz. A többi ABC transzportertől eltérően a CFTR TMD-i a membrán teljes szélességét átérő anionokra szelektív pórust alkotnak, amely nyitott állapotában lehetővé teszi a permeábilis ionok passzív diffúzióját elektrokémiai gradiensük irányában. A pórus kapuját a fehérje sztochasztikus konformációváltozásai nyitják-zárják.



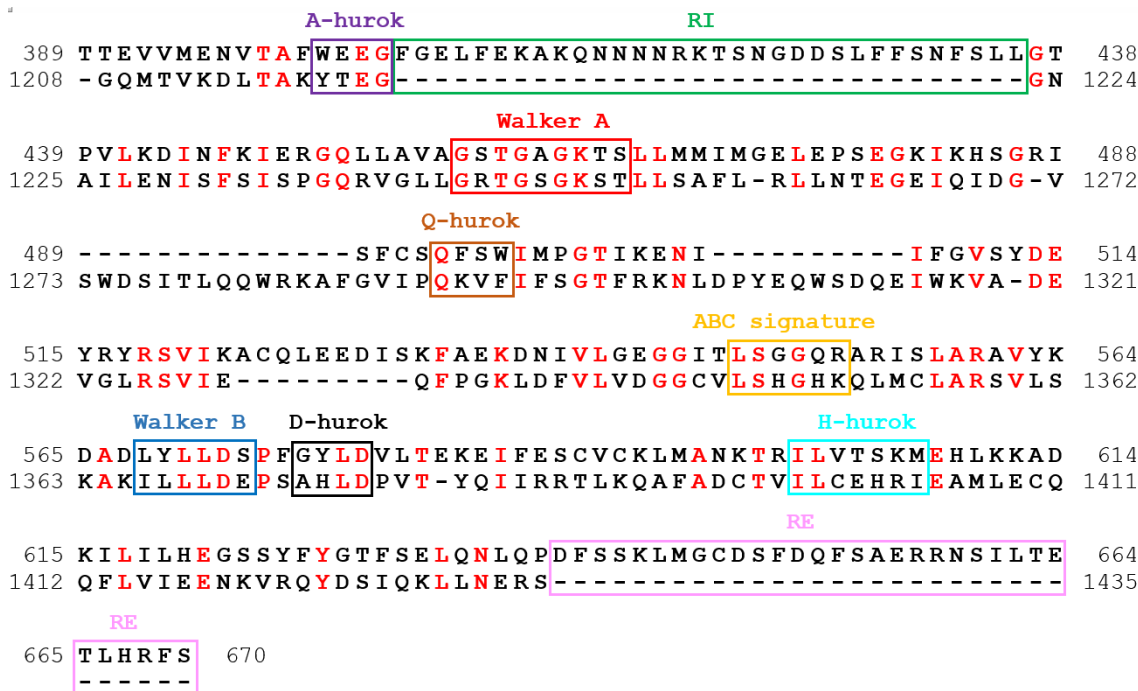
### 1. ábra: A CFTR topológiai felépítése

Az ABC transzporterekre jellemző doménfelépítésnek megfelelően a CFTR két – TMD-ből (TMD1 és TMD2, *szürke*) és ahhoz C-terminálisan kapcsolódó NBD-ből (NBD1, *zöld*; NBD2, *kék*) felépülő – homológ felét az egyedi regulációs domén (R-domén, *rózsaszín*) kapcsolja össze. Mindkét TMD-t hat transzmembrán  $\alpha$ -hélix alkotja, közöttük két intracelluláris hurok (*lila*) található.

#### 1.2.1 A nukleotidkötő domének szerkezete

Bár jelenleg még nem áll rendelkezésünkre nagy felbontású CFTR kristályszerkezet, de a különböző fajokból és ABC fehérjékből származó NBD-k nagyfokú szekvencia és szerkezeti homológiája [41-44] lehetővé teszi a CFTR NBD-k szerkezetének modellezését.

A fehérjecsalád nevét adó [45, 46] "ATP-kötő kazetta" egy katalitikus és egy  $\alpha$ -helikális aldoménből áll. A katalitikus aldomén szerkezetileg homológ más P-hurok ATP-ázokkal [47], mint a RecA-val [48, 49] és az  $F_1$ -ATPáz  $\alpha$  és  $\beta$  alegységeivel [50]. Lelke egy parallel és egy antiparallel  $\beta$ -lemez által közrefogott  $\alpha$ -hélix N-terminális végén elhelyezkedő P-hurok, amely a nukleotid foszfátcsoportjainak kötéséért felelős legfontosabb szekvenciát, a Walker A motívumot (GXXXXGKS/T, ahol X bármilyen aminosav) [51] (**2. és 3. ábrák, piros**) tartalmazza. Ezen aminosavak  $\alpha$ -, valamint a lizin oldallánc  $\epsilon$ -nitrogén atomjai hidrogén hidakon keresztül koordinálják a nukleotid  $\beta$  és  $\gamma$  foszfátjait, biztosítva a  $\gamma$  foszfát megfelelő térbeli elhelyezkedését. A Walker A motívumtól N-terminálisan elhelyezkedő A-hurokban lévő konzervált aromás aminosav (Y/W) (**2. és 3. ábrák, lila**) és a kötött nukleotid purin bázisának delokalizált elektronrendszerei között fellépő stabilizáló kölcsönhatás szintén hozzájárul a nukleotidkötés stabilitásához. Ez a nem-specifikus  $\pi$ - $\pi$  interakció egyúttal magyarázhatja az ABC fehérjéknek a nukleotid-trifoszfátok közti jelentős szelektivitás hiányát [52]. A

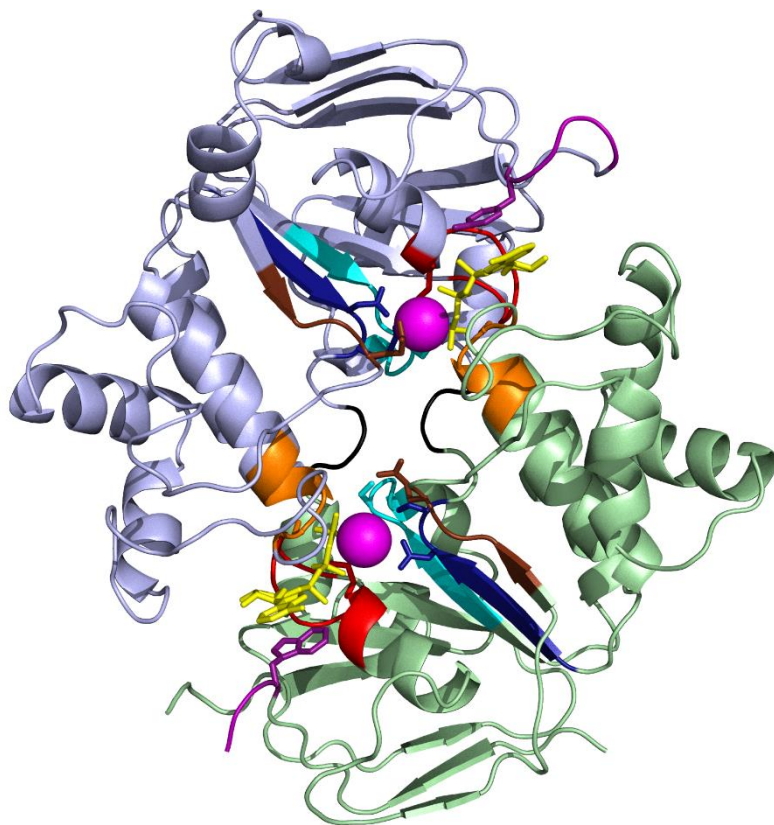


## 2. ábra: Humán CFTR NBD szekvenciáinak összehasonlítása

A humán CFTR NBD1 (389-670-es aminosavak, felső sorok) és NBD2 (1208-1435-ös aminosavak, alsó sorok) összehasonlítása az ATP kötést és hidrolízist meghatározó konszenzus szekvenciák kiemelésével. Megfigyelhetők az NBD1 signature szekvenciájának és az NBD2 Walker motívumainak nem kanonikus aminosavai.

katalitikus aldomén parallel  $\beta$ -lemezében található a szintén konzervált Walker B szekvencia ( $\Phi\Phi\Phi\Phi$ DE, ahol  $\Phi$  hidrofób aminosav) [51] (2. és 3. ábrák, sötétkék), amelynek konzervált aszpartátja a hidrolitikus aktivitáshoz nélkülözhetetlen magnézium iont koordinálja. Az ATP kötés hatására az  $\alpha$ -helikális aldomén 15-30°-os rotáció révén a katalitikus aldomén felé közeledik ("induced fit"). Ennek következtében a Q- (2. és 3. ábrák, barna) és a H-hurkok (2. és 3. ábrák, cián) konzervált glutamin, illetve hisztidin oldalláncai az ATP  $\gamma$ -foszfátjának közelébe kerülnek. Az  $\alpha$ -helikális aldomén tartalmazza az ABC fehérjék egyedi ismertetőjegyének számító konzervált signature szekvenciát, vagy más néven C-hurkot (LSGGQR/K) (2. és 3. ábrák, narancssárga), amely a nukleotid-kötőhelytől távol helyezkedik el.

ABC enzimekből [53-55] és ABC transzporterekből [56-59] származó NBD domének ATP jelenlétében stabil dimereket képeznek. E dimer szerkezetekben két kompozit ATP-kötőhely látható, amelyeket az egyik NBD Walker szekvenciái és a másik



### 3. ábra: CFTR NBD1-NBD2 heterodimerjének szerkezeti modellje

*Staphylococcus aureus* baktérium adenzin 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)-trifoszfát (AMP-PNP)  $\text{Na}^+$  sóját kötő Sav1866 ABC exportérének kristályszerkezete alapján [60] (Protein Data Bank azonosítószám: 2HYD) épített humán CFTR homológiamodell NBD1-NBD2 heterodimere [61] a plazmamembrán síkja felől nézve. Alsó kompozit ATP-kötőhely az 1-es, a felső a 2-es. NBD1 zöld, NBD2 kék, AMP-PNP sárga,  $\text{Na}^+$  ionok (a  $\text{Mg}^{2+}$  ionok helyén) rózsaszín, Walker A motívum piros (NBD1 K464, NBD2 K1250 oldalláncai pálcikák), Walker B motívum sötétkék (NBD1 D572 és S573, NBD2 D1370 és E1371 oldalláncai pálcikák), signature szekvencia narancssárga (NBD1 S459, NBD2 S1347 oldalláncai pálcikák), A-hurok lila (NBD1 W401, NBD2 Y1219 oldalláncai pálcikák), Q-hurok barna (NBD1 Q493, NBD2 Q1291 oldalláncai pálcikák), H-hurok cian (NBD1 S605, NBD2 H1402 oldalláncai pálcikák), D-hurok fekete.

NBD signature szekvenciája alkotnak. E negyedleges szerkezet élettani jelentőségét funkcionális vizsgálatok [62-66] és teljes ABC fehérje szerkezetek [60, 67-70] támasztják alá. A dimerben a signature szekvencia konzervált szerinjének  $\beta$ -oxigénje és a második glicin  $\alpha$ -nitrogénje hidrogén hidakat létesít a szemben kötött ATP  $\gamma$ -foszfátjával. A signature szekvencia tehát a szemközti NBD által kötött nukleotid  $\gamma$  foszfát szenzorának is tekinthető, és mutációi gátolják a hidrolitikus aktivitást [62]. Az NBD dimer kialakulását követően a dimerizációs felszínnek közé bezárt ATP elhasad, mely kétféle

molekuláris mechanizmussal magyarázható. Az általános bázis-katalizált hidrolízis elmélet szerint, a Walker B szekvencia C-terminális végén található glutamát, mint katalitikus karboxilát, negatív töltésével polarizálja a  $\beta$  és  $\gamma$  foszfátok közötti savanhidrid kötést támadó víz molekulát [71]. A másik elképzelés a szubsztrát-asszisztált katalízis, amely szerint a víz molekulát a  $\gamma$  foszfát negatív töltése polarizálja [72]. A hidrolízist követően a nukleotidkötő zsebben maradó végtermék ADP kevésbé stabilizálja az NBD szerkezetet. Ennek következtében az aldomének ATP-indukálta záródása fellazul, a foszfát ion ledisszociál kötőhelyéről, és az NBD dimer szétesik.

Az NBD-k a Q-hurok és a signature szekvencia közötti variábilis szakaszukon keresztül lépnek kapcsolatba a TMD-k "csatoló hélix"-eivel (lásd *1.2.2. fejezet*). Feltehetően e régióon keresztül terjednek át az NBD-k konformációs mozgásai a TMD-kre. A CFTR NBD1 doménjének ezen szakaszában található az 508-as fenilalanin, amelynek deléciója – a több száz ismert CF mutáció közül – egyedül felelős a betegségek közel 90%-áért [73].

Az aszimmetrikus ABC fehérjéknek, többek között a CFTR-t is tartalmazó ABC-C alcsalád tagjainak, két kompozit nukleotid-kötőhelye nem egyenértékű: az egyik kötőhely, az azt alkotó Walker B és signature szekvenciák nem kanonikus mutációi következtében degenerálódott, és csökkent katalitikus aktivitással rendelkezik, vagy el is veszítette azt [74-81]. A CFTR esetében az NBD2 Walker motívumai és az NBD1 signature szekvenciája által alkotott "2-es kötőhely" a kanonikus, katalitikusan aktív kötőhely [141]. Az NBD1 Walker B glutamátját egy szerin helyettesíti, és az NBD2 signature szekvenciája is degenerált (LSHGHK) (*2. és 3. ábrák*), így az általuk alkotott "1-es kötőhely" inaktív [82, 83].

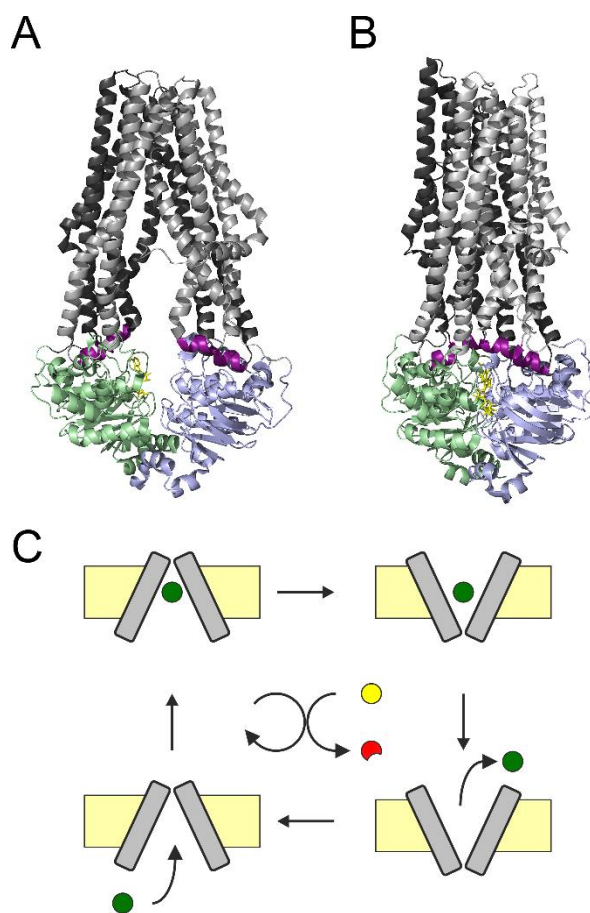
A CFTR NBD1 szerkezete [84-86] nagyon hasonló a többi transzporterből ismert szerkezetekhez, azonban a tipikus motívumok mellett tartalmaz két egyedi szekvencia szakaszt is: az N-terminális vége közelében, az első két  $\beta$ -redő között, egy egyedi beékelődést (regulációs beékelődés, regulatory insertion, RI; 405-436-as aminosavak) (*2. ábra, zöld*) és a kanonikus C-terminálist követő hélix-loop-hélix motívumot (regulációs toldalék, regulatory extension, RE, 639-670-es aminosavak) (*2. ábra, rózsaszín*). E szakaszok nevüket a bennük található PKA-szubsztrát szerinek (S422, illetve S660 és S670) után kapták, amelyek feltételezett foszforilációja hatással lehet mind a domén térszerkezetére, mind a csatorna kapuzására.

### 1.2.2 A transzmembrán domének szerkezete

Az ABC exporterek TMD-i (**4. A-B ábra**, TMD1 sötétszürke, TMD2 világosszürke) általában hat-hat transzmembrán  $\alpha$ -hélixet tartalmaznak, amelyek a plazmamembránban dimert képezve közrefogják a szubsztrát transzlokációs útvonalat. Dimerizációjuk részeként egy-egy intracelluláris hurkuk keresztezi egymást és a fehérjelánc átellenes felében található NBD-vel érintkezik (domain swapping). Így mindkét TMD mindkét NBD-vel összeköttetésben áll. Az intracelluláris hurkuk rövid  $\alpha$ -helikális szakaszaikon, az ún. csatoló hélixeken (**4. A-B ábra**, lila) keresztül érzékelik az NBD-k konformációváltozásait és továbbítják azokat a TMD-k felé. Az NBD1 az első (TMD1) és a negyedik (TMD2), az NBD2 a második (TMD1) és harmadik (TMD2) citoszolikus hurkuk csatoló hélixével áll kapcsolatban [60, 69, 70, 87-95].

A transzporterek konformációs ciklusa során a TMD-k befele és kifele néző állapotok között alternálnak, biztosítva a szubsztrátkötőhely váltakozó elérhetőségét a membrán két oldala felől, de egyszerre mindig csak az egyik kompartment irányából [96]. ABC exporterek "apo" állapotában az intracelluláris oldal felé nyitott kötőhely nagy affinitással köti a szubsztrátot, majd az NBD-k ATP kötésére bekövetkező dimerizációja a TMD-k konformációját kifele nézőbe fordítja át. A kifele nyitott konformációban a kötőhely affinitása alacsony, és a szubsztrát disszociál. Ezt követően az NBD dimer széttesik, és a TMD-k visszatérnek kiindulási állapotukba. A ciklikus működés egyirányúságát az ATP hidrolízise biztosítja (**4. C ábra**) [30, 31, 33, 34, 81, 97-99]. A transzport sebességét a fehérje konformációváltozási ciklusának időtartama limitálja. A fehérjék konformációváltozásai a ms-os időskálán zajlanak, így a transzporterek tipikus átviteli sebessége  $\sim 10^2 - 10^4 \text{ s}^{-1}$  [100]. Az ABC transzporterek transzportciklusához szorosan kapcsolt katalitikus aktivitásuk. Ezek mért értékei (katalitikus sebességi állandó,  $k_{\text{cat}}$ ) alapján (P-glikoprotein:  $9.2 \text{ s}^{-1}$  [101]; BmrC/BmrD:  $4.7 \text{ s}^{-1}$  [102]; TAP:  $5 \text{ s}^{-1}$  [103]) feltételezhető, hogy e transzporterek szubsztrát átviteli sebessége jóval kisebb.

A CFTR két, hat-hat transzmembrán  $\alpha$ -hélixet tartalmazó, TMD-jének pszeudoszimmetrikus dimere anionszelektív ioncsatorna pórust képez a membránban. A nyitott póruson keresztüli passzív ionvándorlás sebessége független a fehérje lassú konformációváltozásainak időtartamától, az az átjárható, nyitott konformációban töltött idővel arányos. A nyitott póruson keresztül a permeábilis ionok szabadon áramolhatnak



#### 4. ábra: ABC transzporterek szerkezete és működése

**A,** *Thermotoga maritima* baktériumból származó TM287/288 heterodimer ABC exporter kristályszerkezete [87] (Protein Data Bank azonosítószám: 3QF4). Az aszimmetrikus NBD-k csak a nem kanonikus kötőhelyen kötnek AMP-PNP-t. Az NBD dimer az 1-es kötőhely körül részlegesen, a 2-es kötőhely körül teljesen szétnyílt. A csatoló hélixek egymástól távol helyezkednek el, TMD-k befele néző konformációban állnak.

**B,** *Staphylococcus aureus* baktérium Sav1866 homodimer ABC exporterének kristályszerkezete [60] (Protein Data Bank azonosítószám: 2HYD). A szoros dimert alkotó NBD-k érintkezési felülete két AMP-PNP-t zár magába. A csatoló hélixek egymáshoz közelebb helyezkednek el, a TMD-k kifelé néző konformációban állnak.

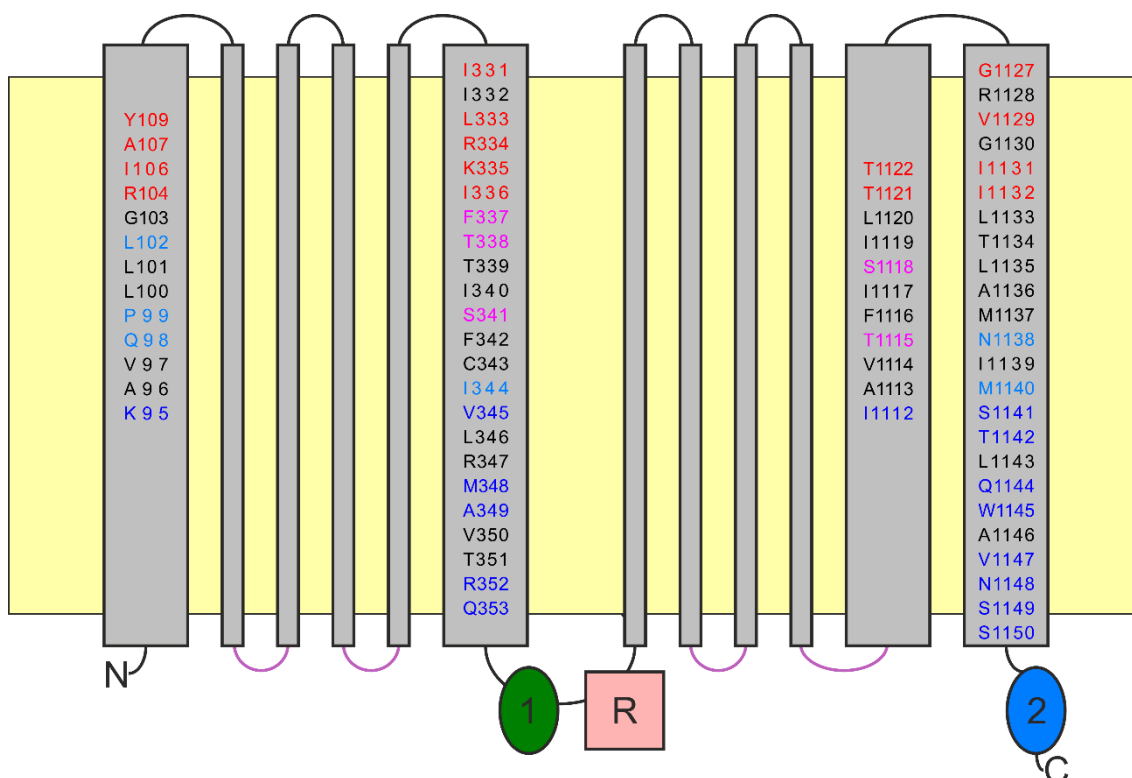
**A-B,** TMD1 sötétszürke, TMD2 világosszürke, csatoló hélixek lilák, NBD1 zöld, NBD2 kék, AMP-PNP sárga. Mindkét szerkezetben jól látható az intracelluláris hurkok kereszteződése (domain swapping).

**C,** A szubsztrát (sötétzöld kör) az intracelluláris oldal fele néző TMD-k (szürke téglalapok) nagy affinitású kötőhelyéhez kötődik (bal oldali függőleges nyíl), majd a TMD-k kifelé nyitott konformációba billennek át (felső vízszintes nyíl). A kifelé nyitott TMD-k alacsony affinitású kötőhelyéről a szubsztrát disszociál (jobb oldali függőleges nyíl), majd a TMD-k visszabillennek befele nyitott "nyugalmi" konformációjukba (alsó vízszintes nyíl). Az elsődleges aktív transzporterekre jellemzően, a konformációs ciklus egyirányúságát nagy energiájú kémiai kötés hidrolízise szolgáltatja (középen: ATP sárga kör, ADP piros). A TM287/288 kristályszerkezetet a bal, a Sav1866 kristályszerkezetet a jobb oldali TMD konformációkat szemlélteti. Plazmamembrán: sárga téglalap.

elektrokémiai gradiensük irányában. Így az átviteli sebesség a  $10^6$  ion/s nagyságrendet is elérheti. A különböző ABC transzporterek között konzerválódott molekuláris mechanizmus alapján feltételezhető, hogy a kapuzási ciklusa során a CFTR hasonló konformációváltozásokon megy keresztül, mint az ABC transzporterek szubsztrát transzlokációs ciklusaik alatt. A CFTR-rel rokon bakteriális ABC exporterek kristályszerkezeteiben a szeparált NBD-k befele (**4. A ábra**), míg a dimerizált NBD-k kifelé (**4. B ábra**) néző TMD-vel társulnak. Mivel azonban a CFTR-ben a dimer kialakulása a pórus megnyílásához, szétesése pedig annak záródásához kapcsolt (lásd *1.2.4 fejezet*), feltételezhető, hogy a CFTR pórusának zárt szerkezete a befele, nyitott szerkezete a kifelé néző TMD konformációval analóg. A CFTR tehát valószínűleg egy ősi ABC transzporterből fejlődött ioncsatornává, a citoszolikus kapu elvesztése révén [100, 104, 105].

A pórust alkotó pozíciók azonosítására a behelyettesített cisztein elérhetőségi módszer (substituted-cysteine accessibility method, SCAM) alkalmas: a vizsgálni kívánt pozícióba célzott mutációval bevitt cisztein oldallánc tiol-reaktív reagensekkel (pl. metántioszulfonátok, MTS) történő módosíthatósága azonosítja a fehérje vízzel érintkező felületén elhelyezkedő pozíciókat [106]. A CFTR transzmembrán (TM)  $\alpha$ -héliceinek szisztematikus SCAM vizsgálatai négy hélix (TM1, TM6, TM11 és TM12) pórusalkotó szerepét igazolták. A pórus zárt állapotában intra- vagy extracellulárisan alkalmazott MTS reagensek egy tágas belső (**5. és 6. A, B, C ábrák, sötétkék aminosavak**) [107-115] és egy szűkebb külső (**5. és 6. A, B, C ábrák, piros és rózsaszín aminosavak**) [108, 111, 113, 116-119] vesztibulumot azonosítottak. A kettő között a csatorna pórusa beszűkül: az ott elhelyezett cisztein oldalláncok csak lassabban, vagy egyáltalán nem, érhetők el a viszonylag nagy méretű MTS reagensekkel. A négy pórusképző TM  $\alpha$ -hélixnek e szűkület határaitra eső pozícióiba páronként bevitt ciszteinek (K95C/I344C, K95C/S1141C, I344C/S1141C) réz-(II)-o-phenanthrolinnal vagy  $\text{Cd}^{2+}$ -mal keresztbe köthetők [120-122], bizonyítva, hogy a hélixek ezen szakaszai a csatornában valóban egy magasságban helyezkedhetnek el. A TM6 hélixnek a szűkültre eső szakaszában elhelyezett ciszteinek a citoszolikusán alkalmazott permeábilis tiol-reaktív auro-cianáttal a csatorna csukott állapotában is elérhetők egészen az I344-es [115] (vagy S341-es [108]) pozícióig. Ugyanakkor az S341-es pozíció különböző MTS reagensekkel kívülről is elérhető a csatorna mind nyitott, mind zárt állapotában [117]. Ezek alapján a csatorna



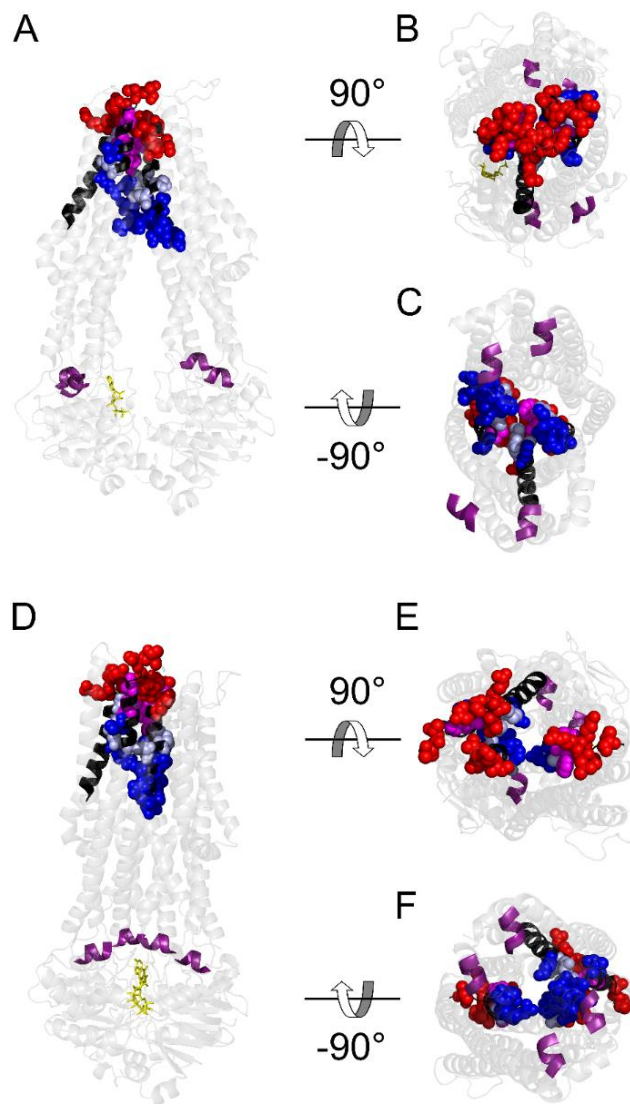


**5. ábra: A CFTR pórust alkotó TM  $\alpha$ -hélixek pozícióinak elérhetősége intra- és extracellulárisan alkalmazott MTS reagensekkel.**

A vizsgált, de MTS reagensekkel el nem érhető pozíciókban található aminosavak *feketék*, az extracelluláris oldal felől elérhető pozíciókban lévők *pirosak*. Az intracelluláris oldal felől elérhető pozíciók közül *sötétkékek* a csatorna zárt állapotában is elérhetők, *világoskékek* a csak nyitott állapotában elérhetők; ez utóbbiak közül azok, amelyek az extracelluláris oldal felől is elérhetők *rózsaszínek*. A topológiai térkép szinkódolása megegyezik az **1. ábrával**: plazmamembrán *sárga*, TMD-k *szürkék*, intracelluláris hurkok *lilák*, NBD1 *zöld*, NBD2 *kék*, R-domén *rózsaszín*.

ATP által vezérelt kapuja a 341-344-es pozíciók magasságában lehet. A szűkület megnyílásakor az intracelluláris vesztibulum mélyebb részén található pozíciók is gyorsabban hozzáférhetővé válnak (**5. és 6. D, E, F ábrák**, *világoskék aminosavak*) [109, 110, 112, 113] egészen a zárt állapotban kívülről is elérhető pozíciókig (**5. és 6. D, E, F ábrák**, *rózsaszín aminosavak*) [108, 111, 114].

Az intra- (K98, R303, R353) [120, 123] és extracelluláris (R104, R117, R334, K335) [124, 125] vesztibulumok pozitív töltésű aminosavainak elektrosztatikus hatása megnöveli az anionok lokális koncentrációját a csatorna átviteli sebességét meghatározó szűkülete közelében, ami hozzájárul a pórus anion szelektivitásához [126]. A  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  és



**6. ábra: A SCAM kísérletek eredményeinek összefoglalása bakteriális ABC transzporter szerkezetek alapján épített humán CFTR homológiamodellek TMD-in**

CFTR homológiamodellek [61] (**A, B és C**) a CFTR csatorna zárt konformációjával analóg, befele néző TM287/288 heterodimer ABC exporter [87] (Protein Data Bank azonosítószám: 3QF4) (**4. A ábra**), valamint (**D, E és F**) a CFTR nyitott konformációjának megfelelő Sav1866 homodimer ABC exporter [60] (Protein Data Bank azonosítószám: 2HYD) (**4. B ábra**), kristályszerkezetei alapján. Nézetek: a plazmamembrán síkjából (**A és D**), az extracelluláris oldal felől (**B és E**), illetve az NBD-k eltávolítása után az intracelluláris oldal felől (**C és F**). Az NBD-kben kötött AMP-PNP *sárga*, az intracelluláris hurkok csatolóhélicei *lilák*. A TMD-k 1., 6., 11. és 12. TM  $\alpha$ -héliceinek SCAM módszerrel vizsgált szakaszai kiemelve láthatók. Az MTS reagensekkel elérhető aminosavak gerincei *fekete szalagok*. Az elérhető pozíciók (térkitöltő ábrázolás) színezése: az extracelluláris oldal felől elérhető pozíciók, *piros*; az intracelluláris oldal felől a zárt állapotban is elérhetőek, *sötétkék*; a csak nyitott állapotban elérhetőek, *világoskék*; utóbbiak közül az extracelluláris oldalról is elérhetőek, *rózsaszín*.

$\text{Ca}^{2+}$ -szelektív csatornák rendkívüli diszkriminációs képességéhez [127] képest, a CFTR, a többi anioncsatornához hasonlóan [128], csak kis mértékben szelektál a különböző kisméretű anionok között [126, 129-133]. A különböző anionok iránti permeabilitásának ( $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- \approx \text{formiát}^- > \text{HCO}_3^- > \text{F}^-$ ) és vezetőképességének ( $\text{Cl}^- > \text{NO}_3^- \approx \text{Br}^- \gg \text{formiát}^- > \text{HCO}_3^- > \text{F}^- > \text{SCN}^- \approx \text{ClO}_4^-$ ) összehasonlítása alapján a szelektivitás az ún. liotróp szelektáló filter mechanizmussal magyarázható [134], amelyet az anion és hidrátburka, illetve az anion és a „filterben” lévő kötőhelye közötti kötési energiák viszonya határoz meg. A "kozmotróp" anionok nehezen vesztik el hidrátburkukat és ez gátolja őket abban, hogy beléphessenek a szűk „filterbe” (kicsi permeabilitás, pl.  $\text{F}^-$ ). A "liotróp" anionok hidratációs energiája kicsi, ezek könnyen dehidratálódnak, így a többi aniont megelőzve (kiszorítva) léphetnek be a filterbe (nagy permeabilitás, pl.  $\text{SCN}^-$ ). Ez utóbbi ionok azonban gyakran nehezebben disszociálnak le a kötőhelyről, „beragadnak” a pórusba, így saját vezetőképességük kicsi, és gátolják a többi ion áthaladását is (pl.  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ) [130]. Az evolúció során az anioncsatornák szelektációs mechanizmusa a sejt leggyakoribb anionjának, a közepesen liotróp klorid ionnak leghatékonyabb átjuttatására optimalizálódott.

### 1.2.3 A regulációs domén és a foszforilációfüggő szabályozás

Az élő sejtek millimoláros citoszolikus ATP koncentrációja jóval meghaladja a csatorna ATP iránti látszólagos affinitását (lásd *1.2.4 fejezet*), így az ATP nem lehet fiziológias szabályozó tényezője a CFTR kapuzásának. Az ABC transzporterekben az NBD-k ATP hasítási ciklusát a transzport szubsztrát TMD-khez történő kötődése indukálja [32]. A CFTR esetében ezt a funkciót az NBD1 és TMD2 közé beékelte, ~200 aminosavból álló, regulációs (R) domén tölti be. Az R-domén nem mutat szekvencia homológiát semmilyen eddig ismert fehérjével, és feltehetőleg nem rendelkezik jól definiálható harmadlagos szerkezettel [135]. Mintegy 650-550 millió éve a csatorna funkció megjelenésével közel egy időben alakulhatott ki intron szekvenciákból. Szekvenciájának túlnyomó részén nem érvényesült erős szelektációs nyomás, azonban a benne található többségében dibázikus (R/K,R/K,X,S) PKA felismerési konszenzus szekvenciák már evolúciójának korai fázisában konzerválódtak [136].

A csatorna aktivitásának előfeltétele az R-domén konszenzus szerinjeinek foszforilációja [52, 137-142]. A PKA által *in vitro* foszforilálható nyolc szerinből [142, 143] eddig hatról bizonyították, hogy *in vivo* is foszforilálódik [144]. Az egyes foszforilációs helyek funkcionális szempontból redundánsak (egy vagy néhány szerin alaninra történő cseréje nem okoz látványos csökkenést a csatorna aktivitásban) [144-146], ugyanakkor nagy számuk biztosítja a precíz szabályozás lehetőségét: a csatornák nyitvatartási valószínűsége (open probability,  $P_o$ ) a foszforiláció sztöchiometriájával nagyjából arányosan növekszik [99]. A foszforiláció következtében megváltozik a domén szerkezete (csökken az  $\alpha$ -helikális tartalom [147, 148]) és a poliakrilamid géleken tapasztalható mobilitása [142].

*In vitro* körülmények között a PKA mellett számos más szerin/treonin kináz is foszforilálja az R domént, mint például a protein kináz C [137, 143, 149, 150], protein kináz G [143, 149, 151], a  $Ca^{2+}$ -kaldmodulin dependens protein kináz [143] és az adenzin-monofoszfát(AMP)-aktivált protein kináz [152-155], azonban ezek élettani szerepe a csatorna kapuzásának szabályozásában a mai napig nem egyértelműen tisztázott.

Izolált membrános mérésekben a PKA elvonását követően a CFTR csatornák aktivitása gyorsan csökken, majd egy alacsonyabb szinten stabilizálódik. Az R-domén membrán-kötött protein foszfatázok (PP) általi részleges defoszforilációjának köszönhető [156]  $P_o$  csökkenés, a nyitott események átlagos élettartamának felére rövidülését, és a zárt események hosszának kétszeresére nyúlását tükrözi [140, 157-159]. A legtöbb izolált membrán rendszerben ez a részlegesen defoszforilált állapot több tíz percen keresztül igen stabil marad [52, 140]. Valószínűleg, mint ahogy a konszenzus szekvenciákban lévő szerinek sem egyformán jó szubsztrátjai a különböző kinázoknak, a foszfoszerineket sem egyforma sebességgel defoszforilálják a PP-k.

A CFTR aktivitása összességében az R-domén foszforilált szerinjeinek számával [142, 150] vagy a foszforilálható szerinek helyére bevitt stabil negatív töltések (aszpartát [146] vagy glutamát [160]) számával arányosan fokozódik. Azonban a foszfoszerinek hatása csak részben utánozható bevitt stabil negatív töltésekkel, mert az ilyen mutáns csatornák maximális  $P_o$ -ja jelentős mértékben elmarad a foszforilált vad típusú (wild type, WT) csatornákétól. Az S737A és az S768A CFTR mutánsok PKA iránti érzékenysége megnövekedett, ami valószínűsíti, hogy a 737-es és 768-as szerinek foszforilációja gátló

hatással van a csatorna aktivitására [142, 154, 161]. Ezt a két szerint in vitro körülmények között foszforilálja az AMP-aktivált protein kináz, ami magyarázhatja ennek a kináznak a CFTR aktivitását gátló hatását [153, 154]. Tehát az R-domén foszforilációja a negatív töltések felszaporodásából fakadó elektrosztatikus hatásnál komplexebb mechanizmussal szabályozza a csatorna működését.

Prefoszforilált WT CFTR csatornák exogén, foszforilálatlan R-domén peptiddel gátolhatók, és ez a gátló hatás az exogén R-domén foszforilációjával megszüntethető [162]. A CFTR TMD1-NBD1 és TMD2-NBD2 fehérjeláncainak koexpressziójával előállított "vágott"  $\Delta R$  CFTR csatornák foszforiláció hiányában is közel fele akkora maximális  $P_o$ -val kapuznak, mint a foszforilált WT CFTR csatornák [140, 163, 164]. A  $\Delta R$  CFTR csatornák aktivitása gátolható foszforilálatlan [163], viszont kis mértékben fokozható prefoszforilált [165, 166], exogén R-domén peptid alkalmazásával. Hasonló koexpressziós kísérletek alapján az NBD1 RI és RE szakaszainak eltávolítása nem befolyásolja a CFTR kapuzásának szigorú foszforiláció-függését [141]. Tehát a CFTR csatorna aktivitás foszforiláció-függésének háttérében elsősorban a foszforilálatlan R domén kapuzásra kifejtett gátló, és csak kisebb mértékben, a foszforilált R domén stimuláló hatása áll.

A protein kináz vagy foszfatáz kezelés hatására a CFTR kapuzási kinetikája és katalitikus aktivitása párhuzamosan változnak [167], de az NBD-k ATP iránti affinitása független az R-domén foszforiláció fokától [83, 168]. A foszforilálatlan R-domén tehát nem az ATP kötés megakadályozásával vagy a kapuzási és az NBD dimerizációs ciklus szétkapcsolásával fejt ki hatását, hanem az ATP kötést követő, a pórus megnyílásához vezető, NBD dimerizációs lépést (részletekért lásd az *1.2.4 fejezetet*) gátolja. A TMD-k konformációváltozásainak és az NBD-k dimerizációs ciklusának szoros kapcsoltsága miatt, a csatorna aktivitásának ez a gátlása a TMD-k vagy az NBD-k szintjén, de akár párhuzamosan mindkét helyen is megvalósulhat. Alacsony felbontású krioelektronmikroszkópos szerkezet valószínűsíti, hogy a CFTR defoszforilált állapotában az R-domén a citoszolikus doménektől egészen a TMD-ig felnyúlik [169]. Az izolált R-domén helikális szakaszain keresztül kapcsolódik az NBD1-hez, mely kapcsolat a helikális szakaszok foszforilációt követő letekeredésével megszűnik [148, 170]. A fehérjelánc kettévágása az R-domén és a TMD2 között a nem-foszforilált csatornák gátoltságának jelentős oldásához vezet [140], ami valószínűsíti, hogy a

nem-foszforilált R-domén és a TM7 hélix kovalens kapcsoltsága fontos a zárt állapot stabilizálása szempontjából. Az R-domén foszforilációja mindenesetre jelentősen csökkenti a nyitott és a zárt állapotok közötti szabadentalpia különbséget, lehetővé téve az ATP-függő kapuzási ciklus megindulását.

#### 1.2.4 Az ATP-függő kapuzási ciklus

A CFTR csatornák ATP koncentráció függvényében ábrázolt relatív árama a Michaelis-Menten kinetikát követi, 50  $\mu\text{M}$  körüli látszólagos affinitással [158, 171-173]. A telítési ATP koncentráció jelenlétében kapuzó egyetlen csatorna áramának mérésekor megfigyelhető nyitott és zárt események időtartamainak eloszlásait maximum likelihood módszerrel illesztve legalább egy nyitott (open, O) és két, egymástól jól elkülönülő, zárt állapot azonosítható: a hosszabb (zárt, closed, C) a másodperces, míg a rövidebb (blokkolt, blocked, B) a 10 ms-os nagyságrendbe esik. Ezek alapján a CFTR kapuzása első közelítésben leírható a három állapotú  $C \rightleftharpoons O \rightleftharpoons B$  modellel [158, 171, 173].

Az O és a B állapotok közötti sebességi állandók ( $r_{OB}$  és  $r_{BO}$ ) függetlenek az ATP koncentrációtól, és mivel jelentősen gyorsabbak, mint az  $r_{OC}$ , ezért a hosszú élettartamú C állapotból megnyílt csatorna, mielőtt visszatérne a C állapotba, tipikusan néhányszor az O és a rövid élettartamú B állapotok között ugrál. Ez a folyamat, az ATP-vezérelt "lassú kapuzástól" független "gyors kapuzás", melynek mechanizmusa eddig tisztázatlan. A csak rövid zárt események által megszakított nyitott események sorozatát burst-nek, a hosszú zárt eseményeket interburst-nek nevezzük. A CFTR ATP-függő "lassú kapuzásán" tehát a burst és interburst események váltakozását értjük [158, 171, 173]. Ezért az ATP-függő lassú kapu nyitási sebességi állandóját az átlagos interburst-hossz reciprokaként ( $1/\tau_{ib}$ ), zárási sebességi állandóját pedig az átlagos burst-hossz reciprokaként ( $1/\tau_b$ ) definiáljuk [158, 171, 173].

Az egyedi csatornák steady-state kapuzásakor megfigyelhető átlagos burst-hossz ATP koncentráció független [140, 158, 171-173]. Mivel a CFTR csatornák ATP hiányában elhanyagolható sebességgel nyílnak meg [158, 174, 175], ezért makroszkópos CFTR áram ATP hirtelen elvonását követő lecsengésének időállandója szintén az átlagos burst-hosszt tükrözi, de nulla szabad ATP koncentráció mellett. Ez az érték megegyezik a telítési ATP jelenlétében mért steady-state értékkel [159], ami megerősíti, hogy a burst-

hosszak valóban függetlenek az ATP koncentrációtól, azaz, hogy a burst időtartama alatt az ATP-kötőhelyek nem hozzáférhetőek.

A lassú kapu nyitási sebessége az ATP koncentráció függvénye, és egyedül felelős a nyitvatartási valószínűség ATP koncentráció függéséért. A kötött ATP-k  $\beta$ - és  $\gamma$ -foszfátjait stabilizáló Walker A lizinek bármelyikének mutációja (1-es kötőhely: K464A; 2-es kötőhely: K1250A), vagy a katalitikusan aktív 2-es kötőhelyen a magnézium iont koordináló Walker B aszpartát mutációja (D1370N), csökkenti az ATP látszólagos affinitását: vagyis bármelyik kötőhely ATP telítettsége a csatorna megnyílása szempontjából sebességmeghatározóvá tehető. Tehát a csatorna hatékony megnyílásának előfeltétele mindkét kötőhely ATP kötése [158].

Mivel a nyitási sebesség nem lineáris, hanem telíthető (hiperbolikus) függvénye az ATP koncentrációnak, a pórus megnyílása nem lehet az ATP kötés közvetlen következménye [83]. Nukleotid bázisukban eltérő nukleotid analógok (ATP, GTP, ITP, UTP, CTP) különböző maximális nyitási sebességet biztosítanak [52, 83, 158], ami arra utal, hogy a nyitási konformációváltozás telítési körülmények között sebességmeghatározó lépésének a nukleotid kötését követően kell történnie. E lépés sebessége szempontjából a nukleotidok bázis természeténél is jelentősebb a pirofoszfát lánc pontos szerkezete, mert a perturbált pirofoszfát láncal rendelkező nukleotidok (AMP-PNP, AMP-PCP, ATP $\gamma$ S) elenyésző maximális nyitási sebességet biztosítanak [158].

A foszforiltranszfert katalizáló enzimekben a szervetlen foszfát analógok, mint például a vanadát ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) [176, 177] vagy a berilium-trifluorid ( $\text{BeF}_3$ ) [178], az ATP disztális savanhidrid kötésének hidrolízisét követően a nukleotid-kötőhelyen visszamaradó ADP-hez kötődnek, és a katalízis átmeneti állapotára hasonlító szerkezetet stabilizálnak. Az ATP jelenlétében kapuzó WT CFTR citoszolikus felszínén alkalmazott  $\text{VO}_4^{3-}$  vagy  $\text{BeF}_3$  az ATPáz ciklust az ATP hasítás átmeneti állapotában megakasztva a csatornát annak nyitott állapotában stabilizálja ("nyitvarekeszti") [83, 171, 179]. Hasonló eredménnyel jár ATP és egy nem hidrolizálható nukleotid analóg – AMP-PNP [83, 157, 158, 171, 180] vagy pirofoszfát [171, 181, 182] – együttes alkalmazása is. Ezek szerint az ATP hasítási és a kapuzási ciklus kapcsolttságban áll egymással, és az ATP hidrolízise a csatorna bezáródását segíti elő.

A CFTR két NBD-je nem csak aminosav szekvenciájukban (az NBD1 Walker motívumai és az NBD2 signature szekvenciája nem kanonikus mutációkat tartalmaznak),

hanem funkcionálisan is különböznek egymástól, mert a  $^{32}\text{P}$ -t tartalmazó fotoreaktív 8-azido-ATP analógokkal végzett keresztkötéses kísérletekben eltérő módon jelölődnek. Alacsony,  $5\ \mu\text{M}$ -os, koncentrációban alkalmazott 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP-vel csak az NBD1 jelölhető.  $\text{VO}_4^{3-}$  párhuzamos alkalmazása az inkubáció során jelölhetővé teszi az NBD2-t, valamint mérsékelten fokozza az NBD1 jelölhetőségét [183]. Magasabb,  $20\text{-}100\ \mu\text{M}$ -os 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP-vel már  $\text{VO}_4^{3-}$  nélkül is jelölhetővé válik az NBD2 [82, 184]. De míg az NBD1-hez kötött nukleotid ténylegesen ATP marad, addig az NBD2-höz kötött nukleotid elhidrolizál, ugyanis 8-azido- $[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP-vel csak az előbbi kötőhely jelölhető [82, 83]. Továbbá, míg az NBD2-ből könnyen kimosható a radioaktív izotóppal jelölt ligand, addig az NBD1 többszöri mosást követően is megtartja, és csak igen lassan, több perces időállandóval ( $\tau = 15 \pm 2\ \text{min}$ ), veszíti el a kötött 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP-t. Ez az időállandó nagyságrendekkel hosszabb a 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP-ben kapuzó CFTR csatorna ciklusidejénél ( $\tau_b + \tau_{ib}$ ) [83]. Az ABC fehérjék konzervált NBD-inek hidrolitikus aktivitása a pirofoszfát láncot stabilizáló Walker A lizin [185, 186], a magnézium iont koordináló Walker B aszpartát [185, 187, 188], vagy a katalitikus karboxilátként szolgáló Walker B glutamát [65, 66, 189] oldallánc mutációival nagy mértékben lassítható vagy megszüntethető. A CFTR esetében az NBD2 e pozícióinak mutációi (K1250A, D1370N és E1371S/Q) – a  $\text{VO}_4^{3-}$ -hoz és a nem hidrolizálható ATP analógokhoz hasonlóan – nyitvarekesztik a csatornát, míg az NBD1 homológ pozícióiban elhelyezett mutációk (K464A, D572N és S573E) nincsenek hatással a burst-hosszra [158]. Ezen biokémiai és elektrofiziológiai kísérletek alapján megállapítható, hogy az 1-es kötőhely stabilan köti az ATP-t, anélkül hogy elhidrolizálná azt, valamint, hogy e kötőhely nukleotid-kötött állapotának élettartama túlságosan hosszú ahhoz, hogy megfeleltethető legyen a CFTR fiziológiás kapuzási ciklusának egyes állapotaival. A kapuzási konformációváltások tehát a 2-es kötőhely gyors hidrolitikus ciklusához kötődtek.

ATP és  $\text{VO}_4^{3-}$  vagy  $\text{BeF}_3$  együttes alkalmazása esetén a WT Mdl1p bakteriális ABC transzporter (az eukarióta sejtek antigénfeldolgozásában szerepet játszó TAP bakteriális homológja) NBD-i ATP koncentráció-függő módon stabil dimert alkotnak [66]. A Walker B glutamát mutációi miatt hidrolitikus aktivitásukat elvesztett bakteriális ABC domének (MJ0796/E171Q, MJ1217/E179Q [65], Mdl1p/E599Q [66], GlcV/E166Q [58]) ATP jelenlétében szintén stabil dimereket alkotnak, amelyeket a dimer érintkezési felszínén kötött ATP molekulák tartanak össze [56]. Mivel a CFTR NBD2-jének homológ



mutációi (E1371S/Q) a csatornát nyitvarekesztik, valószínűsíthető volt, hogy a dimerizált NBD szerkezet megfeleltethető a CFTR nyitott konformációjának.

A CFTR NBD2 Walker-A treoninjével (T1246) és az NBD1 signature szekvenciájától C-terminálisan található argininnel (R555) homológ aminosavak oldalláncai az ATP-t kötött NBD dimer kristályszerkezetekben hidrogén hidat alkotnak, amelyekben az arginin hidrogén donorként, míg a szerin vagy treonin hidrogén akceptorként szolgál [56, 57]. Az ABC fehérjék evolúciója során e pozíciók aminosavai nem egymástól függetlenül, hanem közös evolúciós nyomás alatt fejlődtek: a konzervált hidrogén híd megőrzése érdekében hosszabb hidrogén donor oldallánccal (arginin) szemben általában rövidebb oldalláncú akceptor (szerin vagy treonin), míg rövidebb hidrogén donor oldallánccal (lizin) szemben hosszabb oldalláncú akceptor (aszpartát) található [190].

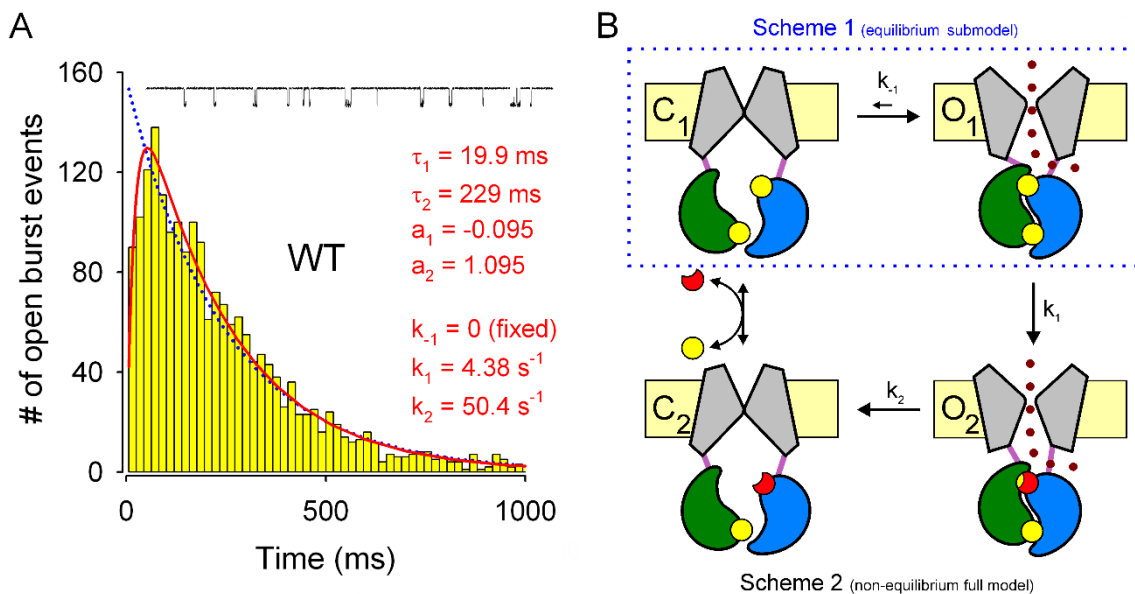
A donor és akceptor atomok optimális távolságának megzavarása – akár a donor oldallánc rövidítésével (R555K), akár az akceptor oldallánc meghosszabbításával (T1246N) – megakadályozza a hidrogén híd kialakulását, az R555K-T1246N dupla mutánsban azonban a donor és akceptor atomok optimális távolsága helyreáll, lehetővé téve a hidrogén híd kialakítását. Ezen CFTR mutációk ATP-függő kapuzásra kifejtett hatásainak a termodinamikai mutáns ciklus módszerrel (lásd 3.3.4 fejezet) történő elemzése igazolta, hogy az 555-ös és 1246-os oldallánccok a csatorna zárt állapotában nem érintkeznek, nyitott állapotában viszont hidrogén híd kapcsolja őket össze, amely már az átmeneti állapotban kialakul [190]. Ezek a kísérletek tehát igazolták, hogy a CFTR zárt pórusa disszociált, nyitott pórusa pedig dimerizált NBD konformációval társul, amit további független kísérletes megközelítések is megerősítettek. A NBD-k érintkezési felszínein elhelyezett cisztein oldallánccok a csatorna nyitott állapotában nem, csak zárt állapotában elérhetők MTS-reagensek számára [191]. A 2-es kötőhely szemközti felszínein elhelyezett szulfhidril csoportok (S549C, S1248C) Cu(II)(o-fenantrolin)<sub>2</sub>-nal történő keresztkötése nyitott állapotba rekeszti a csatornát [192]. A CFTR nyitási lépésének átmeneti állapotát igen magas aktivációs entrópia jellemzi, amit a dimerizáló NBD-k érintkezési felszíneiről kiszoruló rendezett hirdátburkok megbomlása magyarázhat [193].

Az egyes fehérje régiók elmozdulásának időbeli sorrendjét összehasonlítva a CFTR megnyílása mögött meghúzódó konformációváltozás részletesen is

feltérképezhető. Az elmozdulási sorrendek meghatározása azon alapul, hogy – amennyiben a kapuzás mechanizmusa egyensúlyi – a fehérje molekula korán elmozduló régióinak mutációi elsősorban a nyitási, a később elmozdulókéi a záródási sebességet befolyásolják [194-196]. Az egyensúlyi kapuzást mutató, nem-hidrolitikus D1370N mutáns háttérkonstrukcióban végzett kinetikai elemzések szerint a nyitási átmeneti állapotban a 2-es kötőhely Walker A motívumának 1246-os treoninja már befejezte mozgását, a második csatoló hélix 275-ös tirozinja éppen mozgásban van, a TM6 hélix 348-as metioninja azonban még nem mozdult el [197]. Ezek alapján egy a citoszolikus oldal felől az extracelluláris oldal felé terjedő konformációs hullám rajzolódik ki. Az átmeneti állapotban – a korábban ismertetettekkel egybevetve – az NBD dimer ugyan már kialakult, de a pórus még zárva van. A CFTR lassú nyitási sebességét okozó kiugróan magas aktivációs szabadentalpia [193] az NBD és TMD doméneket összekötő, az átmeneti állapotban éppen mozgásban lévő, csatoló hélixekben ébredő molekuláris feszülésként értelmezhető.

A nyitott CFTR záródása két egymástól eltérő útvonalon keresztül mehet végbe (**7. B ábra**). Az egyik lehetőség az NBD dimer spontán disszociációja, amikor a csatorna záródása ( $k_{-1}$  sebességi állandó) a megnyílással azonos kinetikai útvonalon, de azzal ellentétes irányban lejátszódó folyamat. Ebben az esetben a zárt ( $C_1$ ) és nyitott ( $O_1$ ) állapotok egymással termodinamikai egyensúlyra törekcsenek. Ezt a törekvést zavarja meg a másik útvonal, amely két egymást követő irreverzibilis lépés láncolata. A nyitott csatornában a 2-es kötőhelyen bezárt ATP hidrolízise ( $O_1 \rightarrow O_2$ ) destabilizálja az NBD dimert, és ezzel gyorsítja a dimer szétesését ( $O_2 \rightarrow C_2$ ). Ilyenkor a csatorna a megnyílástól független, attól eltérő kinetikai útvonalon keresztül záródik be. A kétféle záródás gyakoriságának arányát a prehidrolitikus dimer disszociációjának és a hidrolízis sebességének viszonya határozza meg.

Miután az ATP hidrolízis sebességéhez képest ( $k_{\text{kat(CFTR)}} = 0.5-1 \text{ s}^{-1}$  [167]) az igen stabil prehidrolitikus NBD dimer spontán disszociációja lassú folyamat, várható hogy steady-state körülmények között a WT CFTR csatorna a termodinamikai egyensúlytól távol kapuzik. Ezt valószínűsítik, hogy a CFTR kapuzásának ciklusideje közel megegyezik a biokémiai mérésekben meghatározott ATPáz aktivitással [167], továbbá, hogy alacsony frekvencián szűrt CFTR áram regisztrátumokon a burst-ökön belül két eltérő vezetőképességű állapot különíthető el, amelyek a mikroszkópikus reverzibilitás



**7. ábra: WT CFTR csatornák burst eloszlása igazolja a ciklikus kapuzási sémát [159]**

**A**, 2 mM ATP-ben kapuzó egyedi WT CFTR csatorna reprezentatív árama (*font*) és 1441 burst esemény időtartamainak eloszlását szemléltető histogram. A kapott eloszlás egyensúlyi (**B** panel, 1-es séma), illetve ciklikus (**B** panel, 2-es séma;  $k_{-1}$  nullára rögzítve) modell szerinti maximum likelihood illesztéseinek eredményét a *pontozott kék*, illetve *folytonos piros görbe* szemlélteti. A ciklikus modell illesztett paramétereit *piros számokkal* feltüntette.

**B**, Az **A** panelen vizsgált burst-hossz eloszlás maximum likelihood illesztéséhez használt egyensúlyi (1-es séma, *kék pontozott vonallal bekeretezve*) és ciklikus kapuzási modell (2-es séma) sematikus ábrája, amely megkülönbözteti a 2-es kötőhelyben ATP-t ( $C_1$  és  $O_1$  állapotok, felső sor) és ADP-t ( $C_2$  és  $O_2$  állapotok, alsó sor) kötő zárt és nyitott állapotokat. *Sárga*, plazmamembrán; *szürke*, TMD-k; *zöld*, NBD1; *kék*, NBD2; *sárga*, ATP; *piros*, ADP.

szabályait megsértve szigorúan egyféle sorrendben követik egymást; a kétféle nyitott konformáció közötti átmenet szorosan kapcsolt a 2-es kötőhelyben kötött ATP hidrolíziséhez [198, 199]. A lineáris, egyensúlyi és a ciklikus, nem egyensúlyi kapuzási modellek egyértelműen elkülöníthetők egyedi csatornás mérések burst analízisével, azaz a burst-hosszok eloszlásának a különböző, feltételezett kapuzási modellel történő maximum likelihood illesztésével [200, 201] (lásd 3.3.3 fejezet).

A WT CFTR kapuzásának egyensúlyi  $C \rightleftharpoons O$  modellje (**7. B ábra**, *kék pontozott vonallal bekeretezve*) [202, 203] egyszerű exponenciális burst-hossz eloszlást (**7. A ábra**, *kék szaggatott vonal*), míg az irreverzibilis, ciklikus kapuzási modell (**7. B ábra**) két komponensű csúcsos eloszlást jósol, amelynek egyik komponense negatív előjelű

(7. *A ábra*, piros folytonos vonal). Az utóbbi modell szignifikánsan jobban illeszkedik a WT CFTR csatornák burst eloszlására [159], és az illesztés segítségével becsülhetők a  $k_1$  és  $k_2$  sebességi állandók. A  $k_1$  sebességi állandó hozzávetőleges becslésére alkalmas modellt kínálnak az ATP hidrolízisre képtelen mutánsok. A különböző nem-hidrolitikus mutánsok makroszkópos záródási sebességei ugyan jelentős mértékben eltérhetnek egymástól ( $0.03-0.5 \text{ s}^{-1}$ ), azonban mindenképpen lényegesen kisebbek a hidrolitikus útvonal  $O_1 \rightarrow O_2$  lépésének sebességénél ( $k_1 \sim 4 \text{ s}^{-1}$ ) (7. *A ábra*). Ezek alapján a WT CFTR burst-jeinek túlnyomó többsége ATP hidrolízissel végződik.

Bizonyos mutációkról és farmakológiai modulátorokról feltételezik, hogy megbontják a hidrolitikus és kapuzási ciklusok WT csatornában fennálló kapcsoltságát. A K464A mutáció a  $k_1$  sebességi állandó csökkentésével és a  $k_{-1}$  állandó növelésével kb. 20%-ra, a nem-hidrolitikus mutációk ( $k_1 = 0$ ) pedig 0%-ra, csökkentik a hidrolízissel végződő burst-ök arányát [159]. Továbbá, a W401F mutációról [182] és az ivacaftorról [204] is leírták, hogy ATP koncentráció-függő módon a burst-ök meghosszabbodásához vezethetnek. Ennek alapján feltételezték, hogy ezen esetekben a 2-es kötőhelyen a hidrolízis végtermék ADP újabb ATP-re történő kicserélődése a pórus bezáródása nélkül is végbemehet ("reentry ciklus"), így egy burst alatt több mint egy ATP molekula kötése és hidrolízise is lehetséges [205].

A biokémiai mérésekből ismert [82, 83] ATP-kötőhelyek közti különbségek eltérő affinitású ATP analógok ( $N^6$ -(2-feniletil)-adenozin-trifoszfát (P-ATP) vs. ATP) kicserélődési sebességeinek elektrofiziológiai nyomonkövetésével is megerősítést nyertek [206]. A nagy affinitású P-ATP analóg gyorsítja a nyitási, és csökkenti a záródási sebességet, azonban a kádolat ATP-jének hirtelen P-ATP-re történő kicserélésekor e két hatás eltérő időállandóval jelenik meg. A nyitási sebesség a nukleotidok kicserélését követően azonnal megnő, valószínűleg a 2-es kötőhelyen történő gyors nukleotid kicserélődés következtében. A burst-ök megnyúlása azonban csak ~50 másodperces késéssel észlelhető. Ez a késés valószínűleg a degenerált 1-es kötőhely lassabb nukleotid cseréjét tükrözi. Az 1-es kötőhelyen kötött nukleotid e lassú kicserélődésének sebességét nem csak az NBD1 A-hurok konzervált aromás oldalláncának, hanem a kompozit kötőhely másik felét alkotó NBD2 signature szekvenciájának mutációi is befolyásolják. Miután ez utóbbi motívum csak a zárt dimerben lép kölcsönhatásba az ott kötött nukleotiddal, feltételezhető, hogy a pórus záródásakor az NBD dimer csak részlegesen

nyílik szét, és az 1-es kötőhely számos kapuzási cikluson keresztül intakt, zárt állapotban marad. Ezt az elképzelést alátámasztja az 1-es kötőhely szemközti felszínein található aminosavak kölcsönhatási energiáinak változatlansága is a kapuzási ciklus során [207]. Ugyanakkor a degenerált kötőhely valamiképpen mégis szerepet kell hogy játszon a kapuzás energetikájában, tekintettel arra, hogy különféle perturbációi – pl. a K464A mutáció vagy P-ATP kötődése ATP helyett (lásd fent), illetve az NBD2 signature szekvencia mutációi – jelentős hatással vannak a kapuzás kinetikájára.

A WT CFTR csatornák az ATP-vezérelt kapuzási ciklus mellett rendkívül ritkán ATP hiányában is megnyílnak [158, 174, 175]. Ennek a "spontán" kapuzásnak egyelőre ismeretlen a molekuláris mechanizmusa. A folyamat megértése több szempontból is jelentős lenne. Egyrészt, amennyiben a spontán nyitások az NBD dimer kialakulásától függetlenül jönnek létre, ez alátámasztaná a szoros NBD-TMD csatolást megkérdőjelező ú.n. "allosztérikus" kapuzási modelleket, amelyek csak energetikai csatolást feltételeznek ezen domének mozgásai között [208, 209]. Másrészt, a viszonylag gyakori G551D CF mutáció következtében a csatornáknak csak ez a spontán kapuzása maradt meg [210], amit a terápiásan alkalmazott ivacaftor drog [211, 212] – csakúgy, mint a WT [204] és számos más CF-t okozó mutációt tartalmazó [213] csatorna esetében az ATP-függő kapuzást is – jelentős mértékben stimulál [214]. A spontán kapuzás vizsgálatát eddig korlátozta annak elenyészően alacsony nyitvatartási valószínűsége, amely túl alacsony ahhoz, hogy megbízhatóan mérhető legyen. Azonban egyes pontmutációk, mint pl. a TM6 hélix intracelluláris határán elhelyezkedő 355-ös prolin és a harmadik intracelluláris hurokban (a TM8 és TM9 hélixek között) található 978-as lizin mutációi (P355A és K978C) [215, 216] nemcsak jelentős mértékben növelik a csatornák spontán aktivitását, de hatásaik additívnak is bizonyultak [216].

## 2 Célkitűzések

### 2.1 A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata

A WT CFTR csatornák, az ATP-vezérelt kapuzási ciklus mellett, rendkívül ritkán ATP hiányában is megnyílnak [175] (**8. a ábra**). Azonban az ennek háttérében álló molekuláris mechanizmus ismeretlen. Kísérleteink elsődleges célja volt meghatározni, hogy ezen spontán megnyílások, az ATP-függő aktivitáshoz hasonlóan, az NBD-k dimerizációjához kapcsolódnak, vagy attól független események (**8. b ábra**).

### 2.2 A degenerált ATP-kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltozásainak vizsgálata

Annak ellenére, hogy az 1-es ATP-kötőhely érintkezési felszínei feltételezhetően számos kapuzási cikluson keresztül zárva maradnak [206, 207], e kötőhely valamiképpen mégis szerepet kell hogy játszon a kapuzás energetikájában, mert perturbációi jelentős mértékben befolyásolják azt. Az 1-es kötőhely NBD1 felőli oldalán elhelyezett K464A mutációról részletesen ismert, hogyan befolyásolja a kapuzás kinetikáját [159]. Azonban a kötőhely másik oldalát alkotó NBD2 signature szekvenciában elhelyezett H1348A mutációnak (**13. B-D ábra**) [207], illetve a kötőhelybe zárt ligand szerkezeti perturbációjának (P-ATP, ATP helyett) (**12. E-G ábra**) [206], záródást lassító mechanizmusai ismeretlenek. Célunk volt, hogy betekintést nyerjünk ezen két utóbbi perturbációnak a csatorna energetikájára kifejtett hatásaiba, és ezeken keresztül következtethessünk arra, mely kapuzási lépések járnak együtt az 1-es kötőhely mozgásaival.

### 3 Módszerek

#### 3.1 Molekuláris biológia

A humán WT CFTR-t pGEMHE bakteriális vektorba klónoztuk [217]. A szükséges pontmutációkat a Stratagene QuikChange kit-tel, a forgalmazói előírásokat követve hoztuk létre. Az elkészített konstruktok genetikai kódját teljes szekvenálással (LGC Genomics) ellenőriztük. A plazmidokat NheI restrikciós endonukleázzal linearizáltuk, majd *in vitro* transzkripcióval (Ambion, mMessage mMachine Kit, T7 polimeráz (Applied Biosystems)) állítottunk elő cRNS-t, amit felhasználásig -80 °C-on tároltunk.

#### 3.2 Elektrofiziológia

##### 3.2.1 *Xenopus laevis* petesejtek preparálása és injektálása

A mérésekhez felhasznált petesejteket Dél-Afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) petefészek-lebenyéből kollagenázos (Gibco Collagenase Type I) emésztéssel izoláltuk [217]. Az izolált petesejteket 82 mM NaCl-t, 2 mM KCl-t, 1 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 5 mM HEPES-t (pH NaOH-val 7.5-re beállítva), 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>-t és 50 µg/ml gentamicin-szulfátot tartalmazó béka-Ringer oldatban 18°C-on tároltuk. Az egyedi-csatornás vagy makroszkópos méréseknek megfelelő expressziós szint eléréséhez a petesejteket 0.1-10 ng CFTR cRNS-sel injektáltuk, és a méréseket 1-3 napos 18 °C-os inkubáció után végeztünk.

##### 3.2.2 Izolált membrános inside-out patch clamp mérések

A petesejtek membrán ioncsatorna áramait a sejthártya és az 1.5-4 MΩ ellenállású boroszilikát kapilláris közötti több száz GΩ-os ellenállás kialakulása után kiszakított membránfoltokból vezettük el. A pipetta oldat 136 mM N-metil-D-glukamin(NMDG)-kloridot, 2 mM MgCl<sub>2</sub>-t és 5 mM HEPES-t tartalmazott (pH NMDG-vel 7.4-re beállítva). A patch pipetta hegyét, a membránfolt kiszakítását követően, a folyamatosan áramló kádolatba merítettük. A kádolat 134 mM NMDG-Cl-t, 2 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 5 mM HEPES-

t és 0.5 mM EGTA-t (pH NMDG-vel 7.1-re beállítva) tartalmazott. A K978C mutácót tartalmazó mérésekhez, a cisztein oxidációját megelőzendő, a kádoldatot további 3 mM ditionitritollal egészítettük ki. A 2 mM, vagy a K1250A mutációt tartalmazó csatornák esetében 10 mM MgATP-t (Sigma-Aldrich) tartalmazó oldatokat a -20 °C-on tárolt 400 mM-os vizes törzsoldat (pH NMDG-vel 7.1-re beállítva) hígításával állítottuk elő. A P-ATP Na<sup>+</sup> sójának 10 mM-os vizes törzsoldatát (Biolog LSI) -80 °C-on tároltuk és 10 μM-os, vagy a K1250A mutáns esetében 50 μM-os végkoncentrációban alkalmaztuk. A mérések megkezdésekor a CFTR csatornákat a citoszolikus felszínen alkalmazott 300 nM, marha szívből származó PKA katalitikus alegységének (Sigma-Aldrich) egy-két perces alkalmazásával foszforiláltuk. A kináz elvonását követően a csatornák részlegesen defoszforilálódnak, és ez az állapot azután több tíz percen keresztül stabil marad [140]. Kísérleteinket ezeken a részlegesen defoszforilált csatornákon végeztük. Számítógépezérelt szelepek (Heka) segítségével 20-50 ms-os időállandóval tudtuk megváltoztatni a kádoldat összetételét. Méréseinket 25 ± 1 °C-on végeztük. Az áramokat 2 kHz-en szűrtük (Axopatch 200B, Molecular Devices) és 10 kHz-en digitalizáltuk (Digidata 1322A, Pclamp10, Molecular Devices). Az egyedi-csatornás méréseket +80 mV-os pipetta potenciálon ( $V_m = -80$  mV) mértük. Mivel a CFTR kapuzása közel független az alkalmazott feszültségtől [218], a makroszkópos áramokat -20 és -80 mV közötti membránpotenciálokon mértük.

A P355A-K978C CFTR csatornák makroszkópos áramai esetén az alapvonal megállapítására a kádoldat klorid tartalmát több alkalommal, rövid időre glükonáttal helyettesítettük (**8. c ábra, piros sávok**). Ilyen körülmények között -80 mV-on nem észlelhető CFTR áram (**9. ábra, feszültség-áram függvény**). A spontán aktivitás kinetikai elemzését néhány aktív csatornát tartalmazó membránfoltokon végeztük. A membránfoltokban található aktív csatornák számának megállapítására a teszt periódus előtt és után ~2.5 perc időtartamokra 2 mM ATP-t alkalmaztunk, ami magas nyitvatartási valószínűséget eredményezett (**10. és 11. ábrák**; P<sub>o</sub> ATP jelenlétében). Mivel az 1-es kötőhely ATP elvonást követően lassabban veszíti el kötött nukleotidját, a ~5 perc időtartamú tesztszakasz első 1-1.5 percét nem használtuk fel kinetikai elemzésre. Az elemzés kezdőpontját minden mérés esetében egyedileg állapítottuk meg.



### 3.3 Adatelemzés

#### 3.3.1 Makroszkópos mérések kiértékelése

##### 3.3.1.1 Áramlecsengések exponenciális illesztése

A makroszkópos záródási sebességet az ilyen áram nukleotid elvonását követő lecsengési időállandójának inverzeként definiáltuk, és egyszerű exponenciális illesztésével (nem-lineáris legkisebb négyzetek módszere, pClamp10) határoztuk meg. A nem-hidrolitikus mutációkat (K1250A vagy E1371S) tartalmazó csatornák nukleotid elvonást követő lecsengései gyakran jobban illeszthetők dupla exponenciálissal (**14. ábra**):  $I(t) = I_0 \cdot (A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + (1-A_1) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}})$ . Az ilyen esetekben két burst populáció párhuzamos jelenléte feltételezhető, amelyek átlagos burst-hossza ( $\tau^*$ ), a  $\tau^* = \frac{\tau_1 \cdot \tau_2}{(A_1 \cdot \tau_2 + A_2 \cdot \tau_1)}$  egyenlettel számítható; ennek alapján az átlagos záródási sebesség  $\frac{1}{\tau^*}$ -ként definiálható [207].

##### 3.3.1.2 Feszültség-áram diagramok illesztése a Goldman-Hodgkin-Katz egyenlettel

Az aszimmetrikus ionkörnyezetben -80 és +80 mV között mért, +80 mV-ra normált mérési pontokat a Goldman-Hodgkin-Katz áram egyenlettel illesztettük:

$$f = K \cdot V_m \frac{([G]_i \cdot p_{Grel} \cdot [Cl]_o \cdot e^{-\frac{z \cdot F \cdot V_m}{R \cdot T}})}{1 - e^{-\frac{z \cdot F \cdot V_m}{R \cdot T}}}, \text{ ahol } K = \frac{p_{Cl} \cdot z^2 \cdot F^2}{R \cdot T}, p_{Cl} \text{ a } Cl^- \text{ permeabilitása } \left(\frac{m}{s}\right), z \text{ az ion}$$

értékűsége, F a Faraday-állandó  $\left(96\,500 \frac{Q}{mol}\right)$ ,  $V_m$  a membránpotenciál (V), R az egyetemes gázállandó  $\left(8.314 \frac{J}{mol \cdot K}\right)$ , T az abszolút hőmérséklet (K),  $[G]_i$  az intracellulárisan alkalmazott glükonát koncentrációja  $\left(\frac{mol}{l}\right)$ ,  $[Cl]_o$  az extracellulárisan alkalmazott klorid koncentrációja  $\left(\frac{mol}{l}\right)$  és  $p_{Grel}$  a glükonát klorid ionokhoz viszonyított relatív permeabilitása.

### 3.3.1.3 Koncentráció-hatás diagramok illesztése a Michaelis-Menten egyenlettel

A különböző aktiváló ligandok dózis-hatás összefüggéseit a Michaelis-Menten egyenlettel illesztettük:  $\frac{I_{[L]}}{I_{\max}} = \frac{[L]}{[L]+K}$ , ahol  $[L]$  a ligand koncentrációja,  $\frac{I_{[L]}}{I_{\max}}$  az adott ligand koncentráció által kiváltott relatív áram és  $K$  a ligand látszólagos affinitása.

### 3.3.2 Steady-state mikroszkópikus mérések kinetikai elemzése

Az elemzendő szakaszokat 50 Hz-es szűrés és alapvonal korrekció után félamplitúdó módszerrel idealizáltuk, azaz előállítottuk a kapuzási események időben rendezett listáját, amelyben egy "eseményt" egy adott vezetési szinten megszakítás nélkül eltöltött periódus jelent, és az esemény során egyidejűleg nyitva tartó csatornák száma ("vezetési szint", level,  $l$ ) és időtartama ( $t$ , time) jellemez; egy  $k$  számú eseményt tartalmazó eseménylista formája:  $l_1, t_1; l_2, t_2; l_3, t_3 \dots l_k, t_k$ . Ezen eseménylistából számoltuk a nyitvatartási valószínűséget, a  $P_o = \frac{\sum_{i=1}^k l_i \cdot t_i}{N \cdot T}$  összefüggés alapján, ahol  $N$  a membránfoltban jelenlevő aktív csatornák száma és  $T$  az elemzett szakasz teljes időtartama. Mivel a regisztrátumokon jól elkülöníthető egy rövid ( $\sim 10$  ms) és egy hosszú ( $> 1$  s) élettartamú zárt esemény populáció, a kapuzási kinetikai paramétereket a zárt-nyitott-blokkolt (C-O-B) kapuzási séma illesztésével határoztuk meg. E célból az egyes vezetési szintekhez tartozó események időtartamainak hisztogramjait együttesen illesztettük a fenti sémához maximum likelihood módszerrel: a 6 ms-nál rövidebb események ki lettek zárva az elemzésből, hogy a szűrő holtideje ne torzítsa az illesztést. A kapott  $r_{CO}$ ,  $r_{OC}$ ,  $r_{OB}$ , és  $r_{BO}$  mikroszkópikus sebességi állandókból az átlagos burst- és interburst-hosszak a  $\tau_b = \left(\frac{1}{r_{OC}}\right) \cdot \left(1 + \frac{r_{OB}}{r_{BO}}\right)$  és  $\tau_{ib} = \frac{1}{r_{CO}}$  összefüggések alapján határozhatók meg. A nyitási és zárási sebességeket  $\frac{1}{\tau_{ib}}$  és  $\frac{1}{\tau_b}$  formában definiáltuk.

### 3.3.3 Egyedi-csatornás mérések burst időtartam eloszlásainak elemzése

A több csatornát tartalmazó steady-state mikroszkópos mérések csak a burst-ök átlagos időtartamáról nyújtanak információt, az időtartamok eloszlásáról azonban nem. Ez utóbbi csak egyetlen aktív csatornát tartalmazó membránfoltokban vizsgálható.

Egyetlen aktív csatorna áramregisztrátumából származó eseménylistákban a Jackson és munkatársainak módszerével [219] definiált küszöb értéknél ("cutoff") rövidebb zárt eseményeket kitöröltük, azaz az ilyen események és az azokat körülvevő nyitott események időtartamait egyetlen nyitott eseménybe olvasztottuk. Az ilyen módszerrel elkülönített burst-ök tartózkodási idő eloszlásait egyszerű exponenciális (**19. A-B ábra, kék pontozott vonalak**) eloszlással vagy a **19. C ábrán** látható ciklikus modellel (**19. A-B ábra, piros folytonos vonalak**;  $k_1$  0-ra rögzítve) illesztettük, a maximum likelihood módszerrel [200]. A 12 ms-nál rövidebb eseményeket kizártuk az elemzésből. A burst-hossz eloszlásoknak a két illesztett modell szerinti valószínűség sűrűség függvényei:  $f(k,t) = k \cdot e^{-k \cdot t}$  és  $f(k_1, k_2, t) = \left( \frac{k_1 \cdot k_2}{k_2 - k_1} \right) \cdot (e^{-k_1 \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t})$ . A két modellnek a kísérletes eredményekre való illeszkedését a log-likelihood ratio teszt segítségével hasonlítottuk össze [201].

### 3.3.4 Termodinamikai mutáns ciklus analízis

A kiválasztott pozíció párok kölcsönhatási energiáiban a kapuzási ciklus egyes lépései során bekövetkező változásokat mutáns ciklus analízis segítségével vizsgáltuk. Egy fehérje A és B állapotai közötti konformációváltozás során az X és Y aminosavak közötti energetikai kapcsoltságot (kölcsönhatási energia változást,  $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ ) úgy definiáljuk, mint a mutáns ciklus két párhuzamos oldalán, azaz az X és X' hátterekben, a fehérje B állapotának A állapotához képesti stabilitásában az  $Y \rightarrow Y'$  mutáció hatására bekövetkező változások ( $\Delta\Delta G$ ) különbségét. Pl.:

$$\Delta\Delta G_{\text{int}} = \Delta\Delta G_{\text{B-A}}^{0(X'Y \rightarrow X'Y')} - \Delta\Delta G_{\text{B-A}}^{0(XY \rightarrow XY')} = \Delta\Delta G_{\text{B-A}}^{0(XY' \rightarrow X'Y')} - \Delta\Delta G_{\text{B-A}}^{0(XY \rightarrow X'Y')}$$

Ha az A és B állapotok a fehérje stabil alapállapotai, akkor a B állapotnak az A állapothoz viszonyított relatív stabilitása az egyensúlyi állandóból ( $K_{\text{eq}}$ ) mint  $\Delta G_{\text{B-A}}^0 = -kT \ln K_{\text{eq}}$  számítható (ahol  $k$  a Boltzmann állandó,  $T$  az abszolút hőmérséklet), így

$$\Delta\Delta G_{\text{B-A}}^{0(X'Y \rightarrow X'Y')} = \Delta G_{\text{B-A}}^{0(X'Y')} - \Delta G_{\text{B-A}}^{0(X'Y)} = -kT \ln \left( K_{\text{eq}}(X'Y') / K_{\text{eq}}(X'Y) \right), \text{ és}$$

$$\Delta\Delta G_{\text{B-A}}^{0(XY \rightarrow XY')} = \Delta G_{\text{B-A}}^{0(XY')} - \Delta G_{\text{B-A}}^{0(XY)} = -kT \ln \left( K_{\text{eq}}(XY') / K_{\text{eq}}(XY) \right).$$

Ioncsatornák esetében ilyen stabil alapállapotok lehetnek a zárt és a nyitott konformációk. Ebben az esetben, az egyensúlyi állandó a nyitvatartási valószínűségből számítható:  $K_{\text{eq}} = \frac{P_o}{1-P_o}$  (**11. h ábra**).

$A \rightarrow T^\ddagger \rightarrow B$ , konformációváltozás során, ahol  $T^\ddagger$  az átmeneti állapot, az X és az Y csoportok közötti kapcsoltságban az  $A \rightarrow T^\ddagger$  átmenet során bekövetkező változásai is vizsgálhatók. Ilyenkor a mutációknak az aktivációs szabadentalpiáját magasságára kifejtett hatásai a reakciósebességi állandók relatív változásaiból, az egyensúlyi állandó esetében látottakkal analóg módon, számolhatók:

$$\Delta\Delta G_{T-A}^{0(X'Y \rightarrow X'Y')} = -kT \ln(r_{AB}(X'Y') / r_{AB}(X'Y)), \text{ és}$$

$$\Delta\Delta G_{T-A}^{0(XY \rightarrow XY')} = -kT \ln(r_{AB}(XY') / r_{AB}(XY)),$$

ahol a  $r_{AB}$  az A és B állapotok közötti sebességi állandó, pl., ioncsatornák esetében a nyitási ( $r_{CO}$ ) és zárási ( $r_{OC}$ ) sebességi állandók. Az energetikai kapcsoltság ebben az esetben az egyik pozíció mutációjának az aktivációs szabadentalpiáját magasságára a mutáns ciklus két párhuzamos oldalán kifejtett hatásainak különbsége (**11. i-j ábra**).

A  $\Delta\Delta G$  értékeket átlag  $\pm$  standard hiba (standard error of the mean, SEM) formában adtuk meg. A  $\Delta\Delta G^0$  értékek esetén a SEM a következőképpen határozható meg. A  $\Delta\Delta G$  értékek két független valószínűségi változó,  $u$  és  $v$ ,  $\Delta\Delta G = kT \ln(u/v)$  alakú függvényei, ahol  $u$  és  $v$  két szerkezetileg különböző csatorna egy adott kapuzási paramétere ( $K_{\text{eq}}$ ,  $r_{CO}$ , vagy  $r_{OC}$ ). Feltételezve, hogy  $u$  és  $v$  normál eloszlásúak  $m$  ( $m_u$ ,  $m_v$ ) átlaggal és  $\sigma^2$  ( $\sigma_u^2$ ,  $\sigma_v^2$ ) varianciával, az  $\ln(u/v)$  varianciája az alábbiak szerint számolható:

$$\text{var}(\ln(u/v)) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \ln^2(u/v) \cdot \frac{1}{2\pi} \cdot e^{-\frac{(u-m_u)^2}{2\sigma_u^2}} \cdot e^{-\frac{(v-m_v)^2}{2\sigma_v^2}} dudv - \left( \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \ln(u/v) \cdot \frac{1}{2\pi} \cdot e^{-\frac{(u-m_u)^2}{2\sigma_u^2}} \cdot e^{-\frac{(v-m_v)^2}{2\sigma_v^2}} dudv \right)^2$$

Ezen integrálok analitikus formában nem állíthatók elő, de az  $\ln(u/v)$  és  $\ln^2(u/v)$  függvények az  $(m_u, m_v)$  vektor körül hatványsorba fejthetők. A másodrendű közelítő függvényeket behelyettesítve az integrálás elvégezhető, és a következő közelítést adja:

$$\text{var}(\ln(u/v)) \approx \frac{\sigma_u^2}{m_u^2} + \frac{\sigma_v^2}{m_v^2} + \frac{1}{2} \cdot \frac{\sigma_u^2}{m_u^2} \cdot \frac{\sigma_v^2}{m_v^2} - \frac{1}{4} \cdot \left( \frac{\sigma_u^4}{m_u^4} + \frac{\sigma_v^4}{m_v^4} \right)$$

A másodrendű közelítések mindaddig elfogadhatóak, amíg  $\sigma_u \ll m_u$  és  $\sigma_v \ll m_v$ ;  $\sigma_x=0.2m_x$  és  $\sigma_y=0.2m_y$  esetén az  $\ln(u/v)$  varianciájának fenti közelítése még viszonylag pontos, így a  $\text{var}(\Delta\Delta G_{B-A}^0)$  értékeket ezzel becsültük. Mivel az egyes csatorna párokon elvégzett kísérletek páronként hasonló számúak voltak (pl.,  $n_{XY} \approx n_{X'Y'}$ ), a SEM számításához azok átlagát használtuk.  $\text{SEM}(\Delta\Delta G_{B-A}^{0(XY \rightarrow X'Y')}) = \sqrt{\text{var}(\Delta\Delta G_{B-A}^{0(XY \rightarrow X'Y')}) / \bar{n}}$ , ahol  $\bar{n} = (n_{XY} + n_{X'Y'}) / 2$ .

Az energetikai kapcsoltság varianciáját az alábbiak szerint számoltuk:  $\text{var}(\Delta\Delta G_{\text{int}}) = \text{var}(\Delta\Delta G_{B-A}^{0(X'Y \rightarrow X'Y')}) + \text{var}(\Delta\Delta G_{B-A}^{0(XY \rightarrow XY')})$ . Mivel a ciklus négy sarkát alkotó csatorna konstrukciókon közel azonos számban végeztük el a kísérleteket ( $n_{XY} \approx n_{X'Y'} \approx n_{XY'} \approx n_{X'Y}$ ), az energetikai kapcsoltság SEM értékét az alábbiak szerint számoltuk:  $\text{SEM}(\Delta\Delta G_{\text{int}}) = \sqrt{\text{var}(\Delta\Delta G_{\text{int}}) / \bar{n}}$ , ahol  $\bar{n} = (n_{XY} + n_{X'Y'} + n_{XY'} + n_{X'Y}) / 4$ .

A fenti mutáns ciklusokkal nyerhető  $\Delta\Delta G_{\text{int}}$  értékeket hagyományosan úgy értelmezik, hogy azok a WT molekulában az X és Y pozíciók közötti kémiai kötés energiájában beálló változást mérik, miközben a molekula az A-ból a B állapotba, vagy egy alapállapotból a  $T^\ddagger$  átmeneti állapotba lép. Ez az értelmezés feltételezi, hogy a WT-ban a két pozíció között fennálló kölcsönhatás mind az egyszeres mutánsokban, mind a dupla mutánsban megszűnik (ez jogos feltételezés pl. az oldalláncok eltávolításakor) [220]. Ha azonban a pozíciók közötti interakció az X'Y' dupla mutánsban helyreáll, akkor a mért  $\Delta\Delta G_{\text{int}}$  a WT-ban található X-Y és a dupla mutánsban található X'-Y' oldalláncpárok kölcsönhatási energia változásainak összege. Az ilyen módon választott mutációk segítségével elért jelerősítés megkönnyíti a jel és a zaj szétválasztását.

### 3.3.5 Statisztika

A közölt adatok legalább 5 mérés átlagát és standard hibáját tükrözik. A statisztikai szignifikancia meghatározása Student t-teszttel történt.

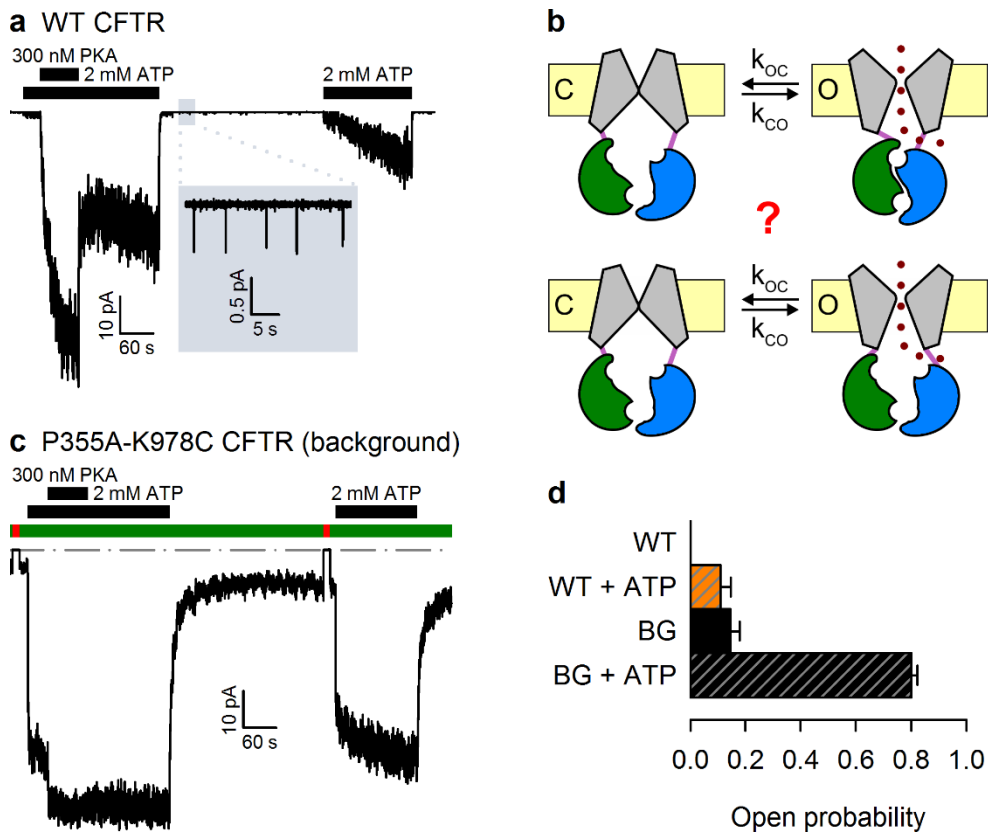
## 4 Eredmények

### 4.1 A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata

#### 4.1.1 A funkcióyeréssel járó mutációk lehetővé teszik a CFTR spontán kapuzásának kvantitatív elemzését

Amíg ATP elvonást követően a WT CFTR csatornák gyorsan bezáródnak (**8. a ábra**), addig a P355A-K978C CFTR csatornák esetében az ATP elvonást követően hosszú ideig fennálló, jelentős klorid áram marad vissza (**8. c ábra**), amely csak a permeábilis klorid ionok impermeábilis glükonát ionokra történő cseréjével szüntethető meg (**8. c ábra, piros sávok**). (WT CFTR csatornák esetében, szimmetrikus klorid környezetben a feszültség-áram diagram mérsékelt befele rektifikációt mutat. Az intracelluláris klorid ionok glükonátra történő cseréjét követően azonban erősen negatív feszültségeken az áram – a Goldman-Hodkin-Katz egyenletet követve – a nullához közelít, így -80 mV-on már nem mérhető jelentős áram [129, 132] (**9. ábra**).)

A WT CFTR csatornák nyitvatartási valószínűségének erőteljes foszforiláció-függését [142, 175] igazolja, hogy PKA alkalmazását megelőzően a WT CFTR csatornák ATP-függő árama igen alacsony, és a PKA elvonását követően szinte azonnal kb. 50%-kal csökken (**8. a ábra**). Ezzel szemben a P355A-K978C CFTR csatornáknál az ATP-vel kiváltott áram már a PKA alkalmazását megelőzően is közel maximális volt, és csak kis mértékben fokozta, illetve csökkentette a PKA adása/elvonása (**8. c ábra**). Mindez magas  $P_o$ -t valószínűsít ATP jelenlétében már a kinázzal történő foszforiláció előtt is (nem foszforilált csatornák), és közel maximálisat PKA jelenlétében (foszforilált csatornák), illetve annak elvonását követően (részlegesen defoszforilált csatornák). A P355A-K978C CFTR csatornák ATP hiányában is jelentős spontán aktivitással rendelkeznek, ami néhány ( $\leq 7$ ) párhuzamosan aktív csatornát tartalmazó membránfoltokban is lehetővé teszi a spontán aktivitás megbízható kvantitatív elemzését (**11. a ábra**); ugyanakkor az ATP jelenlétében tapasztalt magas  $P_o$ -nak köszönhetően az aktív csatornák száma is biztonsággal megállapítható (**10. és 11. a ábrák**). Az előzetesen foszforilált csatornáknál a P355A-K978C háttérmutációk ("background", BG) jelentősen növelték mind a spontán ( $0.000053 \pm 0.000021$  ( $n = 5$ ) vs.  $0.15 \pm 0.03$  ( $n = 21$ ), WT vs. BG) (**8. d ábra**), mind az

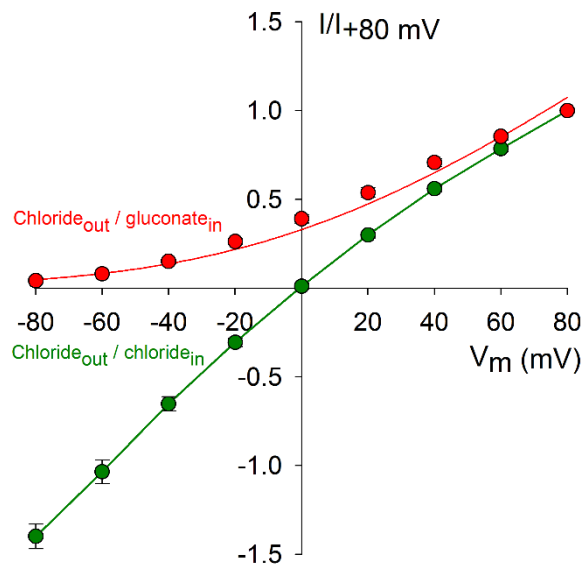


**8. ábra: A P355A-K978C mutáció egyaránt fokozza a spontán és az ATP-függő nyitvatartási valószínűséget**

**a és c,** WT **(a)** és P355A-K978C CFTR (background) **(c)** spontán aktivitását valamint ATP és PKA (fekete sávok) függését szemléltető,  $-80$  mV-on mért, makroszkópos áramok. Az **(a)** panelen a spontán aktivitást egy 30 s hosszú kiemelt szakasz (szürke téglalap) szemlélteti. A **(c)** panelen az alapvonal (szürke szaggatott vonal) megállapítása céljából a kádoldat anionja kloridról (zöld sávok) rövid időtartamokra impermeábilis glükonátra (piros sávok) volt cserélve.

**b,** A vizsgálatunk fő kérdésfeltevését szemléltető sematikus ábra két lehetséges kapuzási mechanizmust szembesít: a csatorna spontán megnyílása a NBD-k dimerizációjához kapcsolt (felső sor) vagy attól független folyamat (alsó sor). TMD-k (szürke), TMD-NBD átmenetet alkotó intracelluláris hurkok (rózsaszín), NBD1 (zöld), NBD2 (kék), plazmamembrán (sárga).

**d,** Spontán (homogén oszlopok) és 2 mM ATP jelenlétében (csíkozott oszlopok) kapuzó WT (narancssárga) és P355A-K978C (background, BG; fekete) CFTR csatornák nyitvatartási valószínűségeinek összehasonlítása ( $n = 5-21$ ).



**9. ábra: A kádolat klorid ionjainak glükonáttal történő helyettesítése -80 mV-on megszünteti a CFTR áramot**

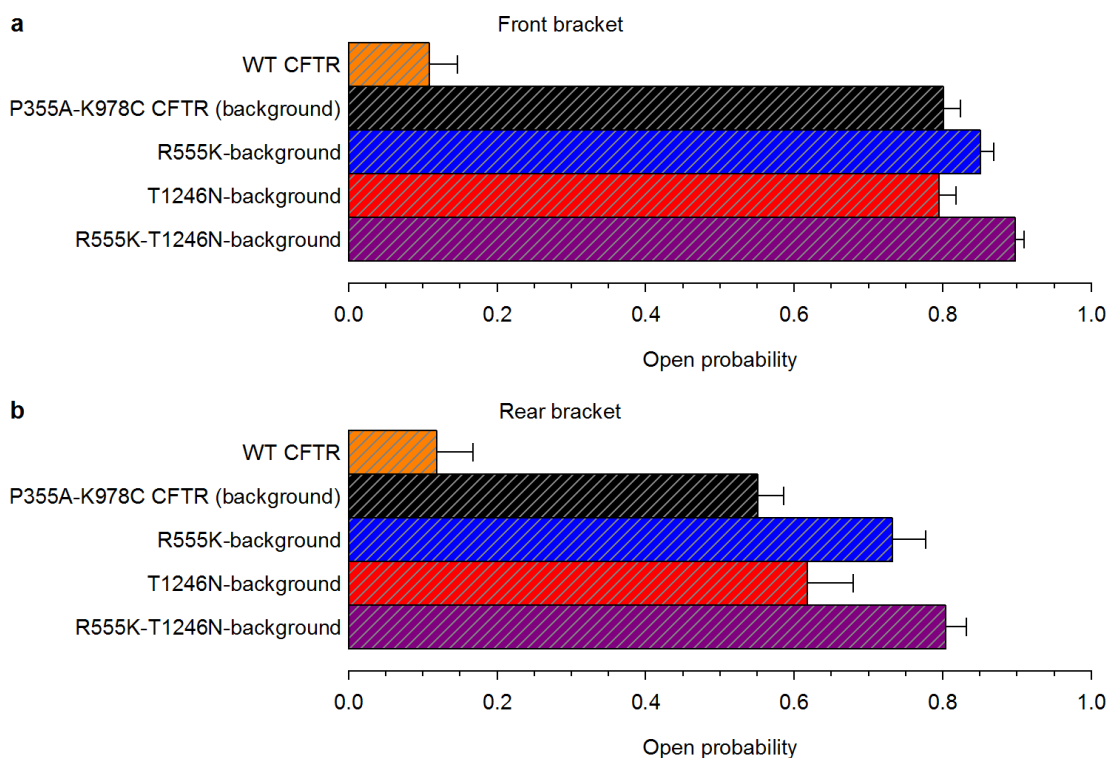
Makroszkópos WT CFTR áramok normált feszültség-áram összefüggésének összehasonlítása klorid<sub>kint</sub>/klorid<sub>bent</sub> (zöld szimbólumok) és klorid<sub>kint</sub>/glükonát<sub>bent</sub> (piros szimbólumok) anionkörnyezetben ( $n = 6-9$ ). Mindkét ionösszetétel esetében a 2 mM ATP-ben mérhető CFTR áramokból levontuk az ATP hiányában mért háttér áramokat. A mintavételezés  $-80$  és  $+80$  mV közötti membránpotenciálokon történt. Az ATP-függő áramokat a  $+80$  mV-on mért áramokhoz normáltuk. A szimmetrikus körülmények között nyert mérési pontok lineáris interpolációval vannak összekötve (zöld vonal), míg az aszimmetrikus mérési körülmények között nyert mérési pontok a Goldman-Hodgkin-Katz egyenlettel lettek illesztve (piros vonal). Szimmetrikus ionösszetétel esetén enyhe befele rektifikáció látható [218].

ATP jelenlétében ( $0.11 \pm 0.04$  ( $n = 6$ ) vs.  $0.80 \pm 0.02$  ( $n = 14$ ), WT + ATP vs. BG + ATP) (8. d ábra, csíkozott oszlopok) mérhető nyitvatartási valószínűséget. A P355A-K978C csatorna tehát alkalmas modellt kínál a CFTR spontán aktivitásának hátterében álló mechanizmus vizsgálatára.

#### 4.1.2 A 2-es ATP-kötőhely szorosán dimerizált a csatorna spontán nyitott állapotában

A WT CFTR csatornában az ATP-függő NBD dimer kialakulása és szétesése a csatorna nyitáshoz, illetve záráshoz kapcsolt: a kanonikus ATP-kötőhely egymással szemközti felszínein található két aminosav oldallánc energetikai kapcsoltságának a kapuzással szinkron változásait termodinamikai mutáns ciklus analízis (lásd 3.3.4 fejezet)



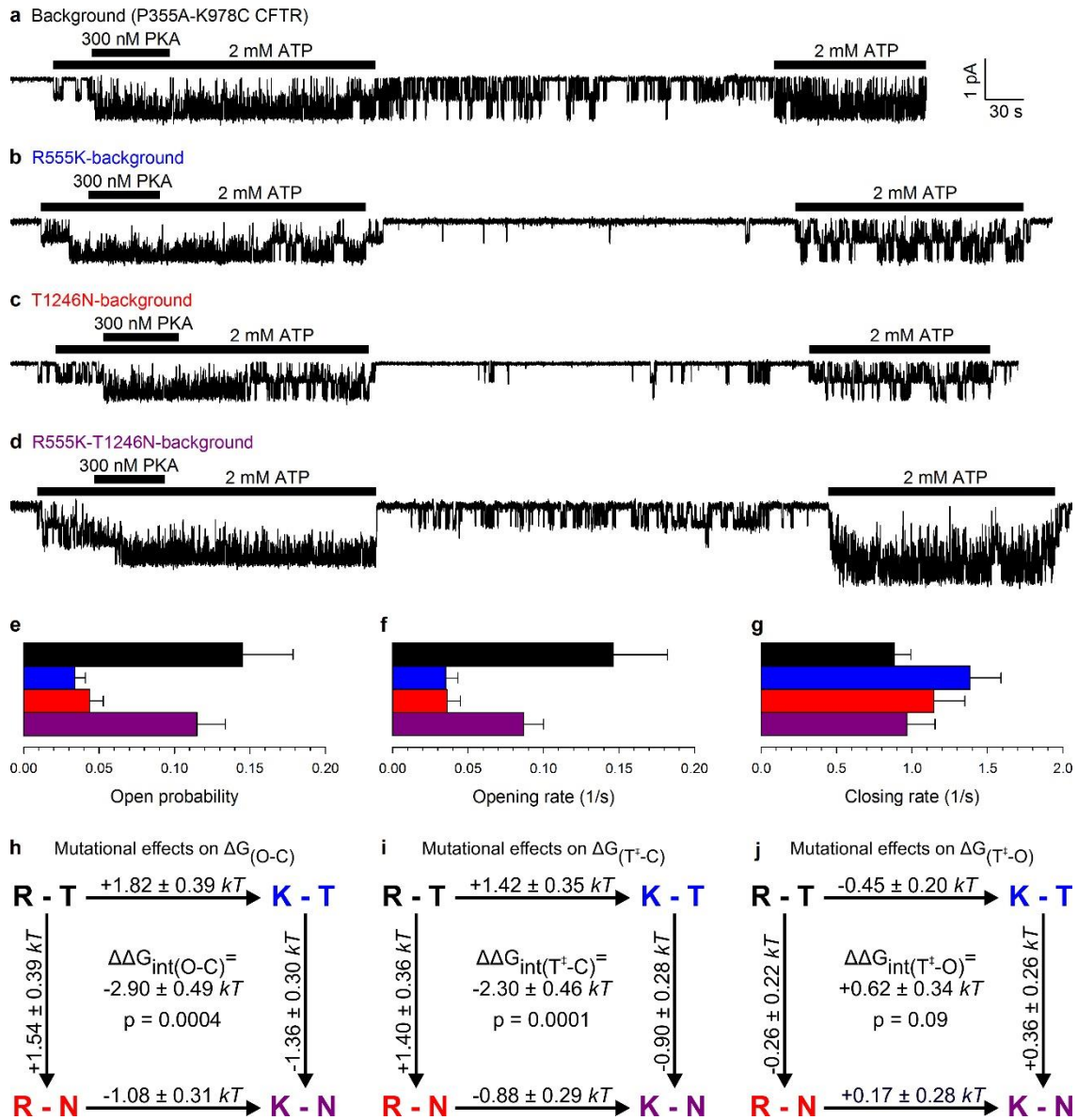


#### 10. ábra: A háttér mutációk magas ATP-függő nyitvatartási valószínűséget eredményeznek

**a–b**, A PKA-val előzetesen foszforilált WT, illetve a mutáns ciklus négy sarkát alkotó mutáns CFTR csatornák 2 mM ATP jelenlétében mérhető nyitvatartási valószínűségei. Az oszlopok az 5 perc időtartamú ATP-mentes tesztszakaszt **(a)** megelőző (front bracket), illetve **(b)** azt követő (rear bracket) 2.5 perc időtartamú ATP jelenlétében felvett kontroll szakaszok utolsó ~2 percének értékeit tükrözik ( $n = 6–17$ ) (lásd **11. a-d ábrák**).

segítségével igazolták [190]. A BG mutációkat tartalmazó CFTR csatorna alkalmas modellt kínál ugyanezen aminosav oldalláncok közötti energetikai kapcsoltság spontán aktivitással együttjáró változásainak vizsgálatára.

A BG háttérben mind az 555-ös pozícióba bevitt arginin→lizin, mind az 1246-os pozícióba bevitt treonin→aszparagin mutáció nagy mértékben csökkenti a spontán  $P_o$ -t (**11. b-c ábrák**,  $0.034 \pm 0.007$  ( $n = 18$ ) és  $0.044 \pm 0.009$  ( $n = 19$ ); **11. e ábra**, kék és piros oszlopok). A nyitott (open, O) állapot stabilitásának a zárt (closed, C) állapotéhoz viszonyított csökkenését ( $\Delta\Delta G_{(O-C)} = +1.82 \pm 0.39$  kT az R555K és  $+1.54 \pm 0.39$  kT a T1246N mutáns esetében; **11. h ábra**, felső vízszintes és bal oldali függőleges nyilak a mutáns cikluson) mindkét mutánsban a megcélzott aminosav oldallánc és a fehérje többi része között fennálló mikroszkópikus kölcsönhatások megváltozása okozza, amelyek a WT csatornában összességében stabilizálják a nyitott állapotot.



**11. ábra: A CFTR spontán megnyílásokor az 555-ös arginin és a 1246-os treonin oldalláncok energetikai kapcsoltságba kerülnek**

**a–d**, P355A-K978C (background) (**a**) és az R555K (**b**) vagy T1246N (**c**) mutációkat vagy az R555K-T1246N dupla mutációt (**d**) hordozó background, CFTR csatornák spontán aktivitását, valamint ATP és PKA (fekete sávok) függését szemléltető  $-80$  mV-on mért mikroszkópikus áramok.

**e–g**, A háttér-mutáns (background) CFTR csatornák (fekete oszlopok) és az R555K (kék oszlopok), T1246N (piros oszlopok) vagy az R555K-T1246N (lila oszlopok) mutációkat is hordozó background CFTR csatornák spontán nyitvatartási valószínűségei (**e**,  $n = 19-21$ ), valamint spontán nyitási (**f**,  $n = 15-19$ ) és zárási sebességei (**g**,  $n = 15-19$ ).

**h–j**, A spontán nyitvatartási valószínűsége (**h**), illetve spontán nyitási (**i**) és záródási (**j**) sebességekre épített termodinamikai mutáns ciklusok szemléltetik az egyes mutációk hatását a nyitott

állapot stabilitására a zárt állapothoz képest (**h**), és az átmeneti állapot stabilitására a zárt (**i**), illetve nyitott (**j**) állapothoz képest. A mutáns ciklusok közepén az 555-ös és 1246-os pozícióknak a feltüntetett két kapuzási állapot közötti kölcsönhatási energia változásai láthatók (lásd 3.3.4 fejezet). A mutáns ciklusok négy sarkát az 555-ös és az 1246-os pozícióban található aminosav oldalláncok egy karakteres jelölése azonosítják.  $k$ , Boltzmann állandó,  $T$ , abszolút hőmérséklet.

Ha a WT csatornában az R555-ös és a T1246-os oldalláncok nem állnának egymással kölcsönhatásban, vagy ha kölcsönhatásuk erőssége nem változna a kapuzási ciklus során, akkor e mutációk hatásai függetlenek volnának a másik pozícióban található aminosav kémiai természetétől: azaz, az egyedi mutációknak a csatorna kapuzási energetikájára gyakorolt hatásai egy dupla mutánsban összeadódnának. Bármiféle nem additív kapuzási hatás az R555 és a T1246 oldalláncok közötti interakciós energia kapuzáshoz kapcsolt változását kell tükrözze. A szimpla mutáns csatornákkal szöges ellentétben, a dupla mutáns R555K-T1246N csatornák a BG csatornákéhoz hasonló, magas spontán  $P_o$ -val rendelkeznek ( $0.11 \pm 0.02$  ( $n = 20$ ); **11. e ábra**, lila oszlop). Vagyis, mindkét egyedi mutációnak a spontán  $P_o$ -ra gyakorolt hatása jelentős mértékben függ a másik pozícióban lévő aminosav kémiai természetétől: például, a spontán nyitott állapot a zárt állapothoz képest destabilizálódik, ha az R555K mutációt a BG csatornába visszük be (**11. e ábra**, kék vs. fekete oszlopok), de stabilizálódik, ha ugyenezt a mutációt a T1246N csatornába visszük be (**11. e ábra**, lila vs. piros oszlopok). A két vizsgált aminosav oldallánc közötti kölcsönhatási energia változását a csatorna megnyílásakor ( $\Delta\Delta G_{\text{int(O-C)}}$ ) a mutáns ciklus két párhuzamos oldalán adódó  $\Delta\Delta G_{\text{(O-C)}}$  értékek közötti különbség számszerűsíti (lásd 3.3.4 fejezet), amely az R555 és a T1246 aminosavak esetében az ATP-mentes zárt és nyitott állapotok között  $-2.90 \pm 0.49 kT$  (**11. h ábra**, középen), szignifikáns ( $p = 0.0004$ ) kölcsönhatási energia változást igazol.

A kölcsönhatási energia változás negatív előjele elvileg a nyitott állapotban létrejövő stabilizáló kapcsolattal, vagy a zárt állapotban jelenlevő destabilizáló kapcsolattal is magyarázható. Azonban egy korábbi munkából tudjuk, hogy az R555 és a T1246 aminosavak zárt állapotban nem állnak energetikai kapcsolatban egymással, függetlenül attól, hogy a 2-es kötőhelyen jelen van-e ATP vagy sem [190]. Azaz, eredményeink konzisztensek a vizsgált aminosav oldalláncok közötti stabilizáló kölcsönhatás megjelenésével a csatorna nyitott konformációjában, az energetikai kapcsoltság mértéke pedig megfelel a hidrogén hidak kötési energiájának. Ezek tükrében

mérési eredményeink az R555 és a T1246 aminosav oldalláncok között, az ATP-mentes nyitott állapotban fennálló hidrogén híd jelenlétével magyarázható: ez a kémiai kötés – a hidrogén kötés kialakulásához szükséges ideális donor-akceptor atomtávolság hiányában – mindkét szimpla mutánsban hiányzik, de a dupla mutánsban – a donor és akceptor atomok távolságának újbóli optimalizálásával – helyreáll. E következtetések értelmében az NBD dimer érintkezési felszínei a 2-es kötőhely körül, ATP jelenlététől függetlenül, szorosra zárulnak a csatorna pórusának megnyílásakor.

#### 4.1.3 A 2-es ATP-kötőhely már az átmeneti állapotban is szorosan dimerizált a csatorna spontán megnyílásakor

A spontán nyitott (burst) és zárt (interburst) állapotok közötti konformációs átmenet során a fehérje egy magas szabadentalpiájú, instabil, rövid élettartamú átmeneti állapotban ( $T^\ddagger$ ) halad keresztül (**20. ábra**), amelynek relatív stabilitását az átlagos zárvatartási ( $\tau_{ib}$ ) és nyitvatartási ( $\tau_b$ ) idők inverzeként meghatározott spontán nyitási, illetve zárási sebességek tükrözik. A spontán nyitási, illetve záródási sebességek mutáció okozta relatív változásai számszerűsítik az átmeneti állapot szabadentalpiájának megváltozását a stabil zárt ( $\Delta\Delta G_{(T-C)}$ ), illetve nyitott ( $\Delta\Delta G_{(T-O)}$ ) állapothoz képest. A mutáns ciklus két párhuzamos oldala között mért szabadentalpia változások ( $\Delta\Delta G$ ) különbsége kvantifikálja a két oldallánc közötti kölcsönhatási energia változását az átmeneti állapot elérésekor a zárt ( $\Delta\Delta G_{int(T-C)}$ ; **11. i ábra**) vagy nyitott ( $\Delta\Delta G_{int(T-O)}$ ; **11. j ábra**) alapállapotok felől. A kinetikai elemzés eredményei szerint, a mindkét egyedi mutánsnál tapasztalt spontán  $P_o$  csökkenést (**11. e ábra, kék és piros oszlopok**) elsősorban a csökkent nyitási sebesség (**11. f ábra, kék és piros oszlopok**) okozza, amely a dupla mutánsban a kontrollhoz közeli értékre áll vissza (**11. f ábra, lila oszlop**). Ennek megfelelően az átmeneti állapotnak a zárt alapállapot felőli elérését az R555 és a T1246 aminosav oldalláncok közötti  $-2.30 \pm 0.46 kT$  (**11. i ábra, panel közepe**) szignifikáns ( $p = 0.0001$ ) kölcsönhatási energia változás ( $\Delta\Delta G_{int(T-C)}$ ) kíséri. Ezzel szemben, a záródási sebességeket a vizsgált mutációk csupán kis mértékben befolyásolják (**11. g ábra**). A mutáns ciklus analízis alapján az átmeneti állapot nyitott alapállapot felőli elérésekor a kölcsönhatási energia változás ( $\Delta\Delta G_{int(T-O)}$ ) a nullától statisztikailag nem szignifikánsan ( $p = 0.09$ ) különböző  $+0.62 \pm 0.34 kT$  (**11. j ábra, panel közepe**).

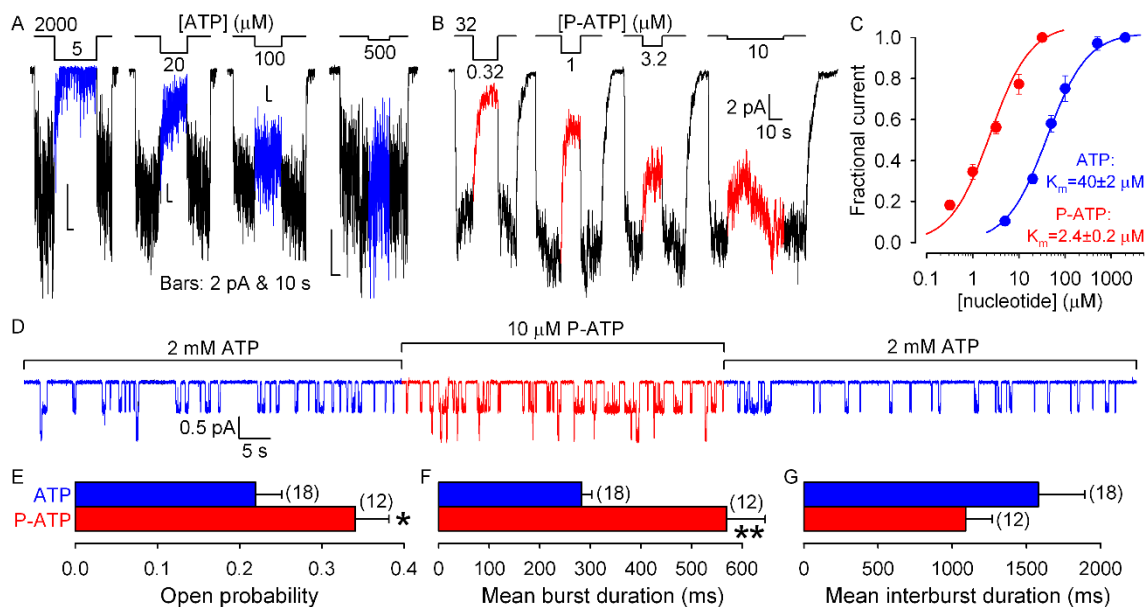
Ezen eredmények szerint, a WT csatornában az R555 és a T1246 aminosav oldalláncok között nyitott állapotban fennálló hidrogén kötés már az átmeneti állapotban kialakul, és csak kisebb mértékben erősödik tovább, amikor a csatorna eléri a stabil nyitott konformációját (**20. b ábra**). Vagyis, a ligandot nem kötő CFTR csatorna NBD dimer érintkezési felületének 2-es ATP-kötőhely körüli része már az átmeneti állapotban zárul (**20. a ábra, közepen**) – hasonlóan ahhoz, ahogy az az ATP-t kötött csatorna megnyílásakor is történik [190, 197].

#### 4.2 A degenerált ATP-kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltozásainak vizsgálata

##### 4.2.1 A P-ATP nagy affinitású ATP analóg, amely megnyújtja a steady-state burst időtartamát

Először saját kísérletes rendszerünkben is összehasonlítottuk az ATP és a P-ATP hatását a CFTR kapuzására. A kétféle nukleotid látszólagos affinitásának meghatározására az ATP és P-ATP növekvő koncentrációi által kiváltott makroszkópos CFTR áramokat az ismételt alkalmazott telítési nukleotid koncentrációk (2 mM ATP és 32  $\mu$ M P-ATP) mellett mért áramokhoz normáltuk (**12. A és B ábra**). A nukleotid koncentrációk függvényében ábrázolt normált áramok (**12. C ábra**) jól illeszthetők a Michaelis-Menten egyenlettel (lásd **3.3.1.3 fejezet**), amely az ATP-re  $40 \pm 2 \mu$ M-os, míg a P-ATP-re  $2.4 \pm 0.2 \mu$ M-os  $K_m$  értéket jósol.

Ezt követően kettő vagy annál kevesebb aktív csatornát tartalmazó membránfoltokban – amelyekben a csatornaszám megbízhatóan megállapítható és a kapuzási események jól feloldhatók – összehasonlítottuk a CFTR kapuzásának kinetikai paramétereit e kétféle nukleotid telítési koncentrációinak (2 mM ATP és 10  $\mu$ M P-ATP) jelenlétében (**12. D ábra**). A kinetikai elemzés (lásd **3.3.2 fejezet**) eredménye alapján a CFTR csatorna nyitvatartási valószínűsége magasabb P-ATP-ben, mint ATP-ben (**12. E ábra**), amit az interburst időtartamok kisebb mértékű rövidülése (**12. G ábra**) mellett, elsősorban a burst időtartamok kétszeresére nyúlása (**12. F ábra**) okoz. Ezek az eredmények megerősítik azon korábbi tanulmányokat [206, 221], amelyek szerint a P-ATP nagy affinitású, hatékony CFTR stimulátor.



### 12. ábra: A P-ATP nagy affinitású, hatékony ATP analóg

**A és B**, Növekvő ATP (**A**) vagy P-ATP (**B**) koncentrációk hatása előzetesen foszforilált WT CFTR csatornák makroszkópos áramaira.

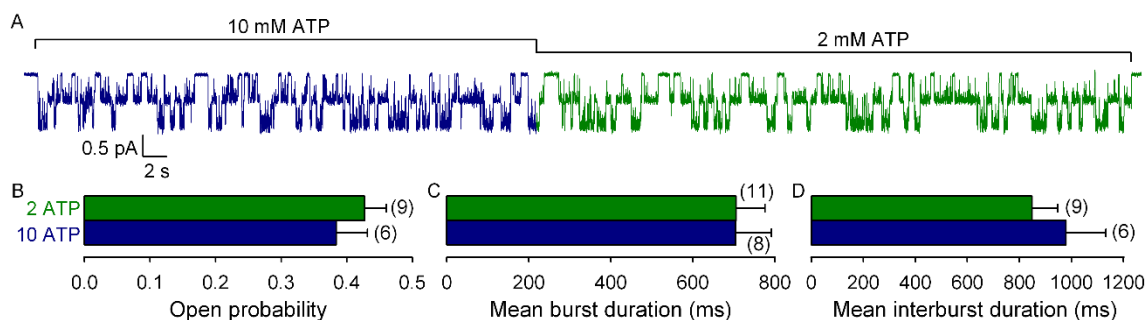
**C**, ATP (kék szimbólumok) és P-ATP (piros szimbólumok) által kiváltott áramok dózis-hatás összefüggései. Az egyes tesztkoncentrációk által kiváltott áramok a teszt előtt és után, telítési nukleotid koncentráció (2 mM ATP, illetve 32 μM P-ATP) jelenlétében mért áramok átlagához vannak normálva. A mérési pontok a Michaelis–Menten egyenlettel vannak illesztve (folytonos vonalak;  $K_m$  értékek feltüntetve).

**D**, Két aktív, 2 mM ATP-ben (kék szakaszok) vagy 10 μM P-ATP-ben (piros szakasz) kapuzó, előzetesen foszforilált WT CFTR csatorna steady-state áramregisztrátuma.

**E–G**, 2 mM ATP-ben (kék oszlopok) vagy 10 μM P-ATP-ben (piros oszlopok) kapuzó WT CFTR csatornák steady-state nyitvatartási valószínűségei (**E**), átlagos burst (**F**) és interburst (**G**) időtartamai.

#### 4.2.2 A H1348A CFTR steady-state burst időtartama független az ATP koncentrációtól

Az irodalomból ismert, hogy a H1348A mutáció kb. háromszorosára nyújtja a 2 mM ATP-ben kapuzó CFTR csatorna átlagos burst időtartamát [207]. Mivel egy másik 1-es kötőhely mutáns CFTR-ről, a W401F-ről leírták, hogy magasabb ATP koncentrációk mellett az átlagos burst időtartama megnyúlt [182], ezért megvizsgáltuk, hogy a H1348A mutánsnál is észlelhető-e a burst időtartamok ilyen ATP koncentráció-függő megnyúlása. A H1348A CFTR 2 mM és 10 mM ATP jelenlétében észlelt kapuzási kinetikájának összehasonlítása (**13. A ábra**) azonban nem igazolt eltérést a nyitvatartási valószínűség (**13. B ábra**) és az átlagos burst (**13. C ábra**), illetve interburst időtartamok (**13. D ábra**) terén.



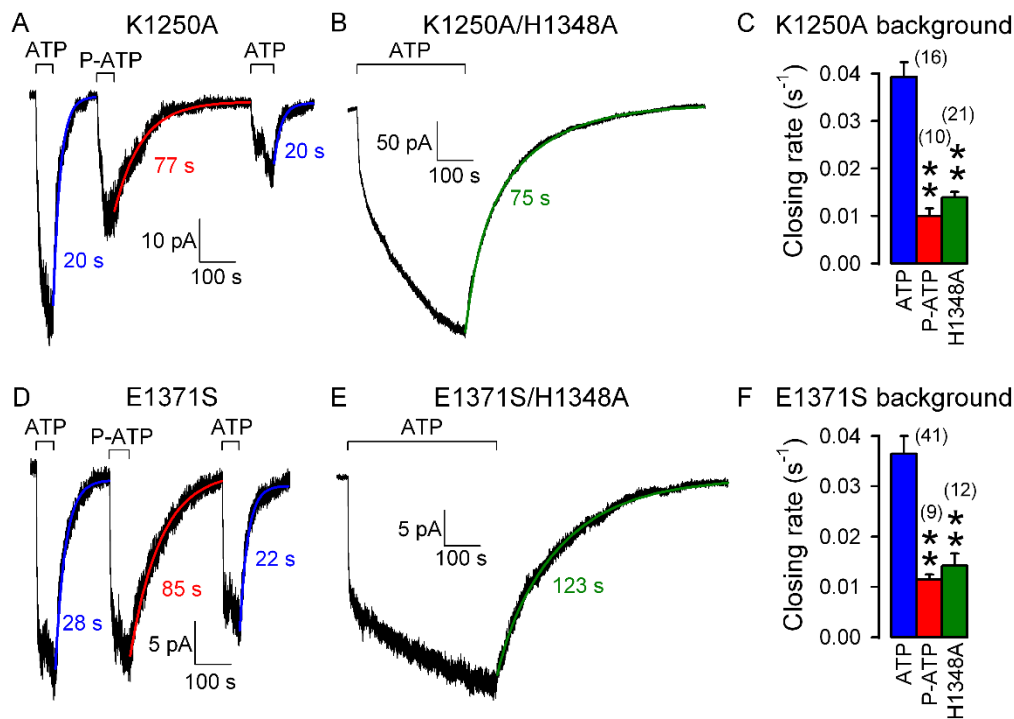
**13. ábra: A H1348A CFTR steady-state burst időtartama nem nyúlik meg magasabb ATP koncentráció mellett**

**A**, Két aktív, 2 mM (zöld szakasz) vagy 10 mM (sötétkék szakasz) ATP-ben kapuzó, előzetesen foszforilált H1348A CFTR csatorna steady-state áramregisztrátuma.

**B–D**, 2 mM (zöld oszlopok) vagy 10 mM (sötétkék oszlopok) ATP-ben kapuzó H1348A CFTR csatornák steady-state nyitvatartási valószínűségei (**B**), átlagos burst (**C**) és interburst (**D**) időtartamai.

#### 4.2.3 A P-ATP és a H1348A mutáció csökkentik a nem-hidrolitikus záródási sebességet

A vizsgált 1-es kötőhely perturbációk nem-hidrolitikus záródási sebességre gyakorolt hatásainak jellemzése céljából hidrolízisre képtelen csatornák makroszkópos áramainak nukleotid elvonását követő lecsengését exponenciálisokkal illesztettük. Mivel a különböző hidrolízist megakadályozó mutációk eltérően befolyásolhatják az NBD dimer stabilitását, és így a prehidrolitikus ( $O_1$ ) nyitott állapot élettartamát, nem lehet tudni, melyik nem-hidrolizáló mutáns a legalkalmasabb modell a WT CFTR nem-hidrolitikus záródási sebességének megállapítására. Ezért az 1-es kötőhely perturbációk hatását kétféle hidrolízisre képtelen csatorna, az NBD2 Walker A mutáns K1250A (**14. A-C ábra**) és Walker B mutáns E1371S (**14. D-F ábra**), záródási sebességein is teszteltük. A P-ATP (**14. A és D ábra**, piros exponenciális illesztések és időállandók) és a H1348A mutáció (**14. B és E ábra**, zöld exponenciális illesztések és időállandók) mindkét hidrolízis-képtelen csatornában markánsan csökkenti az áramlecsengések sebességét a kontroll csatornák ATP elvonást követő relaxációihoz képest (**14. A és D ábra**, kék exponenciális illesztések és időállandók; [207, 221]). Tehát, a választott nem-hidrolitikus háttérmutációtól – K1250A (**14. C ábra**) vagy E1371S (**14. F ábra**) – függetlenül, mindkét 1-es kötőhely perturbáció azonos irányba módosítja, azaz felére-harmadára csökkenti a nem-hidrolitikus záródási sebességeket (**14. C és F ábra**, oszlopok).



**14. ábra: A P-ATP és a H1348A mutáció csökkenti a CFTR nem-hidrolitikus záródási sebességét**

**A és D,** Rövid ideig alkalmazott 10 mM ATP és 50  $\mu$ M P-ATP (**A**) vagy 2 mM ATP és 10  $\mu$ M P-ATP (**D**) hatásai előzetesen foszforilált K1250A (**A**) és E1371S (**D**) CFTR csatornák makroszkópos áramaira. A K1250A csatornák esetében használt ötszörös nukleotid koncentrációkra e mutáns csökkent ATP affinitásának kompenzálása végett volt szükség [158]. A nukleotid elvonást követő áramlecsengések egyszerű exponenciális görbékkel (*színes folytonos vonalak*) lettek illesztve. A színes számok az illesztett exponenciálisok időállandóit jelölik (másodpercben), amelyek megfelelnek az átlagos burst időtartamoknak.

**B és E,** Rövid ideig alkalmazott 10 mM ATP (**B**) vagy 2 mM ATP (**E**) hatása előzetesen foszforilált K1250A/H1348A (**B**) és E1371S/H1348A (**E**) CFTR csatornák makroszkópos áramaira. A nukleotid elvonást követő áramlecsengések dupla exponenciálissal (*színes folytonos vonalak*) lettek illesztve. Az illesztett exponenciálisok időállandóinak súlyozott átlagaként meghatározott burst időtartamokat a színes számok jelölik ( $\tau^*$ , másodpercben; lásd 3.3.1.1 fejezet). Az illesztett paraméterek a **B** panelen:  $\tau_1 = 37$  s,  $\tau_2 = 165$  s,  $A_1 = 0.34$  és  $A_2 = 0.66$ ; valamint az **E** panelen:  $\tau_1 = 24$  s,  $\tau_2 = 179$  s,  $A_1 = 0.07$  és  $A_2 = 0.93$ .

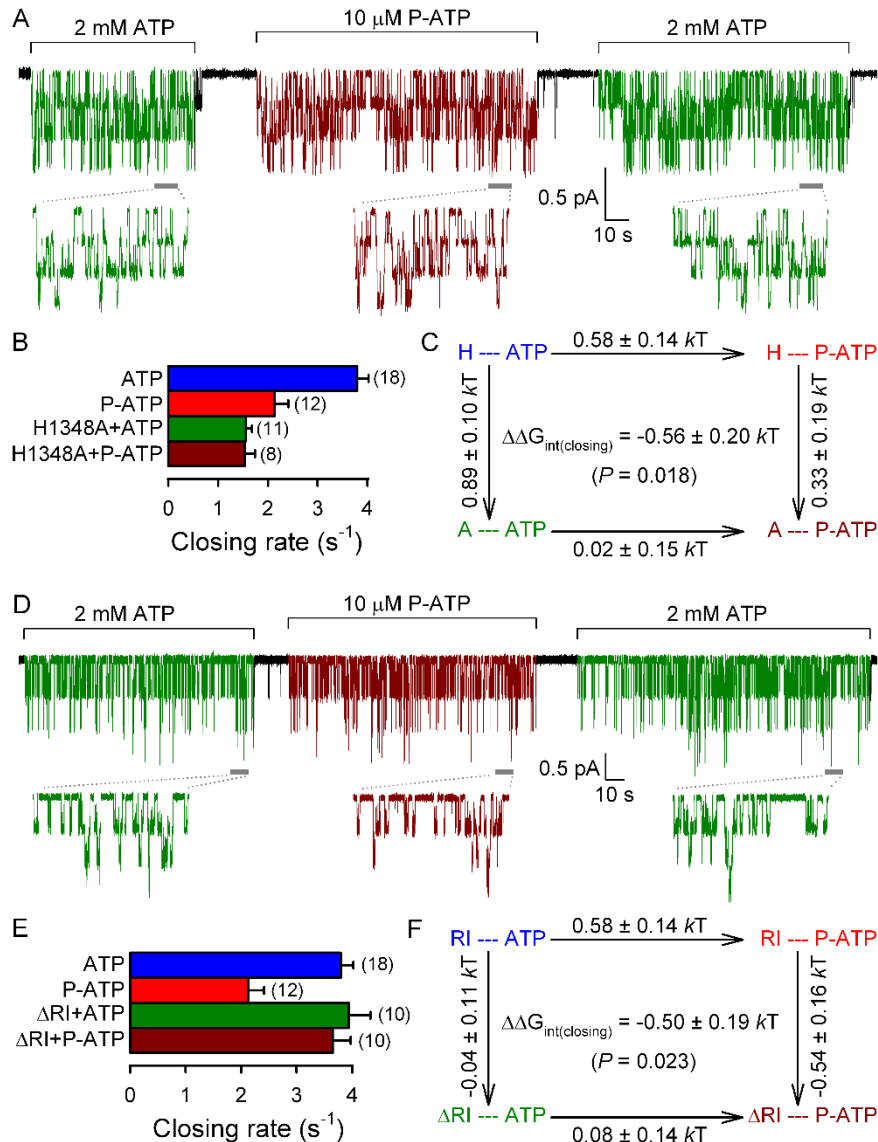
**C és F,** K1250A (**C**) vagy E1371S (**F**) háttérben mért nem-hidrolitikus záródási sebességek ATP (*kék oszlopok*) vagy P-ATP (*piros oszlopok*) elvonását követően, illetve a háttérmutáció mellett a H1348A mutációt is tartalmazó CFTR-ben ATP elvonását követően (*zöld oszlopok*). A nem-hidrolitikus záródási sebességek a nukleotid elvonást követő áramlecsengések exponenciális illesztéseiből nyert időállandók inverzei ( $1/\tau$ ). Azon relaxációk esetén, amelyeket egyszerű exponenciálissal nem, csak dupla exponenciálissal lehetett illeszteni, a nem-hidrolitikus záródási sebességek az illesztéssel nyert időállandók súlyozott átlagainak inverzei ( $1/\tau^*$ ) (lásd 3.3.1.1 fejezet).



#### 4.2.4 A hidrolitikus záródást az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP lassítja

Korábbi munkák alapján [206] az ATP-t követően alkalmazott P-ATP kapuzásra kifejtett hatásának időben késve jelentkező komponensét, a hidrolitikus és nem-hidrolitikus záródási sebességek lassulását, az 1-es kötőhelyen kötött ATP lassabb kicserélődése okozza. Ezt a feltételezést, termodinamikai mutáns ciklus analízis (lásd 3.3.4 fejezet) segítségével, további független bizonyítékokkal támasztottuk alá. Két szerkezeti perturbációnak a kapuzásra gyakorolt nem-additív hatása arra utal, hogy a kapuzási ciklus során e perturbált szakaszok közötti kötési energia változik, azaz ezen csoportok energetikai kapcsoltságban állnak.

A P-ATP jelenlétében kapuzó csatornák két szerkezeti perturbációt tartalmaznak: mindkét kötőhelyen kötött nukleotid tartalmaz egy-egy fenilettil csoportot az adenin gyűrű 6-os pozíciójú nitrogénjén. Ha a 2-es kötőhelyen lévő fenilettil csoport befolyásolná a záródási sebességet, akkor ennek a perturbációnak a hatása additív lenne a térben távoli 1-es kötőhely mutációk záródási sebességet befolyásoló hatásaival. Ha azonban az 1-es kötőhelyen lévő fenilettil csoport lenne felelős a záródási sebesség lassulásáért, akkor a P-ATP és az 1-es kötőhely mutációk hasonló hatásai nem lennének additívak. Két különböző 1-es kötőhely régió és a P-ATP fenilettil csoportja közötti energetikai kapcsoltságot vizsgáltuk. Az 1-es kötőhely NBD2-oldaláról a signature szekvenciába elhelyezett H1348A perturbációt választottuk, mert ennek a mutánsnak a záródási sebességet befolyásoló hatása erőteljes, és már jellemeztük (**13. C ábra**). Az NBD1-oldalról pedig a nem konzervált regulációs inzerció (RI) nagy részének (415-432-es peptidszakasz) delécióját választottuk, amit a CFTR 1-414 és 433-1480 peptidszakaszainak koexpressziójával értünk el ( $\Delta$ RI CFTR). Ez utóbbi perturbáció az ATP-függő kapuzást ugyan kevésbé zavarja meg [141], de várhatóan lokális torzulást okoz az 1-es kötőhelyen kötött nukleotid adenin gyűrűjét körülölelő molekuláris szerkezetében. A 2 mM ATP (**15. A és D ábra, zöld szakaszok**), illetve 10  $\mu$ M P-ATP (**15. A és D ábra, barna szakaszok**) segítségével aktivált H1348A (**15. A ábra**) és  $\Delta$ RI (**15. D ábra**) CFTR csatornák kapuzásának kinetikai elemzésével vizsgáltuk a P-ATP és a fenti két perturbáció hidrolitikus záródási sebességre gyakorolt hatásait. Korábbi munkákkal egybecsengően, a H1348A és a  $\Delta$ RI perturbációk eltérően hatnak a hidrolitikus záródási sebességre: ATP jelenlétében a H1348A mutáció felére/harmadára



**15. ábra: A H1348A mutáció és a 415-432 szakasz deléciója (ΔRI) megszünteti a P-ATP feniletil csoportjának hatását a CFTR hidrolitikus záródási sebességére**

**A és D,** 2 mM ATP jelenlétében (zöld szakaszok), illetve 10 μM P-ATP jelenlétében (barna szakasz) kapuzó előzetesen foszforilált H1348A (**A**) és ΔRI (**D**) CFTR csatornák reprezentatív mikroszkópius áramai. A mérések steady-state részeiből 10 s hosszú szakaszok (szürke sávok) időben széthúzva is láthatók. Az **A** panelen ábrázolt mérés -40 mV-os membránpotenciálon készült.

**B és E,** Az ATP jelenlétében (zöld oszlopok) és P-ATP jelenlétében (barna oszlopok) kapuzó H1348A (**B**) vagy ΔRI (**E**) CFTR csatornák záródási sebességei a steady-state körülmények között mért átlagos burst időtartamok inverzei (1/τ). ATP jelenlétében (kék oszlopok) és P-ATP jelenlétében (piros oszlopok) kapuzó WT CFTR steady-state záródási sebességei a **12. F ábráról** származnak.

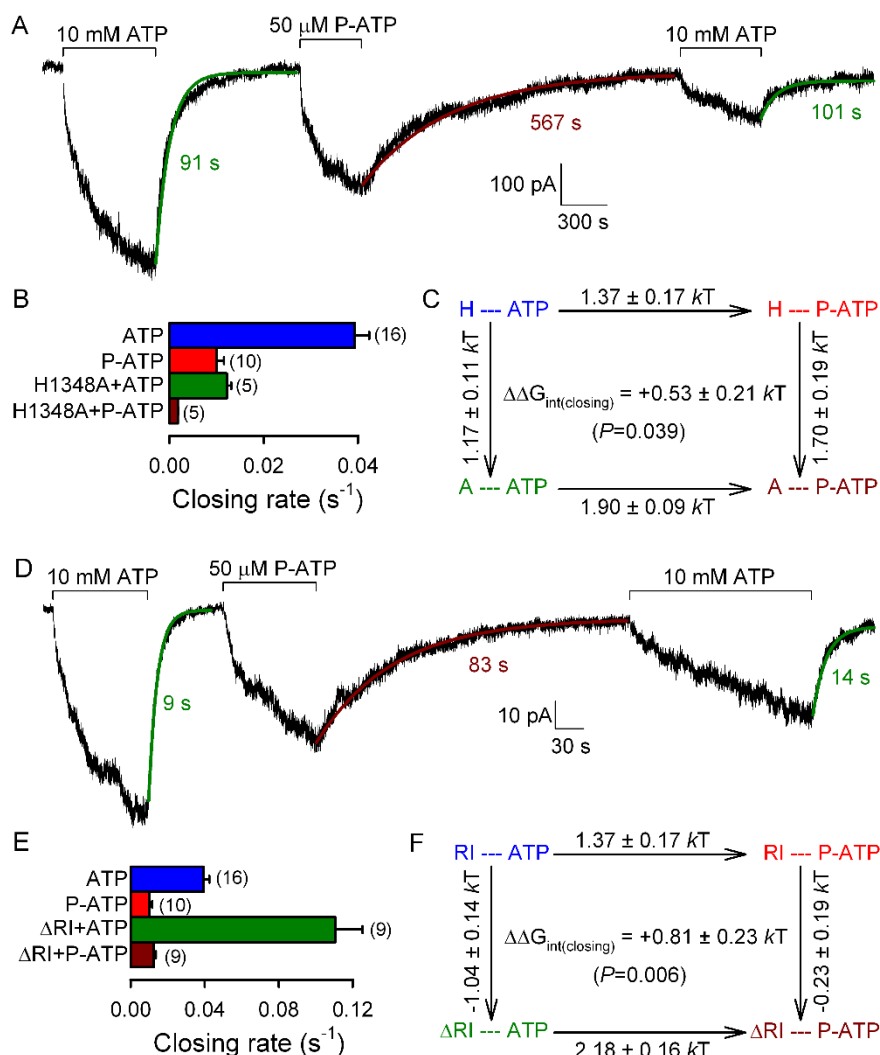
**C és F,** A P-ATP feniletil csoportja és a H1348-as aminosav oldallánc (**C**) vagy az RI régió (**F**) közötti kölcsönhatás vizsgálata céljából a (hidrolitikus) záródási sebességekre felépített termodinamikai mutáns

ciklusok. A mutáns ciklusok sarkait az 1-es kötőhely szerkezete (H vagy A a 1348-as pozícióban [**C**], illetve megtartott vagy hiányzó RI [**F**]) és a kapuzást hajtó nukleotid (ATP vagy P-ATP) jellemzi. A nyilakon olvasható  $\Delta\Delta G^\ddagger$  értékek a záródási aktivációs szabadentalpia perturbációk okozta változásait számszerűsítik (átlag  $\pm$  SEM). A feniletil csoport és a H1348 oldallánc (**C**), illetve a feniletil csoport és az RI régió (**F**), közötti energetikai kapcsoltság ( $\Delta\Delta G_{\text{int(closing)}}$ ) a párhuzamos oldalak mentén kapott  $\Delta\Delta G^\ddagger$  értékek különbsége (lásd 3.3.4 fejezet).

csökkenti (**15. B ábra**, zöld vs. kék oszlop és **13. C ábra**), míg a  $\Delta$ RI perturbáció nem befolyásolja azt (**15. E ábra**, zöld vs. kék oszlop; [141]). A WT CFTR-ben tapasztaltakkal (**15. B és E ábra**, piros vs. kék oszlop) ellentétben, az ATP P-ATP-re történő cseréje egyik perturbáció esetén sem befolyásolja a hidrolitikus záródási sebességet (**15. B és E ábra**, barna vs. zöld oszlop). Azaz, amíg a WT csatornában a feniletil csoport bevitele a kötött nukleotid szerkezetébe lassítja a hidrolitikus záródást, addig ugyanez a változtatás nincs hatással a záródási sebességre az 1-es kötőhely bármelyik oldalán perturbált csatornában. Tehát, a feniletil csoportnak a hidrolitikus záródási sebességet befolyásoló hatása szempontjából nem különbös, hogy azt perturbált vagy nem perturbált 1-es kötőhelyű csatornákon vizsgáljuk. A hidrolitikus záródást lassító feniletil csoport energetikai kapcsoltságban áll mind az NBD1 RI szakaszával (**15. F ábra**), mind az NBD2 H1348-as oldalláncával (**15. C ábra**), mert a köztük mért kölcsönhatási energia változás ( $\Delta\Delta G_{\text{int(T-O)}}$ ) szignifikánsan ( $P < 0.05$ ) különbözik 0-tól. Ez egybevágh azzal a feltételezéssel, hogy a hidrolitikus záródási sebesség lassulását az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP okozza.

#### 4.2.5 A nem-hidrolitikus záródást az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP lassítja

Az 1-es kötőhely két oldalán létrehozott perturbációk és a P-ATP feniletil csoportja közötti energetikai kapcsoltságot nemcsak a hidrolitikus, hanem a nem-hidrolitikus záródás vonatkozásában is megvizsgáltuk (**16. ábra**). Erre a célra a nem-hidrolitikus mutáns K1250A/H1348A (**16. A ábra**) és K1250A/ $\Delta$ RI (1-414 és 433-1480(K1250A) CFTR szegmensek koexpressziója) (**16. D ábra**) csatornák ATP, illetve P-ATP aktiválta makroszkópos áramainak a nukleotid elvonását követő lecsengéseit exponenciálisokkal illesztettük, és az így nyert nem-hidrolitikus záródási sebességekre építettünk termodinamikai mutáns ciklusokat. A H1348A és a  $\Delta$ RI perturbációk ellentétes



**16. ábra: A H1348A mutáció és a 415-432 szakasz deléciója ( $\Delta$ RI) fokozza a P-ATP feniletil csoportjának hatását a CFTR nem-hidrolitikus záródási sebességére**

**A és D,** Rövid ideig alkalmazott 10 mM ATP és 50  $\mu$ M P-ATP hatása előzetesen foszforilált K1250A/H1348A (**A**) és K1250A/ $\Delta$ RI (**D**) CFTR csatornák makroszkópos áramaira. A nukleotid elvonását követő áramlecsengések egyszerű exponenciálisokkal (*színes folytonos vonalak*) lettek illesztve. A színes számok az illesztett exponenciálisok időállandói (másodpercben), amelyek az átlagos burst időtartamoknak felelnek meg.

**B és E,** K1250A/H1348A (**B**) és K1250A/ $\Delta$ RI (**E**) CFTR csatornák nem-hidrolitikus záródási sebességei ATP (zöld oszlopok) vagy P-ATP (barna oszlopok) elvonását követően. A nem-hidrolitikus záródási sebességek a nukleotid elvonását követő áramlecsengések exponenciális illesztéseiből nyert időállandók inverzei ( $1/\tau$ ). A K1250A CFTR ATP (*kék oszlopok*) és P-ATP (*piros oszlopok*) elvonásakor mérhető nem-hidrolitikus záródási sebességei a **14. C ábráról** származnak.

**C és F,** A P-ATP feniletil csoportjának a H1348-as oldallánc (**C**) vagy az RI régió (**F**) közötti kölcsönhatás vizsgálata céljából a nem-hidrolitikus záródási sebességekre felépített termodinamikai

mutáns ciklusok. A mutáns ciklusok sarkait az 1-es kötőhely szerkezete (H vagy A a 1348-as pozícióban [**C**], illetve a megtartott vagy hiányzó RI [**F**]) és a kapuzást hajtó nukleotid (ATP vagy P-ATP) jellemzi. A nyílakon olvasható  $\Delta\Delta G^\ddagger$  értékek a nem-hidrolitikus záródási aktivációs szabadentalpia perturbációk okozta változásait számszerűsítik (átlag  $\pm$  SEM). A feniletil csoport és a H1348 oldallánc (**C**), illetve a feniletil csoport és az RI régió (**F**), közötti energetikai kapcsoltság ( $\Delta\Delta G_{\text{int(closing)}}$ ) a párhuzamos oldalak mentén kapott  $\Delta\Delta G^\ddagger$  értékek különbsége (lásd 3.3.4 fejezet).

irányban hatnak a nem-hidrolitikus záródási sebességre: míg a H1348A kb. egyharmadára csökkentette (**16. B ábra**, *zöld vs. kék oszlop*, **14. C ábra**), addig a  $\Delta$ RI perturbáció kb. háromszorosára növelte azt (**16. E ábra**, *zöld vs. kék oszlop*, [141]). Egyik perturbáció sem szüntette meg, sőt inkább fokozta, a P-ATP feniletil csoportjának a nem-hidrolitikus záródást lassító hatását (**16. A és D ábra**, *barna vs. zöld illesztett exponenciálisok és időállandók*). Mindkét mutáns ciklus nem-additivitásra utal: míg a P-ATP feniletil csoportjának jelenléte a K1250A csatornában csak egynegyedére csökkenti a nem-hidrolitikus záródási sebességet (**14. C és 16. B és E ábrák**, *piros vs. kék oszlop*), addig a K1250A/H1348A csatornában kevesebb mint egyhatodára (**16. B ábra**, *barna vs. zöld oszlop*), a K1250A/ $\Delta$ RI csatornában pedig kb. egykilencedére (**16. E ábra**, *barna vs. zöld oszlop*). Ennek megfelelően a nem-hidrolitikus záródási sebességekre épített termodinamikai mutáns ciklusok alapján mind a P-ATP feniletil csoportja és a 1348-as pozíció közötti (**16. C ábra**), mind a feniletil csoport és a RI (**16. F ábra**) közötti kölcsönhatási energia változások szignifikánsan ( $p < 0.05$  és  $p < 0.01$ ) különböznek a nullától. Következésképpen, a nem-hidrolitikus záródás P-ATP okozta lassulásáért is az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP molekula a felelős.

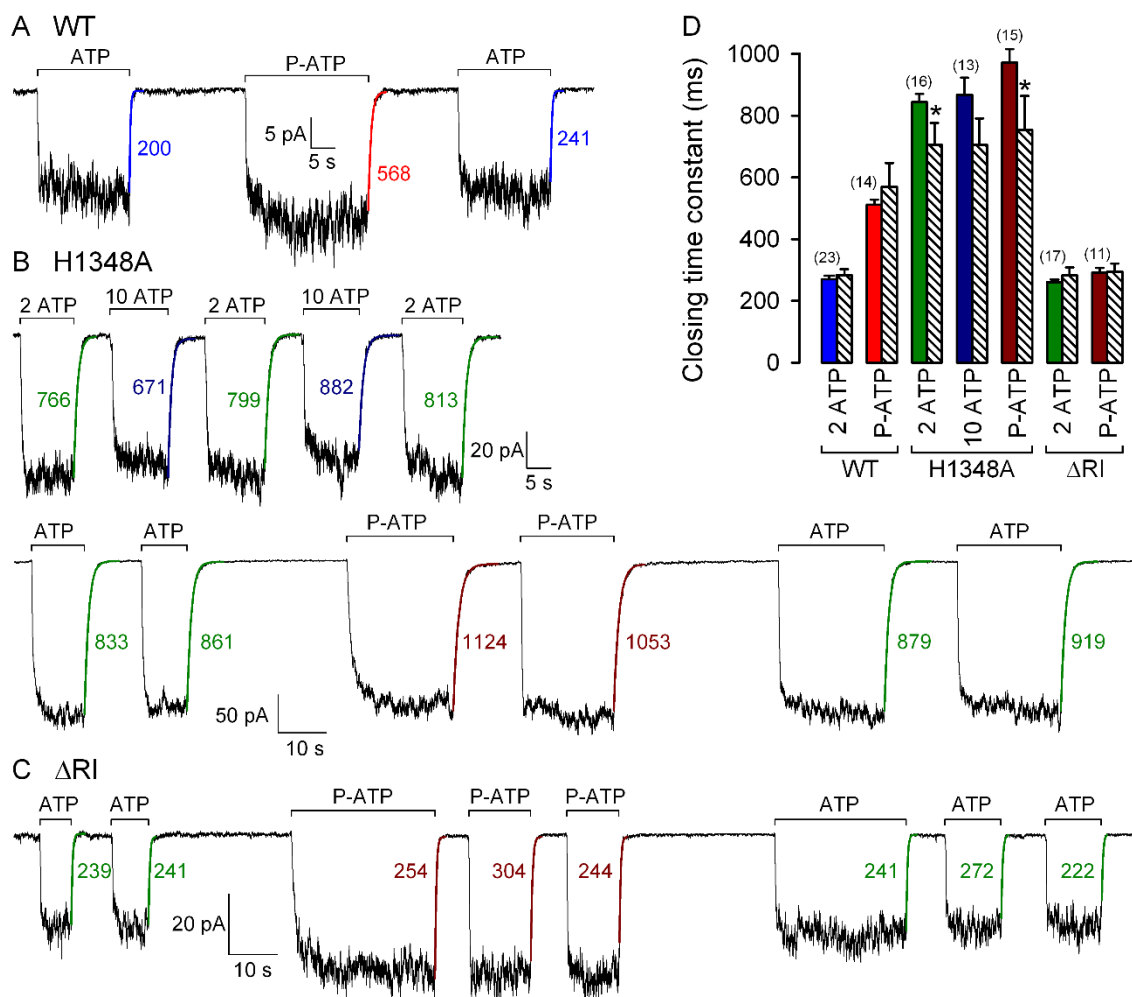
#### 4.2.6 A P-ATP és a H1348A mutáció nem változtatják meg az egy burst-re eső ATP kötések számát

A P-ATP és a H1348A mutáció megnyújtják a steady-state burst időtartamokat (**12. F és 13. C ábra**). Nemrégiben közölt tanulmányok [182, 205] az NBD1 mutáns W401F CFTR csatornák megnyúlt burst-jeinek magyarázatára feltételeznek egy – az ATP hidrolízisét követő – rövid időablakot, amely alatt a hidrolízis termékei, az ADP és a foszfát, ledisszociálhatnak kötőhelyükről, és lehetővé teszik egy új ATP molekula megkötését még mielőtt a pórus bezáródhatna. Egy ilyen "reentry" mechanizmus valóban

a steady-state burst-ök megnyúlásához vezetne, mert lehetővé tenné, hogy egy burst-re egynél több ATP hidrolízis ciklus essen. A "reentry" elmélet azt jósolja, hogy a steady-state körülmények között tapasztalt átlagos burst időtartamok szignifikánsan hosszabbak, mint az ATP elvonást követő makroszkópos áramlecsengések időállandói, mivel ez utóbbi mérőszám olyan körülmények között méri a burst időtartamot, amelyek – nukleotidok hiányában – kizárják a reentry események lehetőségét.

Mivel a W401F mutációhoz hasonlóan, a H1348A és a P-ATP burst időtartamot megnyújtó hatásai is az 1-es kötőhely perturbációinak következményei, ezért megvizsgáltuk, hogy ez utóbbi jelenségek is magyarázhatók-e a reentry mechanizmussal. Ehhez meghatároztuk a WT és  $\Delta$ RI CFTR csatornák 2 mM ATP vagy 10  $\mu$ M P-ATP (**17. A és C ábra**), valamint a H1348A csatornák 2 vagy 10 mM ATP (**17. B ábra, felső sor**) vagy 10  $\mu$ M P-ATP (**17. B ábra, alsó sor**) elvonását követő makroszkópos záródási sebességeit: az áramlecsengések exponenciális illesztéséből származó időállandók (**17. A-C ábra, színes görbék és számok**) a reentry eseményeket nem tartalmazó burst-ök átlagos időtartamait tükrözik. Ezen időállandókat (**17. D ábra, színes oszlopok**) a makroszkópos áramok aktivációjához használt nukleotid koncentrációk folyamatos jelenlétében mért, mikroszkópikus, steady-state burst időtartamokkal (**17. D ábra, csíkozott oszlopok**, az adatok a **12. F, 13. C és 15. B és E ábrákról** származnak) hasonlítottuk össze. A steady-state értékek egyik esetben sem bizonyultak hosszabbnak a ligand elvonással megállapított értéknél. Ezek szerint a 2 mM ATP-ben vagy 10  $\mu$ M P-ATP-ben kapuzó WT és  $\Delta$ RI CFTR csatornák, valamint a 2-10 mM ATP-ben vagy 10  $\mu$ M P-ATP-ben kapuzó H1348A csatornák, a steady-state kapuzás során a pórusnyitást előidéző NBD dimerizációt követően, a burst időtartama alatt már nem kötnek további nukleotidot, csakúgy, mint az ATP-ben kapuzó WT CFTR csatornák [159].

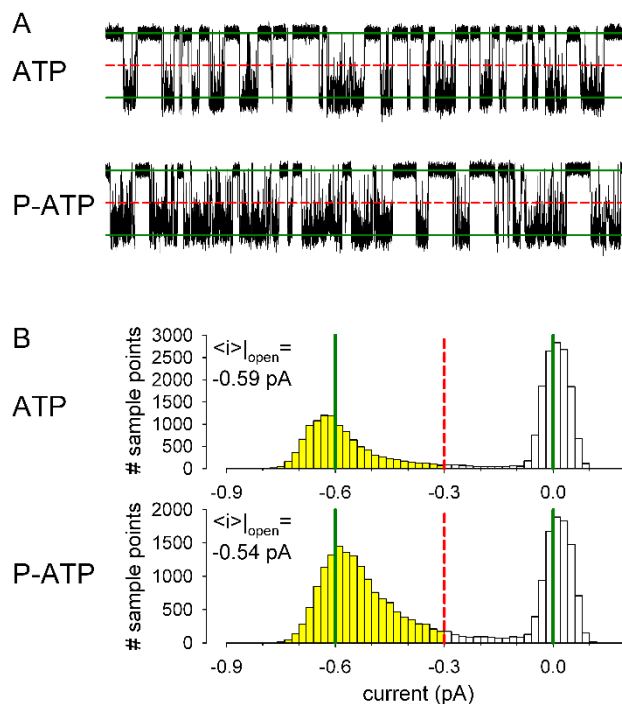
A makroszkópos WT CFTR áram relatív növekedése P-ATP-ben ATP-hez viszonyítva ( $<1.5x$ , **17. A ábra**) szerényebb annál, mint amit a nyitvatartási valószínűség növekedése ( $\sim 1.55x$ , **12. E ábra**) alapján várnánk. A különbség hátterében a kétféle nukleotiddal aktivált csatorna átlagos vezetőképességének különbsége áll ( $i_{ATP} = -0.59 \pm 0.01$  pA ( $n = 6$ ) vs.  $i_{P-ATP} = -0.54 \pm 0.01$  pA ( $n = 6$ )) (**18. ábra**), amit az adatrögzítési körülményeink között a rövid zárt állapotok nem teljes feloldása okozhat.



**17. ábra: WT, H1348A és ΔRI CFTR nukleotid elvonást követő makroszkópos áramlecsengéseiből nyert záródási sebességek összehasonlítása a mikroszkópikus steady-state záródási sebességekkel**

**A–C,** Rövid ideig alkalmazott 2 mM ATP vagy 10 μM P-ATP (**A és C**) és 2 vagy 10 mM ATP (**B**, felső sor), illetve 2 mM ATP vagy 10 μM P-ATP (**B**, alsó sor) hatása előzetesen foszforilált WT (**A**), H1348A (**B**) és ΔRI (**C**) CFTR csatornák makroszkópos áramaira. A nukleotid elvonást követően az áramlecsengések egyszerű exponenciálisokkal (*színes folytonos vonalak*) lettek illesztve. Az illesztett exponenciálisok időállandóit a színes számok jelölik (ms-ban).

**D,** Makroszkópos záródási időállandók 2 mM ATP (*kék oszlop*) vagy 10 μM P-ATP (*piros oszlop*) elvonását követően WT, 2 mM ATP (*bal zöld oszlop*) vagy 10 mM ATP (*sötétkék oszlop*) vagy 10 μM P-ATP (*bal barna oszlop*) elvonását követően H1348A, illetve 2 mM ATP (*jobb zöld oszlop*) vagy 10 μM P-ATP (*jobb barna oszlop*) elvonását követően ΔRI CFTR csatornák esetén. Összehasonlításuként a csikozott oszlopok (**12. F, 13. C és 15. B és E ábrákról** származó adatok) a megfelelő csatornák azonos nukleotidok folyamatos jelenlétében, mikroszkópikus mérésekből meghatározott átlagos burst időtartamokat szemléltetik.



**18. ábra: A P-ATP-ben kapuzó WT CFTR csatornák átlagos vezetőképessége alacsonyabb, mint az ATP-ben kapuzóké**

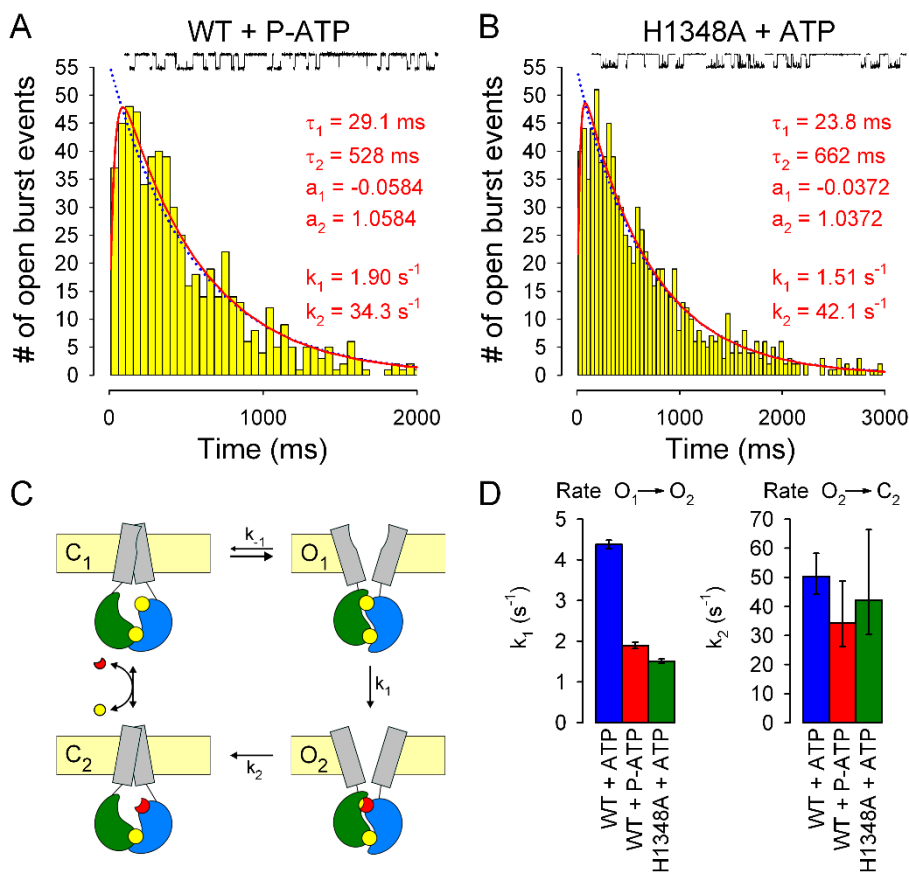
**A**, ATP-ben (*felső sor*) és P-ATP-ben (*alsó sor*) kapuzó egyedi WT CFTR csatornás regisztrátumok 25 s-os reprezentatív szakaszai.  $V_m = -80$  mV. *Folytonos zöld vonalak*, az idealizáláshoz használt vezetési szintek; *szaggatott piros vonalak*, a nyitott állapot meghatározásához használt küszöbérték (a vezetőképesség fele).

**B**, Az **A** panelen bemutatott reprezentatív mérések amplitúdó histogramja. Az idealizációs küszöb (*szaggatott piros vonalak*) feletti oszlopok *sárgával* vannak kiemelve. Az egyedi csatornáknak a burst időtartamára vonatkoztatott átlagos áramai ( $i$ ), a sárgával kiemelt adatpontok átlagai, a histogramokon fel lettek tüntetve.

#### 4.2.7 A P-ATP és a H1348A mutáció az $O_1 \rightarrow O_2$ átmenet lassítása révén nyújtják meg a burst időtartamát

Egy burst esemény kétféle módon végződhet: az NBD dimer disszociációja történhet ATP hidrolízis nélkül, a pórusnyitási konformációváltozással ellentétes, reverzibilis úton ( $O_1 \rightarrow C_1$ ; **19. C ábra**), vagy követheti a 2-es kötőhelyen kötött ATP hidrolízisét ( $O_1 \rightarrow O_2 \rightarrow C_2$ ; **19. C ábra**). Miután WT csatornában, a nem-hidrolitikus záródási sebességi állandó ( $k_{-1}$ ; **19. C ábra**) igen kicsi, a burst-ök túlnyomó részt a hidrolitikus útvonalon keresztül záródnak. Az ilyen tipikus burst két szakaszra osztható:





**19. ábra: A P-ATP és a H1348A mutáció egyaránt lassítja a CFTR  $O_1 \rightarrow O_2$  átmenetét**

**A és B**, 10  $\mu\text{M}$  P-ATP-ben kapuzó egyedi WT (**A**) és 2 mM ATP-ben kapuzó egyedi H1348A (**B**) CFTR csatornák több száz burst eseményének időtartamait összegző hisztogramok. A panelek tetején egy csatornás áramregisztrátumok 30 s hosszúságú reprezentatív szakaszai láthatók. A maximum likelihood módszer segítségével (lásd 3.3.3 fejezet) mindkét kapott eloszlást egyszerű exponenciális eloszlással (*kék pontozott vonal*), illetve a **C** panelel látható sémával (a  $k_{-1}$  sebességi állandó 0-ra rögzítése mellett; *piros folytonos vonal*) is megillesztettük. Az utóbbi séma a log-likelihood ratio teszt alapján szignifikánsan jobban illeszkedik (WT + ATP,  $P < 0.01$  és H1348A + ATP,  $P \approx 0.05$ ) mindkét eloszláshoz. A ciklikus séma illesztett paraméterei ( $k_1$  és  $k_2$  sebességi állandók), valamint az eloszlások exponenciális komponenseinek amplitúdói és az időállandói mindkét panelel fel lettek tüntetve.

**C**, A vizsgált burst-hossz eloszlások maximum likelihood illesztéséhez használt, egyszerűsített ciklikus kapuzási modellnek a sématis ábrája [159], amely a 2-es kötőhelyben ATP-t ( $C_1$  és  $O_1$  állapotok, *felső sor*), illetve ADP-t ( $C_2$  és  $O_2$  állapotok, *alsó sor*) kötő zárt és nyitott állapotokat különböztet meg. A modell feltételezi, hogy a pórus megnyílása/záródása egybeesik az NBD dimer kialakulásával/szétesésével. Az ábra színkódolása megegyezik az előző ábrákéval. Sárga, plazmamembrán; szürke, TMD-k; zöld, NBD1; kék, NBD2; sárga, ATP; piros, ADP.

**D**, Egyedi, 10  $\mu\text{M}$  P-ATP-ben kapuzó WT CFTR (*piros oszlopok*) és 2 mM ATP-ben kapuzó H1348A CFTR (*zöld oszlopok*) csatornák burst-hossz eloszlásainak illesztésével nyert  $k_1$  és  $k_2$  sebességi állandók,

illetve azok összehasonlítása a 2 mM ATP-ben kapuzó WT CFTR hasonló paramétereivel [159] (*kék oszlopok*). A hibahatárok 0.5-egységnyi log-likelihood intervallumokat jelölnek. Megjegyzendő, hogy a vizsgált 1-es kötőhely perturbációk esetében a  $k_2$  sebességi állandó csak mérsékelt pontossággal becsülhető a  $k_1$  és a  $k_2$  sebességi állandók között fokozódó különbség miatt (lásd [193];  $k_2/k_1$  hányadosok WT + ATP, WT + P-ATP és H1348A + ATP esetén: 11, 18 és 29).

egy kezdeti, hosszabb időintervallumra, amelynek során a csatorna 2-es kötőhelye ATP-t köt (stabil, prehidrolitikus  $O_1$  állapot; **19. C ábra**), és egy ezt követő jóval rövidebb intervallumra, amely alatt a 2-es kötőhely már a hidrolízis végtermékét, az ADP-t tartalmazza (instabilabb, rövid, poszthidrolitikus  $O_2$  állapot; **19. C ábra**). A csatornának ezen konformációkban eltöltött idejét az  $O_1 \rightarrow O_2$  és az  $O_2 \rightarrow C_2$  lépések sebességi állandói ( $k_1$  és  $k_2$ ; **19. C ábra**) határozzák meg. E sebességi állandók megbecsülhetők a burst időtartamok eloszlásának a **19. C ábrán** látható modellel történő maximum likelihood illesztésével [200].

Tisztázni kívántuk, hogy a P-ATP és a H1348A mutáció melyik mikroszkópikus sebességi állandóra hatva nyújtják meg a burst-ök időtartamát. E célból egyetlen aktív csatornát tartalmazó membránfoltok áramait regisztráltuk (**19. A és B ábra**), majd a burst-hosszakat burst analízis (lásd 3.3.3 fejezet) segítségével határoztuk meg. Az így nyert burst-hossz eloszlás maximum likelihood illesztésével becsültük a mikroszkópikus sebességi állandókat. A 10  $\mu$ M P-ATP-ben kapuzó WT (**19. A ábra**) és a 2 mM ATP-ben kapuzó H1348A (**19. B ábra**) CFTR csatornák burst-hossz eloszlása is csúcsos, ami megfelel a CFTR-re jellemző, nukleotid hidrolízissel járó, nem-egyensúlyi kapuzási ciklusnak. A legszembetűnőbb különbség a 2 mM ATP-ben kapuzó WT [159] és az általunk vizsgált perturbált csatornák burst-hossz eloszlásai között, az utóbbiak lassú komponensének ("farkának") megnyúlása volt, míg a csúcsok helyzete közel változatlan maradt. Ennek megfelelően a maximum likelihood illesztés a 2 mM ATP-ben kapuzó WT kontrollhoz képest (**19. D ábra, kék oszlop a bal oldalon**, [159]) felére-harmadára csökkent  $k_1$  sebességi állandót adott mind a P-ATP, mind a H1348A mutáció esetében (**19. D ábra, piros és zöld oszlopok a bal oldalon**). Ezzel szemben sem a P-ATP, sem a H1348A mutáció nem befolyásolja szignifikánsan a  $k_2$  sebességi állandót (**19. D ábra, jobb oldal**).

## 5 Megbeszélés

### 5.1 A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata

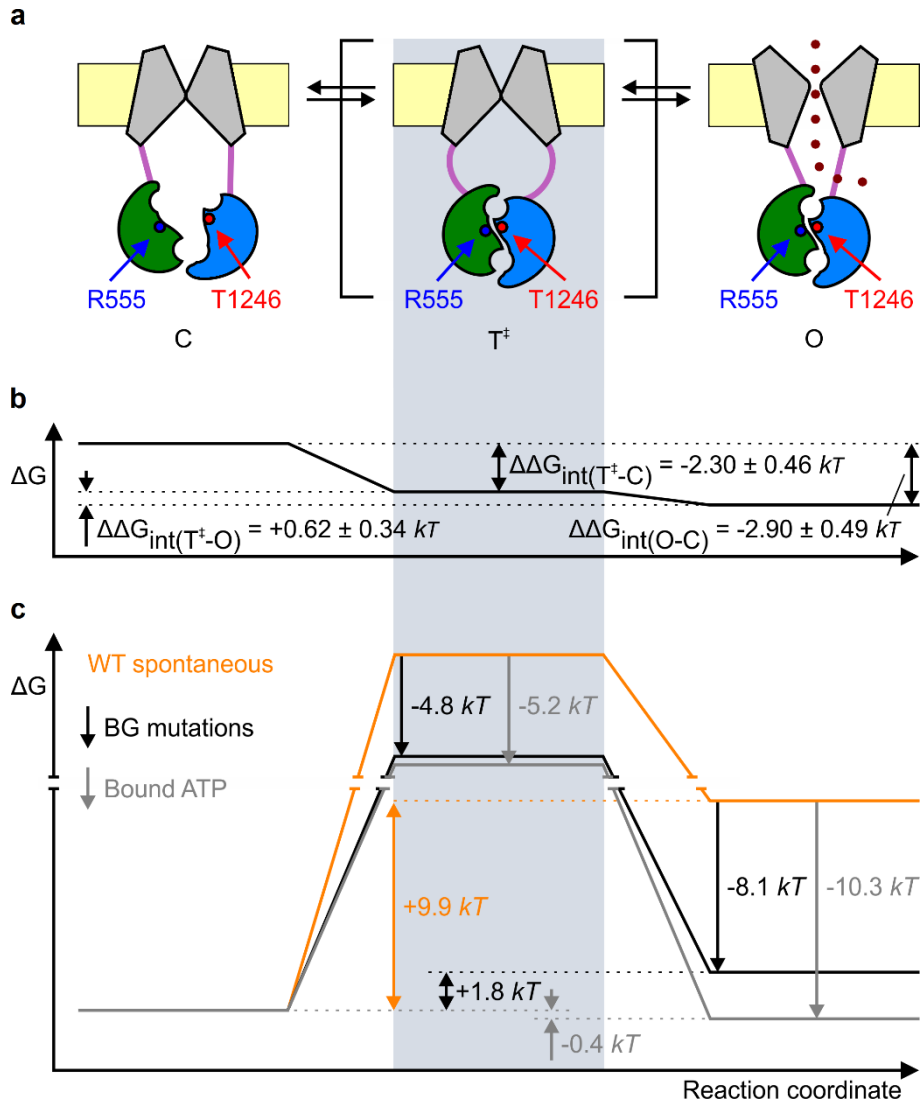
#### 5.1.1 A spontán pórusmegnyílások mechanizmusa megerősíti, hogy a CFTR ATP-függő kapuzása nem követi a mikroszkópikus reverzibilitás elvét

Amíg a CFTR pórusának ATP-függő megnyílásáról ismert, hogy az az NBD-k dimerizációjához kapcsolt [190], addig az ATP hiányában észlelhető spontán aktivitás molekuláris mechanizmusa ismeretlen. Utóbbi jelentősége túlmutat a spontán nyitások elenyésző gyakorisága alapján vártnál. Az NBD-k és a TMD-k kapcsoltsági fokának szorossága a mai napig vitatott, jelentős kérdés, amelynek megértése kulcsfontosságú az ABC fehérjék ATP-függő konformációváltozási ciklusát meghatározó erők megértésében [159, 190, 204, 208, 222]. A kérdés gyakorlati jelentőségét pedig az adja, hogy a G551D mutációt hordozó betegek csatornáinak a spontán aktivitás a kizárólagos kapuzási módja [204, 210, 214], és a mai napig egyetlen CF-es betegek klinikai kezelésére engedélyezett CFTR potenciátor, az ivacaftor, ezen mechanizmus fokozásán keresztül fejt ki hatását.

Igazoltuk, hogy a spontán megnyílások – csakúgy, mint az ATP jelenlétében bekövetkezők – az NBD-k 2-es ATP-kötőhely körüli szoros dimerizációjához kapcsolódnak. A CFTR pórus megnyílásának ez a szoros kapcsoltsága az NBD-k dimerizációjához – függetlenül az ATP jelenlététől vagy annak hiányától – erős megkötéseket támaszt a CFTR ATP-függő kapuzását magyarázó mechanikai modellekkel szemben, és segíti a konformációváltozást vezérlő, az ABC fehérjék között valószínűleg konzervált, erők megértését. A szoros kapcsoltság egyúttal egyszerűbb magyarázatot kínál különböző mutációk, élettani vagy gyógyszeres regulátorok hatásmechanizmusainak értelmezésére. Például, a harmadik leggyakoribb CF-t okozó, az NBD1 signature szekvenciájában található G551D mutációt hordozó csatorna kizárólag spontán mechanizmussal képes megnyílni, mert a 2-es kötőhelyre bekötött ATP molekula egyenesen gátlószerként viselkedik: az NBD2 Walker motívumaihoz kötött ATP  $\gamma$  foszfátja és az 551-es pozícióban a mutáció által létrehozott negatív töltés között elektrosztatikus taszítás lép fel, amely nehezíti az NBD dimer kialakulását [214]. Ilyen elektrosztatikus kölcsönhatás nem lenne várható, ha az NBD dimerizációs felszínek nem közelítenék meg egymást a pórus megnyílásakor, de kézenfekvő következmény, amennyiben az NBD-k

dimerizációja a G551D mutánsban is szoros kapcsoltságban marad a pórus megnyílásával. Továbbá, bár egy C-terminálisan csonkolt, NBD2 hiányos CFTR csatorna (CFTR aminosavak 1-1197; [223]) ritka spontán megnyílásai nyilvánvalóan nem lehetnek NBD dimerizációhoz kapcsolatosak, a jelen eredmények arra utalnak, hogy a csonkolt csatornának a normális NBD-TMD kapcsolatban szerepet játszó, megmaradt régiói (pl. csatoló hélixek) a pórus nyitási során hasonló mozgásokat végeznek, mint amelyek a nem csonkolt csatornák NBD dimerizációját kísérik.

Az ATP-mentes megnyílások során – csakúgy, mint az ATP-t kötött csatornában [191] – a nyitott CFTR csatornák ATP-kötőhelyei az NBD felszínének szoros dimerizációja miatt valószínűleg hozzáférhetetlenek a citoszol felől. Ezért a nukleotid kötés és disszociáció kizárólag a csatorna zárt konformációjában történhet, aminek két közvetlen folyamánya van. Először is, az ATP-mentes nyitott állapot nem alkothatja az ATP függő kapuzási ciklus szerves részét [175, 204]. Másodszor, a feltételezett hasonlóságok [208, 215, 222] ellenére, a CFTR kapuzásának alapelvei gyökeresen különböznek a ligand kapuzott csatornákétól, mint például a nikotinerger acetilkolin receptorétól. A ligand kapuzott csatornák ciklikus egyensúlyi mechanizmussal rendelkeznek: a ligand kötése és disszociációja mind a zárt, mind a nyitott csatorna konformációban megtörténhet. Egy ligand aktiváló hatásának termodinamikai alapja a mikroszkópikus reverzibilitás (detailed balance) elve, miszerint egy ciklikus egyensúlyi reakciósémában egy zárt hurok mentén körbehaladva az egyes lépések egyensúlyi állandóinak szorzata egységnyi: vagyis a csatorna megnyílását („izomerizációját”) az okozza, hogy a ligandkötőhely egyidejű konformációváltozása során növekszik a kötőhely ligand iránti affinitása [224]. Ezzel szemben, CFTR esetében a ligandkötőhelyek a csatorna nyitott állapotában zártak, így nem hozzáférhetőek a ligand számára, sem bekötésre, sem disszociációra nincs lehetőség: azaz a nyitott CFTR kötési affinitása nem definiálható (a kötés és disszociáció sebességi állandója egyaránt nulla). Ezért még a hidrolízist megakadályozó mutációk segítségével egyensúlyi kapuzásra kényszerített CFTR csatornák sem a mikroszkópikus reverzibilitás elveinek alávetett ciklikus modellt, hanem lineáris reverzibilis kapuzási sémát (**20. a ábra**) követnek.



**20. ábra: A CFTR spontán pórusnyitásainak mechanizmusa és a funkciónyeréssel járó mutációk, illetve az ATP-kötés kapuzási energetikára gyakorolt hatásai**

**a,** A spontán kapuzó CFTR csatorna sematikus domén elrendeződése a zárt (C), átmeneti ( $T^\ddagger$ ) és nyitott (O) állapotokban. A panel színekódolása megegyezik a **8. b ábrán** használttal: sárga, plazmamembrán; szürke, TMD-k; zöld, NBD1; kék, NBD2; kék és piros körök jelölik a mutáns ciklus analízishez felhasznált célpozíciók helyzetét.

**b,** Az energetikai kapcsoltágban bekövetkező változások a vizsgált pozíciók között a spontán kapuzás során.

**c,** WT (narancssárga vonal) és P355A-K978C (fekete vonal) CFTR csatornák ATP hiányában megfigyelhető spontán kapuzásának, valamint a nem-hidrolizáló K1250R CFTR csatorna telítési ATP jelenlétében megfigyelhető kapuzásának (szürke vonal) [190] szabadentalpia profiljai. A fekete és szürke lefele mutató nyilak a funkciónyeréssel járó (BG) mutációk, illetve a kompozit kötőhelyek ATP kötésének energetikai hatásait szemléltetik.

### 5.1.2 A funkciónyeréssel járó mutációk eltérő mértékben stabilizálják az átmeneti és a nyitott állapotot

A csatorna különböző részeihez kötődő „allosztérikus modulátorok” ATP-t kötő és ATP-t nem kötő csatornákon kifejtett hatásai nemcsak hogy szoros korrelációt mutatnak, de a különböző modulátorok hatásai additívnak is bizonyultak. Például, az ATP-t kötött és nem kötött csatornák nyitvatartási valószínűsége egyaránt növekszik az R-domén foszforilációjával, feltételezhetően az R-domén és a TMD-k közötti kölcsönhatás megváltozása révén [215], illetve a CF terápiájában használt, valószínűleg a TMD-ken ható, ivacaftor hatására [204]. Továbbá különböző, az intracelluláris hurkokban elhelyezett mutációk növelhetik [215, 216, 225] vagy csökkenthetik [226] mind az ATP-t kötött, mind a nem kötött csatornák nyitvatartási valószínűségét. Jelen eredményeink kézenfekvő magyarázatot kínálnak mindezen megfigyelések értelmezésére: annak a nyitott csatornaszerkezetnek (**20. a ábra, jobb oldala**) az energetikai stabilizációját vagy destabilizációját, amelyről kimutattuk, hogy alapvetően hasonló elrendeződésű ATP-t kötött és nem kötött formában is.

A WT és az általunk modellként használt háttér (BG) CFTR csatornák kapuzási paramétereinek összehasonlítása magyarázattal szolgálhat a funkciónyeréssel járó mutációk spontán aktivitást fokozó hatásának mechanizmusára (**20. c ábra, fekete vs. narancs szabadentalpia profil**). A P355A-K978C kettős mutáció a spontán nyitott konformációt  $\sim 8.1$   $kT$  mértékben (**20. c ábra, jobb fekete nyíl**) stabilizálva fokozza a spontán  $P_o$ -t (**8. d ábra, BG vs. WT**), és ennek hátterében nemcsak a fokozott nyitási, hanem a csökkent záródási sebesség is áll. A spontán nyitások átlagos burst időtartamának megnyúlása a BG mutánsban (WT:  $60 \pm 9$  ms ( $n = 5$ ) vs. BG:  $1566 \pm 235$  ms ( $n = 19$ )) a csatorna záródását megakadályozó termodinamikai barrier ( $\Delta\Delta G_{(T-O)}$ )  $\sim 3.3$   $kT$  mértékű emelkedését jelenti a WT-hoz viszonyítva. Összességében ezen eredmények szerint a funkciónyeréssel járó BG mutációk a spontán átmeneti állapotot lényegesen kevésbé (csupán  $8.1$   $kT - 3.3$   $kT = \sim 4.8$   $kT$  mértékben) stabilizálják (**20. c ábra, bal fekete nyíl**), mint a nyitott állapotot. A célzott aminosav oldalláncok tehát molekuláris környezetükben változást érzelnek, bármelyik irányból is éri el a spontán átmeneti állapotot. Az átmeneti állapotban tehát az oldalláncok környezetének konformációváltozása még folyamatban van, vagyis e régiók még nem érték el a spontán

nyitott állapotra jellemző térszerkezetüket. Ez a megfigyelés egybevághat egy már korábban leírt, az NBD-TMD határfelületen található pozíció ATP-függő pórusnyitás során bekövetkező mozgásainak időzítésével [197]. Azaz, feltételezhető, hogy – az ATP-t kötött csatorna kapuzásához hasonlóan – a spontán megnyílások esetében is a rövid élettartamú, magas szabadentalpiájú átmeneti állapotban a pórus még zárva van (**20. a ábra, közepen**).

### 5.1.3 A kötött ATP-k eltérő mértékben stabilizálják az átmeneti és a nyitott állapotot

Hogyan segíti elő a pórusnyitást a csatorna természetes ligandja, az ATP? Eredményeink alapján megállapítható, hogy a kötött ATP nem változtatja meg a zárt és nyitott konformációk alapvető elrendeződését. Sokkal inkább molekuláris ragasztóként lehet elképzelni, amely stabilizálja az átmeneti és a nyitott állapotot. Mivel az ATP jelenlétében megnyíló csatornák záródása nem a megnyílással ellentétes irányú reverzibilis útvonal mentén, hanem a 2-es kötőhelyen kötött ATP hidrolízisén keresztül történik [159], ezért a WT csatorna kapuzásának ATP hiányában, illetve jelenlétében (**8. d ábra, WT+ATP vs. WT**) meghatározott termodinamikai profiljainak összehasonlítása nem alkalmas az ATP kötés energetikai hatásának értelmezésére. Azonban a WT csatorna spontán kapuzásának termodinamikai profilját egy ATP-t kötött hidrolízis-képtelen mutánsával összehasonlítva némi fogalmat alkothatunk az ATP kötésnek a csatorna kapuzási energetikájára gyakorolt hatásáról (**20. c ábra, szürke vs. narancssárga szabadentalpia profil**). Az ATP hidrolízist megakadályozó 2-es kötőhely mutációk mind megnyújtják az átlagos burst időtartamot és a ciklikus kapuzási mechanizmust egyensúlyivá csonkítják, arra kényszerítve a csatornát, hogy ugyanazon a magas szabadentalpiájú átmeneti állapoton keresztül záródjon be, mint amelyen keresztül megnyílt (**20. a ábra**) [159, 190, 197]. Például, a telítési ATP jelenlétében kapuzó K1250R (2-es kötőhely Walker A szekvencia) mutáns ( $P_o \sim 0.6$ ,  $\tau_b = 9323$  ms [190]) és a spontán kapuzó WT csatornák nyitvatartási valószínűségeiből és átlagos burst időtartamaiból számított szabadentalpia profilok összehasonlításából az derül ki, hogy a kötött ATP  $\sim 10.3$  kT mértékben stabilizálja a nyitott állapotot (**20. c ábra, jobb szürke nyíl**), míg a csatorna záródását megakadályozó termodinamikai barrier magassága ( $\Delta\Delta G_{(T-O)}$ )  $\sim 5.1$  kT mértékben csökken. Eszerint az ATP kötés kevésbé stabilizálja az

átmeneti állapotot (csak  $10.3 \text{ kT} - 5.1 \text{ kT} = \sim 5.2 \text{ kT}$  mértékben), mint a nyitott állapotot (**20. c ábra**, bal szürke nyíl). Tehát, bár az ATP-t kötött NBD érintkezési felszínek a 2-es kötőhely körül már az átmeneti állapotban is szoros dimert képeznek [197], ebben az állapotban a kötött ATP még nem fejt ki teljes mértékben "molekuláris ragasztó" hatását, mivel az jelentősen tovább erősödik, amikor a csatorna eléri stabil nyitott állapotát. Ez a következtetés az NBD dimerizációs felszínek további molekuláris átrendeződését valószínűsíti, miközben a csatorna az átmeneti állapotból a nyitott állapotba billen. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy az átmeneti állapotban az 1-es kötőhely még nem érte el nyitott állapotára jellemző konformációját, vagyis, míg a 2-es kötőhelyben kötött ATP már az átmeneti állapotban is teljes mértékben kifejti molekuláris ragasztó hatását, addig az 1-es kötőhelyben kötött ATP csak a nyitott állapotban.

## 5.2 A degenerált ATP-kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltozásainak vizsgálata

A CFTR degenerált 1-es kötőhelyében két szerkezeti perturbációnak a kapuzásra gyakorolt hatásait vizsgáltuk: az NBD2 signature szekvenciájában található 1348-as hisztidin oldalláncát eltávolítottuk, illetve az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP adenin gyűrűjének N<sup>6</sup>-os pozíciójához feniletil csoportot kapcsoltunk.

Bár kísérleteinkben, a hosszas P-ATP alkalmazásnak köszönhetően, feltehetőleg mindkét kompozit kötőhelyben már az ATP analóg volt jelen, korábbi munkák meggyőzően bizonyították, hogy a burst-ök időtartamára (**12. F ábra**) az 1-es kötőhelyen kötött nukleotid szerkezete van hatással, míg a 2-es kötőhelyen kötött nukleotid a látszólagos affinitást (**12. B és C ábra**), illetve a maximális nyitási sebességet határozza meg [206]. Továbbá, a P-ATP és a nem-hidrolizáló AMP-PNP együttes alkalmazásával nyitvarekesztett csatornákon végzett kísérletek tanúsága szerint, a nem-hidrolitikus záródást is az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP lassítja [221]. Ezen korábbi megfigyelések további független megerősítéseként mind a hidrolitikus, mind a nem-hidrolitikus záródás kapcsán energetikai kapcsoltságot igazoltunk a P-ATP feniletil csoportja és az 1-es kötőhely két oldalán kiválasztott pozíciók között (**15. és 16. ábrák**).

Steady-state egy csatornás mérések maximum likelihood illesztésével és makroszkópos áramok nukleotid elvonást követő lecsengéseinek exponenciális illesztésével meghatároztuk, mely mikroszkópikus sebességi állandók megváltozásai

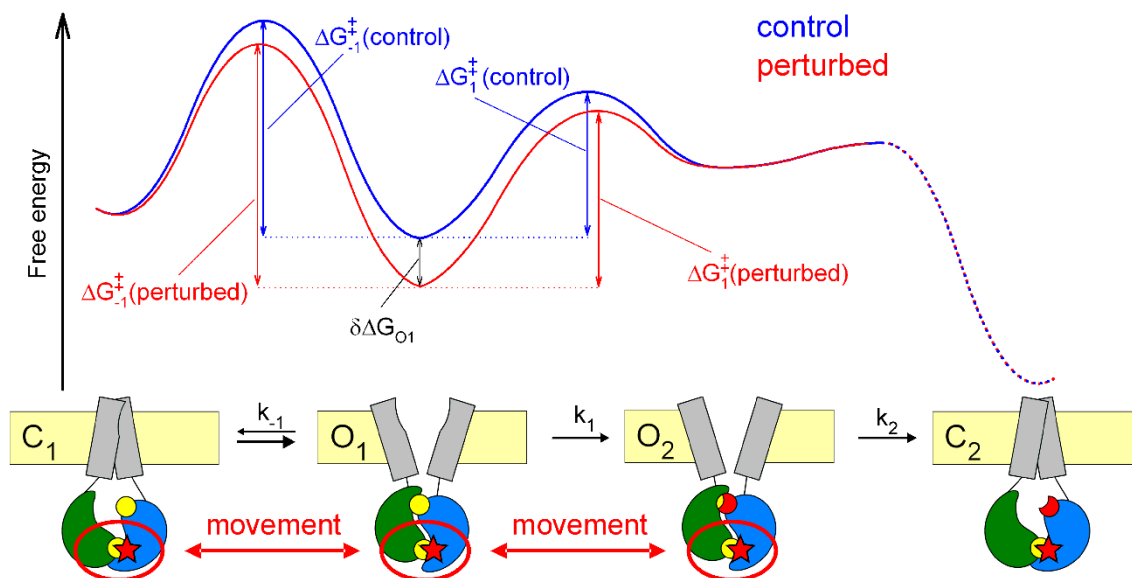


okozzák a vizsgált 1-es kötőhely perturbációknak a csatorna nyitott állapotát stabilizáló hatásait.

Nemrégiben felvetették [182, 205], hogy a burst-ök poszthidrolitikus szakaszában létezik egy rövid időablak, amely során a csatorna még nyitva van, de a 2-es kötőhelyen lezajlott hidrolízis végtermékei már ledisszociáltak, lehetőséget teremtve egy újabb ATP megkötésére anélkül, hogy a csatorna eközben bezáródna. A szerzők azt is felvetették, hogy bizonyos mutációk – mint pl. az 1-es kötőhelyben található W401F mutáció – illetve hatóanyagok fokozhatják az ilyen „reentry” események gyakoriságát, ami a burst-ök megnyúlását eredményezi [182, 204, 205]. Mivel az általunk vizsgált perturbációk is az 1-es kötőhelyben találhatók és a burst-ök megnyúlásával járnak, felmerült, hogy egy hasonló „reentry” mechanizmus magyarázhatja-e a kapott fenotípusokat. Azonban a H1348A mutáns átlagos steady-state burst időtartamai ATP koncentráció-függetlennek bizonyultak (**13. C ábra**), és a makroszkópos áramok nukleotid elvonást követő lecsengéseinek időállandói összhangban voltak a telítési nukleotid koncentrációk mellett steady-state körülmények között meghatározott burst időtartamokkal (**17. ábra**). Ezek az eredmények kizárják a reentry lehetőségét, és igazolják, hogy az általunk vizsgált két 1-es kötőhely perturbáció nem zavarja meg az ATP kötés és a pórusnyitások közötti közel 1:1 arányú kapcsoltságot, ami az ATP-ben kapuzó WT CFTR csatornák jellemző sajátossága [159]. Bár a makroszkópos és a steady-state záródási sebességek összehasonlítása talán nem elég érzékeny az 1:1 aránytól való mérsékelt eltérés észlelésére, azonban az átlagos burst időtartamok általunk észlelt, kétszeres, háromszoros megnyúlásának magyarázatára a mérsékelnél jóval nagyobb eltérésre lenne szükség.

A kinetikai méréseink értelmezéséhez a **19. C ábrán** látható egyszerűsített ciklikus modellt használtuk, és meghatároztuk a vizsgált 1-es kötőhely perturbációk hatásait a nyitott állapot stabilitását meghatározó három sebességi állandóra:  $k_1$  ( $O_1 \rightarrow C_1$ ),  $k_1$  ( $O_1 \rightarrow O_2$ ) és  $k_2$  ( $O_2 \rightarrow C_2$ ) (**19. C ábra**).

A részletes kinetikai elemzés eredményei szerint a vizsgált perturbációk hatásai nagyon hasonlóak: mindkettő felére-harmadára csökkenti az  $O_1 \rightarrow O_2$  és az  $O_1 \rightarrow C_1$  átmeneteknek megfelelő  $k_1$  és  $k_{-1}$  sebességi állandókat. Ezen eredmények a CFTR kapuzási ciklus szabadentalpia profiljának (**21. ábra, kék szabadentalpia profil**) tükrében egyszerűen értelmezhetőek az  $O_1$  állapot szelektív stabilizálásával ( $\Delta\Delta G_{O_1}$ ; **21. ábra, piros szabadentalpia profil**), amely az  $O_1 \rightarrow O_2$  ( $\Delta G_{-1}^\ddagger$ ; **21. ábra**) és az  $O_1 \rightarrow C_1$  ( $\Delta G_{-1}^\ddagger$ ;



**21. ábra: A P-ATP és a H1348A mutáció CFTR kapuzási energetikájára gyakorolt hatásainak szemléltetése**

Felső grafikon: A korábbiakban bemutatott kapuzási lépéseken (19. C ábra) keresztülhaladó WT (kék vonal) és 1-es kötőhelyében perturbált (piros vonal) CFTR csatorna szabadentalpiaváltozás-profiljainak összehasonlítása. (Az ábra nem méretarányos.) Az O<sub>1</sub> alapállapotnak – a C<sub>1</sub> és az O<sub>2</sub> alapállapotokhoz viszonyított – szelektív stabilizálása ( $\delta\Delta G_{O1}$ ) az O<sub>1</sub> állapotból kivezető mindkét energiagát magasságának ( $\Delta G^{\ddagger}_{-1}$  és  $\Delta G^{\ddagger}_1$ ) megnövekedését vonja maga után (piros vs. kék függőleges kettős nyilak), ami a  $k_{-1}$  és  $k_1$  sebességi állandók egyidejű csökkenéséhez vezet. Alsó sematikus ábra: a kapuzási konformációváltozások szemléltetése; az 1-es kötőhely perturbációját piros csillag jelöli.

21. ábra) átmeneti állapotokhoz tartozó energiagátak növekedését vonja maga után (21. ábra, piros vs. kék nyilak).

A H1348A mutánsban a nyitási sebesség kétszeresére gyorsulása (13. D ábra, zöld oszlop vs. 12. G ábra, kék oszlop) megfelel a C<sub>1</sub> → O<sub>1</sub> átmenethez tartozó energiagát csökkenésének. A P-ATP feniletíl csoportja kisebb mértékben, de szintén fokozza a nyitási sebességi állandót (12. G ábra, piros vs. kék oszlopok), azonban ez a hatás csak korlátozottan értelmezhető, tekintettel arra, hogy azt a 2-es kötőhelyben kötött nukleotid okozza [206].

Az eddigi eredmények szerint az 1-es kötőhely körül az NBD-k nem válnak szét a csatorna záródásakor [206, 207], ezért a degenerált kötőhelyet egyszerű, merev szerkezetként képelték el, amely nem vesz részt az aszimmetrikus ABC-C fehérjék konformációváltozásaiban. Jelen eredményeink azonban nem támasztják alá ezt a

szemléletet. Ha az 1-es kötőhely rigid szerkezetként viselkedne, azaz az 1-es kötőhely körüli konformáció a csatorna kapuzása során nem változna, akkor az itt elhelyezett perturbációk környezete a kapuzási ciklus során állandó maradna. Azaz, a perturbált csoportok másodlagos kötési energiáinak összessége nem változna az  $O_1 \rightarrow O_2$  és az  $O_1 \rightarrow C_1$  átmeneti állapotok, illetve a stabil  $O_1$  állapot között, így e perturbációk nem befolyásolnák ezen termodinamikai barrierek magasságait. Azonban kísérletes eredményeink e termodinamikai barrierek ( $\Delta G^\ddagger_1$  és  $\Delta G^\ddagger_{-1}$ ; **20. ábra**) változását igazolják mindkét 1-es kötőhely perturbációnk esetén, ami a perturbált csoportok lokális környezetében a kapuzási ciklus során bekövetkező molekuláris átrendeződést feltételez. Az 1-es kötőhely  $C_1 \rightleftharpoons O_1$  lépés során történő átrendeződése, a kötőhely jelentős mozgását valószínűsíti a nyitási lépés során – még akkor is, ha a kötőhely maga nem válik szét a zárt állapotban. Az 1-es kötőhely  $O_1 \rightarrow O_2$  lépés során történő átrendeződése pedig érthetővé teszi, hogy e kötőhely perturbációi – allosztérikus módon – lassítani képesek az ATP hidrolízisét a 2-es kötőhelyben.

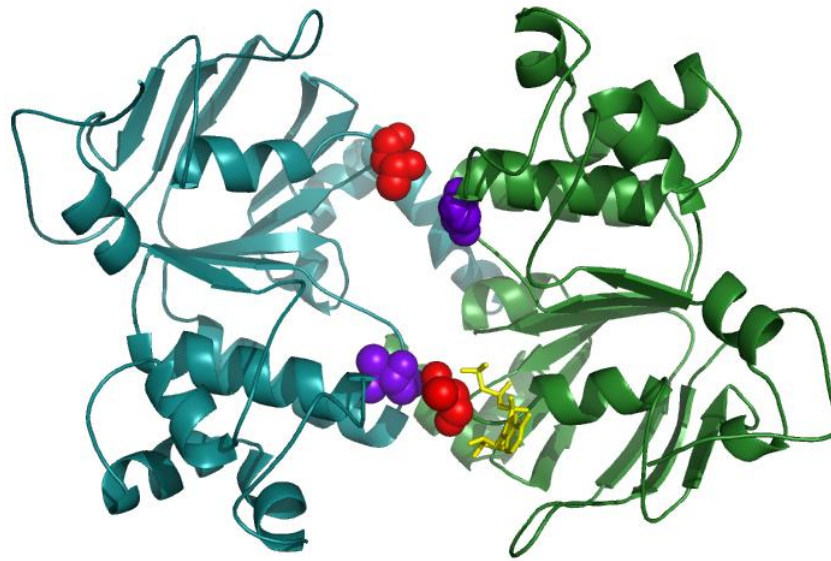
Egy további 1-es kötőhely perturbációról, a 464-es pozíció konzervált Walker A lizin-oldalláncának eltávolításáról (K464A) is ismert, hogy befolyásolja a fenti két sebességi állandót, bár ezen hatások iránya némileg eltérő: a  $k_1$  sebességi állandót a K464A mutáció negyedére csökkenti [159], míg K1250A modellben a nem-hidrolitikus záródás sebességi állandót ( $k_{-1}$ ) tízszeresére növeli [159]. A K464A perturbáció és az itt vizsgált két perturbáció tehát másként torzítják a szabadentalpia profilt, a konklúzió azonban azonos: mozgás az 1-es kötőhelyben az  $O_1 \rightarrow C_1$  és az  $O_1 \rightarrow O_2$  konformációváltozások során.

Bár az 1-es kötőhely szemközti felszínein létrehozott két perturbáció, az NBD1 K464A és az NBD2 H1348A mutációja, ellentétes irányban befolyásolják az  $O_1$  állapot stabilitását a  $C_1$  állapothoz képest. E hatásaikat a reverzibilis  $C_1 \rightleftharpoons O_1$  átmenet mindkét sebességi állandójának – a nyitási ( $k_{C_1 \rightarrow O_1}$ ) és a nem-hidrolitikus záródási ( $k_{-1}$ ) sebességi állandónak – együttes megváltoztatásával érik el: a K464A mutáció esetén a  $k_{C_1 \rightarrow O_1}$  csökken és a  $k_{-1}$  nő [159], a H1348A mutáció esetén a  $k_{C_1 \rightarrow O_1}$  nő és a  $k_{-1}$  csökken (**13. D és 14. B és E ábrák**). (A P-ATP-vel végzett kísérleteinkben mért nyitási sebességi állandó nem tekinthető az 1-es kötőhely perturbációja szempontjából értékelhetőnek, mert azt a 2-es kötőhelyen kötött ligand befolyásolja [206, 221, 227].) A perturbációk ilyen kinetikai hatása az átmeneti állapotban éppen mozgásban lévő molekularészek

jellemzője. Vagyis, míg a 2-es kompozit kötőhely, ATP jelenlétében [197] és annak hiányában (**20. b ábra**) is, már az átmeneti állapotban eléri a nyitott állapotára jellemző lokális térszerkezetét, addig az 1-es kötőhely lokális konformációváltozása csak később fejeződik be, és ténylegesen csak a pórus megnyílásakor éri el végső, nyitott állapotra jellemző lokális konformációját.

Az ezidáig rendelkezésre álló egyetlen aszimmetrikus ABC transzporter kristályszerkezetben, a TM287/288 szerkezetében [87], a TMD-k a befelé nyitott konformációban állnak, amely feltételezhetően a CFTR zárt pórusának felel meg. Az NBD-k eközben részlegesen szétvált konformációban vannak (**22. ábra**): a 2-es kötőhely disszociált és nem tartalmaz nukleotidot (**22. ábra; felső kompozit kötőhely**), míg a degenerált 1-es kötőhely (**22. ábra; alsó kompozit kötőhely**) egy AMP-PNP molekulát tartalmaz, és két oldala között jóval kisebb a távolság. Ez utóbbi kötőhely D-hurkában található 521-es aszparagin (**22. ábra; rózsaszín, térkitöltött**) és a konzervált 368-as Walker A treonin (**22. ábra; piros, térkitöltött**) alfa szénatomjai között mindössze 5.7 Å a távolság, és az aszparagin kapcsolatban áll a kötött AMP-PNP  $\gamma$ -foszfátjával. A CFTR-ben az analóg pozícióknak megfelelő aminosavak (T460 - H1375) között az energetikai kapcsoltság nem változik a kapuzási ciklus során, amit a két oldallánc között folyamatosan fennálló kapcsolatként értelmeztek [207]. Azonban, szorosan dimerizált ABC fehérje szerkezetekben [56, 69] az 1-es kötőhely két oldala között a Walker A és a signature motívum közötti távolságok  $\sim 3$  Å-mel kisebbek, mint ami a TM287/288 szerkezetben [87] mérhető. Ez – jelen eredményeinkkel összhangban – az 1-es kötőhely két oldala közötti részleges szeparációra utal.

Eredményeink szerint a CFTR kapuzási ciklusa során nemcsak a kanonikus 2-es, hanem az 1-es kompozit ATP-kötőhelyben is szignifikáns konformációváltozás megy végbe, azonban e mozgások pontos mértékének és irányának feltárása további szerkezeti és funkcionális méréseket tesz szükségessé.



**22. ábra: A TM287/288 aszimmetrikus bakteriális ABC transzporter kristályszerkezetében a degenerált ATP-kötőhely két oldala részlegesen disszociált**

A degenerált kötőhelyben AMP-PNP-t (*sárga pálcikamodell*) kötő TM287/288 (Protein Data Bank azonosítószám: 3QF4) NBD dimerének kristályszerkezete. A konzervált Walker A treoninok (T368 a TM287-ben és T390 a TM288-ban; *pirosak*) és a D-hurkokban ezekkel szemközt elhelyezkedő analóg aminosavak (S499 a TM287-ben és N521 a TM288-ban; *lilák*) térkitöltő ábrázolással kiemelve. A kanonikus (*felső*) ATP-kötőhely nem tartalmaz kötött nukleotidot és nyitva van, míg a degenerált (*alsó*) kötőhely AMP-PNP-t köt, és a Walker A és a D-hurok közötti kapcsolat részlegesen megtartott. A NBD-k színekódolása az eddig használtaknak megfelelő: *zöld*, TM287 NBD-je; *kék*, TM288 NBD-je.

### 5.3 A kompozit kötőhelyek szerepe a CFTR kapuzásában

Doktori munkámban bizonyítottuk, hogy az NBD dimer nem csak ATP jelenlétében [190], hanem annak teljes hiányában (**20. b ábra**) is kialakul, bár az ilyen "üres" dimer stabilitása jelentős mértékben elmarad a két kötött ATP molekulát magába záróétól (**20. c ábra**, *szürke vs. narancssárga szabadentalpia profil*):  $\tau_{b(ATP)} = 9323 \pm 515$  ms ( $n = 49$ ) [190] vs.  $\tau_{b(\emptyset ATP)} = 60 \pm 9$  ms ( $n = 6$ ) (**8. d ábra**). Ez alapján nincs okunk feltételezni, hogy nem alakulhat ki olyan NBD dimer is, amelyben csak az egyik kötőhely zár magába ATP-t, míg a másik üresen marad. Ezen felvetés egyszerű magyarázatot kínál a szakirodalomban leírt néhány további eredmény értelmezésére is.

WT CFTR csatornák a makroszkópos áram ATP elvonást követő lecsengésének időállandójával ( $\tau = 0.46 \pm 0.02$  s ( $n = 25$ )) közel azonos sebességi állandóval

( $\tau = 0.34 \pm 0.03$  s ( $n = 20$ )) vesztik el a 2-es kötőhelybe zárt nukleotidot, míg az 1-es kötőhelyben ez nagyságrendekkel lassabban, átlagosan  $51 \pm 5$  s ( $n = 19$ ) alatt [206] megvégeződik. Bár kísérletes adatok utalnak arra, hogy a zárt csatornák ennél valamivel gyorsabban ( $\sim 30$  s alatt [181]) vesztik el a degenerált kötőhelybe zárt nukleotidot, az ATP elvonását közvetlenül követő időszakban a zárt csatornák egy része még ATP-t tartalmaz az 1-es kötőhelyben. Nagyszámú WT CFTR csatornát tartalmazó membránfoltban az ATP elvonását követő kb. fél percben még láthatók olyan új nyitások, amelyek élettartama összevethető az átlagos hidrolitikus burst-hosszal (2-300 ms, nem mutatott eredmény), és amelyek jól elkülönülnek a később észlelhető, ezeknél lényegesen rövidebb ( $60 \pm 9$  ms ( $n = 6$ )) (8. d ábra) spontán nyitásoktól (8. a ábra). Ezekről a pórusnyitásokról feltételezhető, hogy olyan NBD dimerek kialakulása okozza, amelyekben csupán a degenerált kötőhely tartalmaz ATP-t.

A harmadik leggyakoribb CF-t okozó G551D CFTR mutáció olyan csatornákat eredményez, amelyek csak a spontán mechanizmus révén képesek kapuzni [210], mert a 2-es nukleotid-kötőhelyben az NBD2 Walker motívumaihoz kötött ATP  $\gamma$  foszfátja és a mutáció következtében az NBD1 signature szekvenciájában megjelenő aszpartát oldallánc negatív töltése között fellépő elektrosztatikus taszítás gátolja a dimer kialakulását és a csatorna megnyílását. Ezért ez a csatorna még mM-os ATP koncentráció mellett sem mutat lényegesen nagyobb kapuzási aktivitást, mint nukleotidok teljes hiányában [210, 214, 228]. Azonban létezik egy olyan alacsony ATP koncentráció tartomány ( $10\text{--}20$   $\mu\text{M}$ ), amelyben a G551D csatornák aktivitása fokozódik. Ezt az elsőre paradoxnak tűnő megfigyelést a CFTR két nukleotid-kötőhelyének eltérő ATP affinitása magyarázhatja. Az 1-es kötőhely affinitása nagyobb [82], ezért az ATP koncentráció csökkentésével párhuzamosan nő az ATP-t csak az 1-es kötőhelyen tartalmazó csatornák aránya [214], amelyek esetében a dimerizáció lehetősége fokozott. (Hasonló hatás érhető el a 2-es kötőhely nukleotid affinitásának csökkentésével is, pl. az Y1219G mutáció segítségével.) Az ennél alacsonyabb ATP koncentrációknál azonban a G551D mutáns aktivitása újra csökken [214], jelezve, hogy az 1-es kötőhely kiüresedése után kialakuló spontán dimerek stabilitása kisebb a csak az 1-es kötőhelyen ATP-t tartalmazó dimerekénél.

Az irodalomból ismert, hogy a nem-hidrolitikus K1250A CFTR csatornában az ATP látszólagos affinitása lecsökken ( $K_{1/2}$  K1250A vs.  $K_{1/2}$  WT:  $6.5 \pm 4.8$  mM vs.

$57 \pm 2 \mu\text{M}$  [158]). Míg telítési, 10 mM-os, ATP koncentráció mellett e mutáns nyitott állapota igen stabil ( $\tau_b \sim 20 \text{ s}$  (**14. A és C ábra**)), addig alacsony, 10  $\mu\text{M}$ -os, ATP koncentráció mellett az átlagos burst-hossz 100 ms-os nagyságrendbe esik [229], azaz közel megegyezik a WT csatornák átlagos nyitvatartási idejével. A fenotípusra magyarázattal szolgálhat, hogy a két NBD közötti affinitáskülönbség növekedésével ezen csatornáknak alacsony ATP koncentráció mellett csak az 1-es kötőhelye foglalt, míg a mutáció következtében csökkent affinitású 2-es kötőhely üres marad. Ezt az értelmezést erősíti, hogy a szintén hidrolitikusan inaktív E1371S CFTR, amelynek ATP iránti affinitása érintetlen, 10  $\mu\text{M}$  ATP jelenlétében is többnyire hasonlóan hosszú burst-ökre nyílik meg, mint telítési ATP koncentráció mellett ( $\tau_b \sim 24 \text{ s}$  (**14. D és F ábra**)) [174].

A szintén csökkent ATP affinitással rendelkező ( $K_d = 391 \pm 118 \mu\text{M}$ ) [158], nem-hidrolizáló mutáns D1370N CFTR 2 mM ATP jelenlétében vizsgált burst-hossz eloszlása két komponensű exponenciálissal szignifikánsan jobban illeszthető, ami két eltérő átlagos élettartamú nyitott (burst) állapot létezését tükrözi: a burst-ök túlnyomó többségének átlagos élettartama 2 s körüli, de emellett tisztán feloldható egy  $\sim 200 \text{ ms}$ -os élettartamú burst populáció is [159]. A kétféle nyitott állapot mögött két eltérő konformáció feltételezhető. A hosszú komponens minden bizonnyal megfelel a mindkét nukleotid-kötőhelyben ATP-t kötő NBD dimerrel megnyíló csatornáknak, míg a rövidebb élettartamú komponens valószínűleg a csak az egyik kötőhelyben ATP-t kötő NBD dimerrel megnyíló csatornákat tükrözi.

WT CFTR esetében is leírták bizonyos kísérleti körülmények között az átlagos burst-hossz ATP koncentráció-függését: e tanulmányokban a burst-hossz minimális értéke közel azonos az előzőekben ismertetett, csak egy nukleotidot kötő, NBD dimerek élettartamával, és az ATP koncentráció emelésével mérsékelten megnyúlik [229].

A fenti öt példa egyaránt magyarázható azzal, hogy a nyitások mögött olyan NBD dimer is állhat, amelyben csak a 1-es, degenerált kötőhely köt ATP-t. Az előzőekben ismertetett példák logikája alapján azonban feltételezhetjük olyan NBD dimer létezését is, amely csak a katalitikusan aktív 2-es kötőhelyben tartalmaz ATP-t. Ilyen dimerizációs mechanizmus létezését valószínűsíti az alábbi két példa.

ATP jelenlétében, az annak elhasítására képtelen E1371S CFTR NBD-i igen stabil dimert alkotnak, amely nyitvarekeszti a csatornát (**14. D és F ábra**). Ennek a dimernek a stabilitását jelentős mértékben gyengíti az NBD1 A-hurkában található, az

1-es kötőhelyben kötött nukleotid purin bázisát stabilizáló, W401 aminosav mutációja: a dupla mutáns (W401G/E1371S) CFTR csatorna nyitott állapotának stabilitása csak közel fele az E1371S csatornáénak [227]. Ligand kicserélési kísérletekből tudjuk, hogy a W401G mutáns gyorsabban veszíti el az 1-es kötőhelyben kötött nukleotidot, mint a WT csatorna [181, 206]. A csatorna látszólagos ATP iránti affinitását azonban e mutáció nem befolyásolja, mert a W401G nyitási sebességének ATP koncentráció függése a WT-ével megegyező marad [227]. Miután a 2-es kötőhelyben található, a W401-es aminosavval analóg helyzetű és funkciójú, Y1219 aminosav mutációja jelentős mértékben jobbra tolja a csatorna nyitási sebességének ATP koncentráció függését [227], feltételezhetjük, hogy a W401G mutáció is "jobbra tolja" az 1-es kötőhely ATP affinitását. Tehát, vagy olyan magas a WT csatornák 1-es kötőhelyének ATP affinitása, hogy még a W401G csatornában is magasabb marad a 2-es kötőhelyénél, vagy pedig az 1-es ATP-kötőhely telítettsége nem játszik kulcsfontosságú szerepet a nyitási sebesség meghatározásában. Az utóbbi értelmezést valószínűsíti, hogy csak a 2-es kötőhelyben végbemenő ATP P-ATP csere befolyásolja a CFTR maximális nyitási sebességét [206]. Ha a fentiek, és a csak egy kötött ATP jelenlétében is kialakuló NBD dimer lehetőségének fényében próbáljuk értelmezni a W401F mutáns átlagos burst-hosszának mérsékelt ATP koncentráció függését [182], akkor valószínűsíthetjük, hogy az 1-es kötőhely mutáció révén csökkent ATP affinitása következtében alacsony ATP koncentrációk mellett már nem csak elvétele, hanem kimutatható – a burst időtartamok átlagát is befolyásoló – arányban jönnek létre olyan instabilabb dimerek, amelyekben a 2-es kötőhelybe zárt ATP mellett az 1-es kötőhely üres.

A G1349 aminosav az 1-es ATP-kötőhelyet alkotó NBD2 signature szekvenciájában található. Homológ a fent ismertetett, NBD1-ben található 551-es glicinnel, és aszpartát mutációja szintén CF-hez vezet, bár enyhébb lefolyással [210]. A kapuzás sérülésének molekuláris háttere analógiát mutat a G551D mutációnál már korábban tárgyaltakkal, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben az 1-es kötőhelyben kötött ATP  $\gamma$  foszfátja és a 1349-es pozícióban megjelenő aszpartát közötti elektrosztatikus taszítás miatt csökken a nyitvatartási valószínűség. A két mutáció súlyosságának összehasonlítása valószínűsíti, hogy a kapuzás szempontjából a két kötőhely közül a 2-es a fontosabb, mert annak mutáció okozta funkciókiesését az 1-es kompozit kötőhely kevésbé tudja pótolni, mint fordítva. A G1349D mutáns ugyanis



megtartott ATP-függő kapuzással rendelkezik, bár maximális nyitvatartási valószínűsége csak tizede a WT csatornáénak. Ugyanakkor, alacsony ATP koncentrációk mellett ez az arány lényegesen nagyobb, vagyis az ATP koncentráció csökkentése esetén a mutáció gátló hatása kevésbé érvényesül. A G1349D burst-jeinek átlagos időtartama hasonló, mint a hidrolitikusan aktív, vagy a csak egy ATP-t tartalmazó NBD dimerrel megnyíló, WT CFTR csatorna burst-hosszai, és ATP iránti látszólagos affinitása is jó közelítéssel megegyezik a WT csatornákéval, bár relatív árama alacsonyabb ATP koncentrációk mellett kevésbé meredeken csökken [210]. Ezek alapján feltételezhető, hogy a 2-es kötőhely ATP affinitása nem sérült, azonban a nagyobb affinitású [82] 1-es kötőhelyben kötött ATP akadályozza a csatorna megnyílását. Ez a gátló hatás csak akkor szűnik meg, ha az 1-es kötőhelyről ledisszociál az abban kötött ATP, és így az üresen marad, ennek esélye pedig az ATP koncentráció csökkenésével nő. Valószínűsíthető tehát, hogy az alacsony ATP koncentrációk mellett megnyíló G1349D csatornák NBD dimere többnyire csak a 2-es kötőhelyben tartalmaz ATP-t.

A fenti példák jól szemléltetik, hogy a hidrolízisre képtelen, két ATP-t magába záró NBD dimer termodinamikai stabilitásával ( $\tau_b > 20$  s) szemben, a nukleotid hiánya bármelyik kötőhelyből jelentős mértékben csökkenti az NBD dimer stabilitását ( $\tau_b < 0.5$  s), és e hatás különösen szembetűnő a két üres kötőhelyet tartalmazó "spontán" NBD dimer esetén ( $\tau_b \sim 60$  ms, v.ö., (8. *d ábra*)). Azaz mindkét ATP egyaránt szerepet kell hogy játszon a dimer stabilitásának meghatározásában. Ezzel látszólag ellentmondónak tűnhet, hogy míg a 2-es kötőhelyben kötött nukleotid purin bázisát stabilizáló 1219-es tirozin glicin mutációja nem befolyásolja, addig az 1-es kötőhely ezzel analóg W401G mutációja jelentősen csökkenti, a hidrolízisre képtelen (E1371S) dimer stabilitását [227], és hasonló mértékben befolyásolja azt számos egyéb 1-es kötőhely perturbáció is, pl. a K464A mutáció [159], a RI delécióna (16. *E ábra*) és a H1348A mutáció (16. *B ábra*). A két kötőhely perturbációinak a nem-hidrolitikus nyitott állapot élettartamára kifejtett különböző hatásai mögött a két kötőhely mozgásainak időbeli aszimmetriája állhat. Míg a 2-es kötőhely a nyitási átmeneti állapotban ( $T^\ddagger$ ) már elérte a nyitott állapotra jellemző konformációját [190, 197], azaz az itt kötött ATP molekuláris ragasztó hatása már a  $T^\ddagger$  állapotban teljesen érvényesül, addig az 1-es kötőhely a  $T^\ddagger$  állapotban még mozgásban van, és az itt kötött ATP teljes stabilizáló hatása csak a nyitott ( $O_1$ ) állapotban alakul ki (v.ö., 20. *c ábra*, szürke vs. narancsságra szabadentalpia profil). A 2-es kötőhely

perturbációi ezért hasonló mértékben hatnak a  $T^\ddagger$  és  $O_1$  állapotok szabadentalpiájára, összességében nem befolyásolva az  $O_1 \rightarrow C_1$  lépés energiagátjának magasságát (**21. ábra**;  $\Delta G^\ddagger_{-1}$ ). Ezzel szemben, az 1-es kötőhely perturbációi nagyobb mértékben torzítják (növelik vagy csökkentik) az  $O_1$  állapot szabadentalpiáját, mint a  $T^\ddagger$  állapotét, így az  $O_1 \rightarrow C_1$  energiagát magasságára is hatnak.

Ugyanezen gondolatmenet egyben megmagyarázza a nyitási sebesség fokozottabb érzékenységét a 2-es kötőhely perturbációival szemben: az  $O_1$  állapot szabadentalpiájának perturbáció okozta  $\delta\Delta G_{O_1}$  mértékű változásának következtében a nyitási energia barrier ( $\Delta G_{T-C_1}$ ) hasonló mértékben változik, ha a perturbáció a 2-es, de csak kisebb mértékben, ha a perturbáció az 1-es kötőhelyben található (v.ö., **21. ábra**). Ennek alapján érthető, hogy a 2-es kötőhely szemközti felszínein elhelyezkedő T1246 és R555 aminosavak mutációi drámaian csökkentik a nyitási sebességet [190, 197] (**11. f ábra**), míg az 1-es kötőhely homológ pozícióinak (T460, L1353) mutációi jóval szerényebb hatással vannak arra [207]. Hasonlóképpen, a 2-es kötőhelyben kötött ATP-nek P-ATP-re történő cseréje jelentős mértékben gyorsítja a maximális nyitási sebességet, míg ugyanez a csere az 1-es kötőhelyben nem befolyásolja azt [206]. Végezetül, minthogy a csatorna megnyílását a 2-es kötőhelyhez kötődő nukleotid jóval nagyobb mértékben gyorsítja, ezért a nyitási sebesség ATP koncentráció-függése elsősorban az egyébként is kisebb affinitású 2-es kötőhely nukleotid-telítettségének ATP-függését tükrözi. Ebből adódik, hogy a 2-es kötőhely mutációi általában markánsabban tolják el a csatorna látszólagos ATP affinitását (pl. Y1219G [227] vagy K1250A [158] mutációk), mint az 1-es kötőhely analóg perturbációi (pl. W401G [227] vagy K464A [158]).

## 6 Következtetések

### 6.1 A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata

- Igazoltuk, hogy a spontán megnyílások – csakúgy, mint az ATP jelenlétében bekövetkezők – az NBD-k 2-es ATP-kötőhely körüli szoros dimerizációjához kapcsolódnak. A 2-es kötőhely körül a dimer már az átmeneti állapotban kialakul.
- A BG mutációk által érintett P355 és K978 aminosav oldalláncok molekuláris környezetükben változást észlelnek, bármelyik irányból is éri el a spontán átmeneti állapotot, vagyis azok az átmeneti állapotban még mozgásban vannak. Ennek alapján feltételezhető, hogy – az ATP-t kötött csatorna kapuzásához hasonlóan – a spontán megnyílások esetében is a rövid élettartamú, magas szabadentalpiájú átmeneti állapotban a pórus még zárva van.
- A WT csatorna spontán kapuzásának termodinamikai profilját egy ATP-t kötött hidrolízis-képtelen mutánséval összehasonlítva megállapítható, hogy az ATP kötés mind az átmeneti, mind a nyitott állapotot stabilizálja, de utóbbit nagyobb mértékben. Ez a csatorna átmeneti állapotából nyitott állapotába billenése közben az NBD dimerizációs felszínnek további molekuláris átrendeződését valószínűsíti. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy az átmeneti állapotban az 1-es kötőhely még nem érte el nyitott állapotára jellemző konformációját.

### 6.2 A degenerált ATP-kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltozásainak vizsgálata

- CFTR hidrolitikus és nem-hidrolitikus záródása kapcsán energetikai kapcsoltságot igazoltunk a P-ATP feniletíl csoportja és az 1-es kötőhely két oldalán kiválasztott pozíciók (H1348 és RI) között, ezzel további független bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a burst-ök hosszára az 1-es kötőhelyen kötött nukleotid szerkezete van hatással.
- A H1348A mutáció és az ATP/P-ATP csere csökkenti a  $k_1$  ( $O_1 \rightarrow O_2$ ) és  $k_{-1}$  ( $O_1 \rightarrow C_1$ ) sebességi állandókat, vagyis növelik az  $O_1 \rightarrow O_2$  és az  $O_1 \rightarrow C_1$

energiagátak magasságát, ami molekuláris átrendeződést feltételez az érintett csoportok lokális környezetében mind a megnyílás, mind a hidrolízis során.

- Bár az 1-es kötőhely két szemközti felszínén elhelyezkedő H1348A és K464A mutációk eltérő módon torzítják a kapuzási szabadentalpia profilt, mindkét perturbáció egyaránt befolyással van a  $k_{C1 \rightarrow O1}$  és a  $k_{-1}$  sebességi állandókra. Ez egyrészt tovább erősíti azt a következtetést, hogy a csatorna megnyílásakor az 1-es ATP-kötőhelyben lokális konformációváltozás zajlik, valamint arra is utal, hogy ez a lokális konformációváltozás az átmeneti állapotban még nem fejeződött be. Tehát az 1-es kötőhely csak a pórus megnyílásakor éri el végső, nyitott állapotra jellemző lokális konformációját.

## 7 Összefoglalás

A cisztás fibrózis (CF) hátterében a CFTR ioncsatorna funkcióvesztéssel járó mutációi állnak. A CFTR csatorna pórusát a nukleotidkötő doménjeinek (nucleotide binding domain, NBD) ATP-függő dimerizációja nyitja meg, majd az egyik kötött ATP hidrolízisét követően a dimer szétesése zárja be. A dimerizációs felszínek alkotta két nukleotid-kötőhely funkcionálisan különböznek. A kapuzási ciklus során a kanonikus, katalitikusan aktív 2-es kötőhely dimerizált prehidrolitikus ( $O_1$ ), dimerizált poszthidrolitikus ( $O_2$ ) és disszociált (C) állapotain a  $C \rightarrow O_1 \rightarrow O_2 \rightarrow C$  sorrendben halad keresztül. Ezzel ellentétben, a katalitikusan inaktív 1-es kötőhely több kapuzási cikluson keresztül kötve tartja az ATP-t, és csak részlegesen nyílik fel.

A vad típusú (WT) CFTR csatorna ATP hiányában bekövetkező spontán megnyílásai ritkák, de bizonyos CF mutánsoknak ez a kizárólagos kapuzási mechanizmusa, amely ivacaftorral, az egyetlen klinikailag is igazolt CFTR potenciátorral, fokozható. A spontán kapuzás molekuláris mechanizmusa még nem tisztázott. Munkánkban vizsgáltuk a dimer érintkezési felület két oldalán található aminosav oldalláncok energetikai kapcsoltságának változásait a spontán kapuzás során. Igazoltuk, hogy a spontán pórus nyitások ATP hiányában is szorosan kapcsolatosak az NBD-k dimerizációjához. Az összehangolt NBD/pórus mozgás a CFTR csatorna egyedi tulajdonsága: az ATP nem a zárt és a nyitott konformációk szerkezetét befolyásolja, csak stabilizálja a nyitott állapotot. Az NBD dimerbe bezárt két ATP molekula erősebben stabilizálja a nyitott, mint az átmeneti állapotot. Míg a 2-es kötőhelyben már az átmeneti állapot eléréseig lezajlik a konformációváltozás, addig valószínű, hogy az 1-es kötőhelyben kötött ATP molekuláris környezete csak a nyitott állapot elérésekor éri el az arra jellemző lokális szerkezetét. Az 1-es kötőhely perturbációk kapuzásra gyakorolt hatásainak vizsgálata alapján a P-ATP és a H1348A mutáció szelektíven stabilizálják a CFTR prehidrolitikus nyitott ( $O_1$ ) állapotát: ennek következménye a WT csatornák  $O_1 \rightarrow O_2$  lépésének, illetve a K1250A és E1371S csatornák nem-hidrolitikus záródási sebességének ( $O_1 \rightarrow C$  átmenet) lassulása. A különböző 1-es kötőhely perturbációknak az  $O_1 \rightarrow C$  és az  $O_1 \rightarrow O_2$  átmenetekre gyakorolt hatásai lokális szerkezeti változásokat igazolnak mind a csatorna megnyílásakor, mind a 2-es kötőhelyben kötött ATP hidrolízise közben.

Tehát a CFTR pórusának megnyílása, még ATP hiányában is, az NBD-k 2-es ATP-kötőhely körüli szoros dimerizációjához kapcsolódik. Míg a dimerizációs felszín a 2-es kötőhely körül már az átmeneti állapotban záródik, addig a degenerált kötőhely mozgása valamivel később megy végbe, ezért az 1-es kötőhely dimert stabilizáló hatása csak a nyitott állapotban érvényesülhet teljes mértékben.

## 8 Summary

In CFTR, the chloride channel mutated in cystic fibrosis (CF) patients, ATP-binding-induced dimerization of two cytosolic nucleotide binding domains (NBDs) opens the pore, and dimer disruption following ATP hydrolysis closes it. In CFTR the two interfacial binding sites are functionally different. During gating, the canonical, catalytically active nucleotide-binding site (site 2) cycles between dimerized prehydrolytic (state  $O_1$ ), dimerized post-hydrolytic (state  $O_2$ ), and dissociated (state C) forms in a preferential  $C \rightarrow O_1 \rightarrow O_2 \rightarrow C$  sequence. In contrast, the catalytically inactive nucleotide-binding site (site 1) is believed to remain associated, ATP-bound, for several gating cycles.

Spontaneous openings without ATP are rare in wild-type (WT) CFTR, but in certain CF mutants constitute the only gating mechanism, stimulated by ivacaftor, a clinically approved CFTR potentiator. The molecular motions underlying spontaneous gating are unclear. We correlated energetic coupling between residues across the dimer interface with spontaneous pore opening/closure in single CFTR channels. We showed that spontaneous openings are also strictly coupled to NBD dimerization, which may therefore occur even without ATP. Coordinated NBD/pore movements are therefore intrinsic to CFTR: ATP alters the stability, but not the fundamental structural architecture, of open- and closed-pore conformations. The two ATP molecules bound at interfacial binding sites stabilize the open conformation more than the transition state. Because there is no further conformational rearrangement in site 2 when the channel relaxes from the transition state towards the stable open state, it seems likely that it is the ATP bound in site 1 that experiences some conformational rearrangement during this step. We have examined the possibility of conformational changes in site 1 during ATP-dependent gating, by studying gating effects of perturbations in site 1. We found that P-ATP and the H1348A mutation prolong WT CFTR burst durations by selectively slowing transition  $O_1 \rightarrow O_2$ , and decrease the nonhydrolytic closing rate (transition  $O_1 \rightarrow C$ ) of CFTR mutants K1250A and E1371S. The marked effects of different site-1 structural perturbation on both steps  $O_1 \rightarrow C$  and  $O_1 \rightarrow O_2$  suggest that the global conformational changes that CFTR undergoes both upon opening, and coincident with ATP hydrolysis at the active site 2, include significant structural rearrangements at site 1.

Our results show that opening of the CFTR pore is coupled to the formation of an NBD dimer, even in the absence of ATP. We propose that the dimer interface tightens around site 2 already in the transition state, while movements at the degenerate site are somewhat delayed causing site 1 to reach its full stability only in the open state.

## 9 Irodalomjegyzék

1. Andersen D. (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. *Am J Dis Child*, 56: 344–399.
2. Guggino WB. (1999) Cystic fibrosis and the salt controversy. *Cell*, 96: 607-610.
3. Quinton PM. (1999) Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev*, 79: S3-s22.
4. Goodman BE, Percy WH. (2005) CFTR in cystic fibrosis and cholera: from membrane transport to clinical practice. *Adv Physiol Educ*, 29: 75-82.
5. Quinton PM. (2007) Too much salt, too little soda: cystic fibrosis. *Sheng Li Xue Bao*, 59: 397-415.
6. Quinton PM. (2007) Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology (Bethesda)*, 22: 212-225.
7. Borowitz D. (2015) CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 50 Suppl 40: S24-s30.
8. O'Sullivan BP, Freedman SD. (2009) Cystic fibrosis. *Lancet*, 373: 1891-1904.
9. Elborn JS. (2016) Cystic fibrosis. *Lancet*, 388: 2519-2531.
10. Cystic Fibrosis Mutation Database.  
<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>.
11. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE. (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63: 827-834.
12. Miki H, Zhou Z, Li M, Hwang TC, Bompadre SG. (2010) Potentiation of disease-associated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutants by hydrolyzable ATP analogs. *J Biol Chem*, 285: 19967-19975.
13. Jih KY, Li M, Hwang TC, Bompadre SG. (2011) The most common cystic fibrosis-associated mutation destabilizes the dimeric state of the nucleotide-binding domains of CFTR. *J Physiol*, 589: 2719-2731.

14. Kopeikin Z, Yuksek Z, Yang HY, Bompadre SG. (2014) Combined effects of VX-770 and VX-809 on several functional abnormalities of F508del-CFTR channels. *J Cyst Fibros*, 13: 508-514.
15. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*, 18: 465-483.
16. Ali M, Nelson AR, Lopez AL, Sack DA. (2015) Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLoS Negl Trop Dis*, 9: e0003832.
17. Griffith DC, Kelly-Hope LA, Miller MA. (2006) Review of reported cholera outbreaks worldwide, 1995-2005. *Am J Trop Med Hyg*, 75: 973-977.
18. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. (2012) Cholera. *Lancet*, 379: 2466-2476.
19. Nataro JP, Kaper JB. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11: 142-201.
20. Quinton PM. (1994) Human genetics. What is good about cystic fibrosis? *Curr Biol*, 4: 742-743.
21. Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ. (1994) Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science*, 266: 107-109.
22. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245: 1066-1073.
23. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*, 11: 1156-1166.
24. Dean M, Annilo T. (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 6: 123-142.
25. Kinoshita E, van der Linden E, Sanchez H, Wyman C. (2009) RAD50, an SMC family member with multiple roles in DNA break repair: how does ATP affect function? *Chromosome Res*, 17: 277-288.



26. Hingorani MM. (2016) Mismatch binding, ADP-ATP exchange and intramolecular signaling during mismatch repair. *DNA Repair (Amst)*, 38: 24-31.
27. Hopfner KP, Tainer JA. (2003) Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr Opin Struct Biol*, 13: 249-255.
28. Boel G, Smith PC, Ning W, Englander MT, Chen B, Hashem Y, Testa AJ, Fischer JJ, Wieden HJ, Frank J, Gonzalez RL, Jr., Hunt JF. (2014) The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nat Struct Mol Biol*, 21: 143-151.
29. Lamers MH, Winterwerp HH, Sixma TK. (2003) The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair. *Embo j*, 22: 746-756.
30. Locher KP. (2009) Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364: 239-245.
31. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. (2009) ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 218-227.
32. Holland IB. (2011) ABC transporters, mechanisms and biology: an overview. *Essays Biochem*, 50: 1-17.
33. ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ. (2014) Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol*, 143: 419-435.
34. Wilkens S. (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*, 7: 14.
35. Oldham ML, Khare D, Quijcho FA, Davidson AL, Chen J. (2007) Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature*, 450: 515-521.
36. Khare D, Oldham ML, Orelle C, Davidson AL, Chen J. (2009) Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations. *Mol Cell*, 33: 528-536.
37. Oldham ML, Chen J. (2011) Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 15152-15156.
38. Oldham ML, Chen J. (2011) Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science*, 332: 1202-1205.

39. Oldham ML, Chen S, Chen J. (2013) Structural basis for substrate specificity in the *Escherichia coli* maltose transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 18132-18137.
40. Chen S, Oldham ML, Davidson AL, Chen J. (2013) Carbon catabolite repression of the maltose transporter revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 499: 364-368.
41. Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, 396: 703-707.
42. Yuan YR, Blecker S, Martsinkevich O, Millen L, Thomas PJ, Hunt JF. (2001) The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem*, 276: 32313-32321.
43. Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ, Hunt JF. (2001) Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure*, 9: 571-586.
44. Gaudet R, Wiley DC. (2001) Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *Embo j*, 20: 4964-4972.
45. Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, et al. (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*, 323: 448-450.
46. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346: 362-365.
47. Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, 15: 430-434.
48. Story RM, Weber IT, Steitz TA. (1992) The structure of the *E. coli* recA protein monomer and polymer. *Nature*, 355: 318-325.

49. Story RM, Steitz TA. (1992) Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature*, 355: 374-376.
50. Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370: 621-628.
51. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*, 1: 945-951.
52. Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. (1991) Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*, 67: 775-784.
53. Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA. (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*, 101: 789-800.
54. Obmolova G, Ban C, Hsieh P, Yang W. (2000) Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*, 407: 703-710.
55. Lamers MH, Perrakis A, Enzlin JH, Winterwerp HH, de Wind N, Sixma TK. (2000) The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature*, 407: 711-717.
56. Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, Hunt JF. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*, 10: 139-149.
57. Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quijcho FA. (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell*, 12: 651-661.
58. Verdon G, Albers SV, van Oosterwijk N, Dijkstra BW, Driessen AJ, Thunnissen AM. (2003) Formation of the productive ATP-Mg<sup>2+</sup>-bound dimer of GlcV, an ABC-ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol*, 334: 255-267.

59. Zaitseva J, Jenewein S, Jumpertz T, Holland IB, Schmitt L. (2005) H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Embo J*, 24: 1901-1910.
60. Dawson RJ, Locher KP. (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, 443: 180-185.
61. Corradi V, Vergani P, Tieleman DP. (2015) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR): CLOSED AND OPEN STATE CHANNEL MODELS. *J Biol Chem*, 290: 22891-22906.
62. Schmees G, Stein A, Hunke S, Landmesser H, Schneider E. (1999) Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur J Biochem*, 266: 420-430.
63. Hunke S, Mourez M, Jehanno M, Dassa E, Schneider E. (2000) ATP modulates subunit-subunit interactions in an ATP-binding cassette transporter (MalFGK2) determined by site-directed chemical cross-linking. *J Biol Chem*, 275: 15526-15534.
64. Fetsch EE, Davidson AL. (2002) Vanadate-catalyzed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 9685-9690.
65. Moody JE, Millen L, Binns D, Hunt JF, Thomas PJ. (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem*, 277: 21111-21114.
66. Janas E, Hofacker M, Chen M, Gompf S, van der Does C, Tampe R. (2003) The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J Biol Chem*, 278: 26862-26869.
67. Locher KP, Lee AT, Rees DC. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, 296: 1091-1098.
68. Lin DY, Huang S, Chen J. (2015) Crystal structures of a polypeptide processing and secretion transporter. *Nature*, 523: 425-430.

69. Dawson RJ, Locher KP. (2007) Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett*, 581: 935-938.
70. Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, Chang G. (2007) Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 19005-19010.
71. Fersht A. General Catalysis. In: Fersht A (szerk.), *Structure and Mechanism in Protein Science*. W.H. Freeman and Company, New York, 1999: 61.
72. Dall'Acqua W, Carter P. (2000) Substrate-assisted catalysis: molecular basis and biological significance. *Protein Sci*, 9: 1-9.
73. Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, McColley SA, Rowe SM, Rietschel E, Huang X, Waltz D, Patel NR, Rodman D. (2014) A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*, 2: 527-538.
74. Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Ueda K. (1999) ATP binding properties of the nucleotide-binding folds of SUR1. *J Biol Chem*, 274: 37479-37482.
75. Vedovato N, Ashcroft FM, Puljung MC. (2015) The Nucleotide-Binding Sites of SUR1: A Mechanistic Model. *Biophys J*, 109: 2452-2460.
76. Nagata K, Nishitani M, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Ueda K. (2000) Nonequivalent nucleotide trapping in the two nucleotide binding folds of the human multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem*, 275: 17626-17630.
77. Hou Y, Cui L, Riordan JR, Chang X. (2000) Allosteric interactions between the two non-equivalent nucleotide binding domains of multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem*, 275: 20280-20287.
78. Gao M, Cui HR, Loe DW, Grant CE, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG. (2000) Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem*, 275: 13098-13108.

79. Bakos E, Homolya L. (2007) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch*, 453: 621-641.
80. Procko E, Ferrin-O'Connell I, Ng SL, Gaudet R. (2006) Distinct structural and functional properties of the ATPase sites in an asymmetric ABC transporter. *Mol Cell*, 24: 51-62.
81. Procko E, O'Mara ML, Bennett WF, Tieleman DP, Gaudet R. (2009) The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. *Faseb J*, 23: 1287-1302.
82. Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang XB, Riordan JR. (2002) The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *J Biol Chem*, 277: 15419-15425.
83. Basso C, Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC. (2003) Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH<sub>2</sub>-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *J Gen Physiol*, 122: 333-348.
84. Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, Hunt JF, Kearins MC, Lorimer D, Maloney PC, Post KW, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S, Thibodeau PH, Thomas PJ, Zhang M, Zhao X, Emtage S. (2004) Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Embo J*, 23: 282-293.
85. Lewis HA, Zhao X, Wang C, Sauder JM, Rooney I, Noland BW, Lorimer D, Kearins MC, Connors K, Condon B, Maloney PC, Guggino WB, Hunt JF, Emtage S. (2005) Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J Biol Chem*, 280: 1346-1353.
86. Lewis HA, Wang C, Zhao X, Hamuro Y, Connors K, Kearins MC, Lu F, Sauder JM, Molnar KS, Coales SJ, Maloney PC, Guggino WB, Wetmore DR, Weber PC, Hunt JF. (2010) Structure and dynamics of NBD1 from CFTR characterized using

- crystallography and hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Mol Biol*, 396: 406-430.
87. Hohl M, Briand C, Grutter MG, Seeger MA. (2012) Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. *Nat Struct Mol Biol*, 19: 395-402.
  88. Jin MS, Oldham ML, Zhang Q, Chen J. (2012) Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 490: 566-569.
  89. Shintre CA, Pike AC, Li Q, Kim JI, Barr AJ, Goubin S, Shrestha L, Yang J, Berridge G, Ross J, Stansfeld PJ, Sansom MS, Edwards AM, Bountra C, Marsden BD, von Delft F, Bullock AN, Gileadi O, Burgess-Brown NA, Carpenter EP. (2013) Structures of ABCB10, a human ATP-binding cassette transporter in apo- and nucleotide-bound states. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 9710-9715.
  90. Hohl M, Hurlimann LM, Bohm S, Schoppe J, Grutter MG, Bordignon E, Seeger MA. (2014) Structural basis for allosteric cross-talk between the asymmetric nucleotide binding sites of a heterodimeric ABC exporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 11025-11030.
  91. Kodan A, Yamaguchi T, Nakatsu T, Sakiyama K, Hipolito CJ, Fujioka A, Hirokane R, Ikeguchi K, Watanabe B, Hiratake J, Kimura Y, Suga H, Ueda K, Kato H. (2014) Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 4049-4054.
  92. Li J, Jaimes KF, Aller SG. (2014) Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci*, 23: 34-46.
  93. Kim J, Wu S, Tomasiak TM, Mergel C, Winter MB, Stiller SB, Robles-Colmanares Y, Stroud RM, Tampe R, Craik CS, Cheng Y. (2015) Subnanometre-resolution electron cryomicroscopy structure of a heterodimeric ABC exporter. *Nature*, 517: 396-400.
  94. He L, Aleksandrov AA, Serohijos AW, Hegedus T, Aleksandrov LA, Cui L, Dokholyan NV, Riordan JR. (2008) Multiple membrane-cytoplasmic domain contacts in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mediate regulation of channel gating. *J Biol Chem*, 283: 26383-26390.

95. Serohijos AW, Hegedus T, Aleksandrov AA, He L, Cui L, Dokholyan NV, Riordan JR. (2008) 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*, 105: 3256-3261.
96. Jardetzky O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature*, 211: 969-970.
97. Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B. (2006) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett*, 580: 1023-1035.
98. Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP. (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 17: 412-418.
99. Mishra S, Verhalen B, Stein RA, Wen PC, Tajkhorshid E, McHaourab HS. (2014) Conformational dynamics of the nucleotide binding domains and the power stroke of a heterodimeric ABC transporter. *Elife*, 3: e02740.
100. Gadsby DC. (2009) Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 344-352.
101. Urbatsch IL, al-Shawi MK, Senior AE. (1994) Characterization of the ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Biochemistry*, 33: 7069-7076.
102. Galian C, Manon F, Dezi M, Torres C, Ebel C, Levy D, Jault JM. (2011) Optimized purification of a heterodimeric ABC transporter in a highly stable form amenable to 2-D crystallization. *PLoS One*, 6: e19677.
103. Gorbulev S, Abele R, Tampe R. (2001) Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3732-3737.
104. Jordan IK, Kota KC, Cui G, Thompson CH, McCarty NA. (2008) Evolutionary and functional divergence between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and related ATP-binding cassette transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 18865-18870.
105. Miller C. (2010) CFTR: break a pump, make a channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 959-960.



106. Karlin A, Akabas MH. (1998) Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol*, 293: 123-145.
107. Bai Y, Li M, Hwang TC. (2010) Dual roles of the sixth transmembrane segment of the CFTR chloride channel in gating and permeation. *J Gen Physiol*, 136: 293-309.
108. El Hiani Y, Linsdell P. (2010) Changes in accessibility of cytoplasmic substances to the pore associated with activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Biol Chem*, 285: 32126-32140.
109. Qian F, El Hiani Y, Linsdell P. (2011) Functional arrangement of the 12th transmembrane region in the CFTR chloride channel pore based on functional investigation of a cysteine-less CFTR variant. *Pflugers Arch*, 462: 559-571.
110. Wang W, El Hiani Y, Linsdell P. (2011) Alignment of transmembrane regions in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Gen Physiol*, 138: 165-178.
111. Wang W, Linsdell P. (2012) Alternating access to the transmembrane domain of the ATP-binding cassette protein cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7). *J Biol Chem*, 287: 10156-10165.
112. Wang W, Linsdell P. (2012) Conformational change opening the CFTR chloride channel pore coupled to ATP-dependent gating. *Biochim Biophys Acta*, 1818: 851-860.
113. Gao X, Bai Y, Hwang TC. (2013) Cysteine scanning of CFTR's first transmembrane segment reveals its plausible roles in gating and permeation. *Biophys J*, 104: 786-797.
114. Wang W, El Hiani Y, Rubaiy HN, Linsdell P. (2014) Relative contribution of different transmembrane segments to the CFTR chloride channel pore. *Pflugers Arch*, 466: 477-490.
115. Gao X, Hwang TC. (2015) Localizing a gate in CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 2461-2466.

116. Beck EJ, Yang Y, Yaemsiri S, Raghuram V. (2008) Conformational changes in a pore-lining helix coupled to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. *J Biol Chem*, 283: 4957-4966.
117. Fatehi M, Linsdell P. (2008) State-dependent access of anions to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Biol Chem*, 283: 6102-6109.
118. Alexander C, Ivetac A, Liu X, Norimatsu Y, Serrano JR, Landstrom A, Sansom M, Dawson DC. (2009) 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*, 48: 10078-10088.
119. Fatehi M, Linsdell P. (2009) Novel residues lining the CFTR chloride channel pore identified by functional modification of introduced cysteines. *J Membr Biol*, 228: 151-164.
120. Zhou JJ, Li MS, Qi J, Linsdell P. (2010) Regulation of conductance by the number of fixed positive charges in the intracellular vestibule of the CFTR chloride channel pore. *J Gen Physiol*, 135: 229-245.
121. El Hiani Y, Linsdell P. (2014) Metal bridges illuminate transmembrane domain movements during gating of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Biol Chem*, 289: 28149-28159.
122. Gao X, Hwang TC. (2016) Spatial positioning of CFTR's pore-lining residues affirms an asymmetrical contribution of transmembrane segments to the anion permeation pathway. *J Gen Physiol*, 147: 407-422.
123. Aubin CN, Linsdell P. (2006) Positive charges at the intracellular mouth of the pore regulate anion conduction in the CFTR chloride channel. *J Gen Physiol*, 128: 535-545.
124. Smith SS, Liu X, Zhang ZR, Sun F, Kriewall TE, McCarty NA, Dawson DC. (2001) CFTR: covalent and noncovalent modification suggests a role for fixed charges in anion conduction. *J Gen Physiol*, 118: 407-431.

125. Zhou JJ, Fatehi M, Linsdell P. (2008) Identification of positive charges situated at the outer mouth of the CFTR chloride channel pore. *Pflugers Arch*, 457: 351-360.
126. Linsdell P, Evagelidis A, Hanrahan JW. (2000) Molecular determinants of anion selectivity in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *Biophys J*, 78: 2973-2982.
127. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc., New York, 2001: 348-352.
128. Qu Z, Hartzell HC. (2000) Anion permeation in Ca(2+)-activated Cl(-) channels. *J Gen Physiol*, 116: 825-844.
129. Linsdell P, Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW. (1997) Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J Gen Physiol*, 110: 355-364.
130. Linsdell P. (2001) Relationship between anion binding and anion permeability revealed by mutagenesis within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Physiol*, 531: 51-66.
131. Poulsen JH, Fischer H, Illek B, Machen TE. (1994) Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 5340-5344.
132. Linsdell P, Hanrahan JW. (1998) Adenosine triphosphate-dependent asymmetry of anion permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Gen Physiol*, 111: 601-614.
133. Illek B, Tam AW, Fischer H, Machen TE. (1999) Anion selectivity of apical membrane conductance of Calu 3 human airway epithelium. *Pflugers Arch*, 437: 812-822.
134. Smith SS, Steinle ED, Meyerhoff ME, Dawson DC. (1999) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Physical basis for lyotropic anion selectivity patterns. *J Gen Physiol*, 114: 799-818.

135. Ostedgaard LS, Baldursson O, Vermeer DW, Welsh MJ, Robertson AD. (2000) A functional R domain from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is predominantly unstructured in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5657-5662.
136. Sebastian A, Rishishwar L, Wang J, Bernard KF, Conley AB, McCarty NA, Jordan IK. (2013) Origin and evolution of the cystic fibrosis transmembrane regulator protein R domain. *Gene*, 523: 137-146.
137. Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. (1991) Phosphorylation-regulated Cl<sup>-</sup> channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature*, 352: 628-631.
138. Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR. (1992) Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*, 68: 809-818.
139. Nagel G, Hwang TC, Nastiuk KL, Nairn AC, Gadsby DC. (1992) The protein kinase A-regulated cardiac Cl<sup>-</sup> channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature*, 360: 81-84.
140. Csanady L, Chan KW, Seto-Young D, Kopsco DC, Nairn AC, Gadsby DC. (2000) Severed channels probe regulation of gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by its cytoplasmic domains. *J Gen Physiol*, 116: 477-500.
141. Csanady L, Chan KW, Nairn AC, Gadsby DC. (2005) Functional roles of nonconserved structural segments in CFTR's NH<sub>2</sub>-terminal nucleotide binding domain. *J Gen Physiol*, 125: 43-55.
142. Csanady L, Seto-Young D, Chan KW, Cenciarelli C, Angel BB, Qin J, McLachlin DT, Krutchinsky AN, Chait BT, Nairn AC, Gadsby DC. (2005) Preferential phosphorylation of R-domain Serine 768 dampens activation of CFTR channels by PKA. *J Gen Physiol*, 125: 171-186.
143. Picciotto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greengard P, Nairn AC. (1992) Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 267: 12742-12752.

144. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. (1991) Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, 66: 1027-1036.
145. Chang XB, Tabcharani JA, Hou YX, Jensen TJ, Kartner N, Alon N, Hanrahan JW, Riordan JR. (1993) Protein kinase A (PKA) still activates CFTR chloride channel after mutagenesis of all 10 PKA consensus phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 268: 11304-11311.
146. Rich DP, Berger HA, Cheng SH, Travis SM, Saxena M, Smith AE, Welsh MJ. (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by negative charge in the R domain. *J Biol Chem*, 268: 20259-20267.
147. Dulhanty AM, Riordan JR. (1994) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase causes a conformational change in the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry*, 33: 4072-4079.
148. Baker JM, Hudson RP, Kanelis V, Choy WY, Thibodeau PH, Thomas PJ, Forman-Kay JD. (2007) CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat Struct Mol Biol*, 14: 738-745.
149. Berger HA, Travis SM, Welsh MJ. (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem*, 268: 2037-2047.
150. Chappe V, Hinkson DA, Zhu T, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. (2003) Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J Physiol*, 548: 39-52.
151. French PJ, Bijman J, Edixhoven M, Vaandrager AB, Scholte BJ, Lohmann SM, Nairn AC, de Jonge HR. (1995) Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 270: 26626-26631.
152. Hallows KR, Raghuram V, Kemp BE, Witters LA, Foskett JK. (2000) Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J Clin Invest*, 105: 1711-1721.

153. King JD, Jr., Fitch AC, Lee JK, McCane JE, Mak DO, Foskett JK, Hallows KR. (2009) AMP-activated protein kinase phosphorylation of the R domain inhibits PKA stimulation of CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297: C94-101.
154. Kongsuphol P, Cassidy D, Hieke B, Treharne KJ, Schreiber R, Mehta A, Kunzelmann K. (2009) Mechanistic insight into control of CFTR by AMPK. *J Biol Chem*, 284: 5645-5653.
155. Kunzelmann K, Mehta A. (2013) CFTR: a hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca<sup>2+</sup>. *Febs J*, 280: 4417-4429.
156. Gadsby DC, Nairn AC. (1999) Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev*, 79: S77-s107.
157. Hwang TC, Nagel G, Nairn AC, Gadsby DC. (1994) Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 4698-4702.
158. Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC. (2003) On the mechanism of MgATP-dependent gating of CFTR Cl<sup>-</sup> channels. *J Gen Physiol*, 121: 17-36.
159. Csanady L, Vergani P, Gadsby DC. (2010) Strict coupling between CFTR's catalytic cycle and gating of its Cl<sup>-</sup> ion pore revealed by distributions of open channel burst durations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 1241-1246.
160. Aleksandrov AA, Chang X, Aleksandrov L, Riordan JR. (2000) The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol*, 528 Pt 2: 259-265.
161. Wilkinson DJ, Strong TV, Mansoura MK, Wood DL, Smith SS, Collins FS, Dawson DC. (1997) CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Am J Physiol*, 273: L127-133.
162. Ma J, Tasch JE, Tao T, Zhao J, Xie J, Drumm ML, Davis PB. (1996) Phosphorylation-dependent block of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel by exogenous R domain protein. *J Biol Chem*, 271: 7351-7356.

163. Chappe V, Irvine T, Liao J, Evagelidis A, Hanrahan JW. (2005) Phosphorylation of CFTR by PKA promotes binding of the regulatory domain. *Embo J*, 24: 2730-2740.
164. Rich DP, Gregory RJ, Anderson MP, Manavalan P, Smith AE, Welsh MJ. (1991) Effect of deleting the R domain on CFTR-generated chloride channels. *Science*, 253: 205-207.
165. Ma J, Zhao J, Drumm ML, Xie J, Davis PB. (1997) Function of the R domain in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J Biol Chem*, 272: 28133-28141.
166. Winter MC, Welsh MJ. (1997) Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. *Nature*, 389: 294-296.
167. Li C, Ramjeesingh M, Wang W, Garami E, Hewryk M, Lee D, Rommens JM, Galley K, Bear CE. (1996) ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 271: 28463-28468.
168. Travis SM, Carson MR, Ries DR, Welsh MJ. (1993) Interaction of nucleotides with membrane-associated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 268: 15336-15339.
169. Zhang L, Aleksandrov LA, Zhao Z, Birtley JR, Riordan JR, Ford RC. (2009) Architecture of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein and structural changes associated with phosphorylation and nucleotide binding. *J Struct Biol*, 167: 242-251.
170. Bozoky Z, Krzeminski M, Muhandiram R, Birtley JR, Al-Zahrani A, Thomas PJ, Frizzell RA, Ford RC, Forman-Kay JD. (2013) Regulatory R region of the CFTR chloride channel is a dynamic integrator of phospho-dependent intra- and intermolecular interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E4427-4436.
171. Gunderson KL, Kopito RR. (1994) Effects of pyrophosphate and nucleotide analogs suggest a role for ATP hydrolysis in cystic fibrosis transmembrane regulator channel gating. *J Biol Chem*, 269: 19349-19353.
172. Venglarik CJ, Schultz BD, Frizzell RA, Bridges RJ. (1994) ATP alters current fluctuations of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: evidence for a three-state activation mechanism. *J Gen Physiol*, 104: 123-146.

173. Winter MC, Sheppard DN, Carson MR, Welsh MJ. (1994) Effect of ATP concentration on CFTR Cl<sup>-</sup> channels: a kinetic analysis of channel regulation. *Biophys J*, 66: 1398-1403.
174. Bompadre SG, Cho JH, Wang X, Zou X, Sohma Y, Li M, Hwang TC. (2005) CFTR gating II: Effects of nucleotide binding on the stability of open states. *J Gen Physiol*, 125: 377-394.
175. Szollosi A, Vergani P, Csanady L. (2010) Involvement of F1296 and N1303 of CFTR in induced-fit conformational change in response to ATP binding at NBD2. *J Gen Physiol*, 136: 407-423.
176. Urbatsch IL, Sankaran B, Bhagat S, Senior AE. (1995) Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active. *J Biol Chem*, 270: 26956-26961.
177. Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L. (2004) The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem Rev*, 104: 849-902.
178. Chabre M. (1990) Aluminofluoride and beryllorfluoride complexes: a new phosphate analogs in enzymology. *Trends Biochem Sci*, 15: 6-10.
179. Baukowitz T, Hwang TC, Nairn AC, Gadsby DC. (1994) Coupling of CFTR Cl<sup>-</sup> channel gating to an ATP hydrolysis cycle. *Neuron*, 12: 473-482.
180. Carson MR, Travis SM, Welsh MJ. (1995) The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem*, 270: 1711-1717.
181. Tsai MF, Shimizu H, Sohma Y, Li M, Hwang TC. (2009) State-dependent modulation of CFTR gating by pyrophosphate. *J Gen Physiol*, 133: 405-419.
182. Jih KY, Sohma Y, Li M, Hwang TC. (2012) Identification of a novel post-hydrolytic state in CFTR gating. *J Gen Physiol*, 139: 359-370.
183. Szabo K, Szakacs G, Hegeds T, Sarkadi B. (1999) Nucleotide occlusion in the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Different patterns in the two nucleotide binding domains. *J Biol Chem*, 274: 12209-12212.



184. Aleksandrov L, Mengos A, Chang X, Aleksandrov A, Riordan JR. (2001) Differential interactions of nucleotides at the two nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 276: 12918-12923.
185. Urbatsch IL, Beaudet L, Carrier I, Gros P. (1998) Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry*, 37: 4592-4602.
186. Ramjeesingh M, Li C, Garami E, Huan LJ, Galley K, Wang Y, Bear CE. (1999) Walker mutations reveal loose relationship between catalytic and channel-gating activities of purified CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). *Biochemistry*, 38: 1463-1468.
187. Hrycyna CA, Ramachandra M, Germann UA, Cheng PW, Pastan I, Gottesman MM. (1999) Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry*, 38: 13887-13899.
188. Rai V, Gaur M, Shukla S, Shukla S, Ambudkar SV, Komath SS, Prasad R. (2006) Conserved Asp327 of walker B motif in the N-terminal nucleotide binding domain (NBD-1) of Cdr1p of *Candida albicans* has acquired a new role in ATP hydrolysis. *Biochemistry*, 45: 14726-14739.
189. Tomblin G, Bartholomew LA, Urbatsch IL, Senior AE. (2004) Combined mutation of catalytic glutamate residues in the two nucleotide binding domains of P-glycoprotein generates a conformation that binds ATP and ADP tightly. *J Biol Chem*, 279: 31212-31220.
190. Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC. (2005) CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature*, 433: 876-880.
191. Chaves LA, Gadsby DC. (2015) Cysteine accessibility probes timing and extent of NBD separation along the dimer interface in gating CFTR channels. *J Gen Physiol*, 145: 261-283.

192. Mense M, Vergani P, White DM, Altberg G, Nairn AC, Gadsby DC. (2006) In vivo phosphorylation of CFTR promotes formation of a nucleotide-binding domain heterodimer. *Embo J*, 25: 4728-4739.
193. Csanady L, Nairn AC, Gadsby DC. (2006) Thermodynamics of CFTR channel gating: a spreading conformational change initiates an irreversible gating cycle. *J Gen Physiol*, 128: 523-533.
194. Zhou Y, Pearson JE, Auerbach A. (2005) Phi-value analysis of a linear, sequential reaction mechanism: theory and application to ion channel gating. *Biophys J*, 89: 3680-3685.
195. Auerbach A. (2007) How to turn the reaction coordinate into time. *J Gen Physiol*, 130: 543-546.
196. Csanady L. (2009) Application of rate-equilibrium free energy relationship analysis to nonequilibrium ion channel gating mechanisms. *J Gen Physiol*, 134: 129-136.
197. Sorum B, Czege D, Csanady L. (2015) Timing of CFTR pore opening and structure of its transition state. *Cell*, 163: 724-733.
198. Gunderson KL, Kopito RR. (1995) Conformational states of CFTR associated with channel gating: the role ATP binding and hydrolysis. *Cell*, 82: 231-239.
199. Ishihara H, Welsh MJ. (1997) Block by MOPS reveals a conformation change in the CFTR pore produced by ATP hydrolysis. *Am J Physiol*, 273: C1278-1289.
200. Colquhoun D, Sigworth FJ. Fitting and statistical analysis of single-channel records. In: Sakmann B, Neher E.(szerk.), *Single Channel Recording*. Plenum Press, New York, 1995: 483-587
201. Csanady L. (2006) Statistical evaluation of ion-channel gating models based on distributions of log-likelihood ratios. *Biophys J*, 90: 3523-3545.
202. Aleksandrov AA, Riordan JR. (1998) Regulation of CFTR ion channel gating by MgATP. *FEBS Lett*, 431: 97-101.
203. Aleksandrov AA, Cui L, Riordan JR. (2009) Relationship between nucleotide binding and ion channel gating in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Physiol*, 587: 2875-2886.

204. Jih KY, Hwang TC. (2013) Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 4404-4409.
205. Jih KY, Sohma Y, Hwang TC. (2012) Nonintegral stoichiometry in CFTR gating revealed by a pore-lining mutation. *J Gen Physiol*, 140: 347-359.
206. Tsai MF, Li M, Hwang TC. (2010) Stable ATP binding mediated by a partial NBD dimer of the CFTR chloride channel. *J Gen Physiol*, 135: 399-414.
207. Szollosi A, Muallem DR, Csanady L, Vergani P. (2011) Mutant cycles at CFTR's non-canonical ATP-binding site support little interface separation during gating. *J Gen Physiol*, 137: 549-562.
208. Kirk KL, Wang W. (2011) A unified view of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gating: combining the allostereism of a ligand-gated channel with the enzymatic activity of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem*, 286: 12813-12819.
209. Jih KY, Hwang TC. (2012) Nonequilibrium gating of CFTR on an equilibrium theme. *Physiology (Bethesda)*, 27: 351-361.
210. Bompadre SG, Sohma Y, Li M, Hwang TC. (2007) G551D and G1349D, two CF-associated mutations in the signature sequences of CFTR, exhibit distinct gating defects. *J Gen Physiol*, 129: 285-298.
211. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevinek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordonez C, Elborn JS. (2011) A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*, 365: 1663-1672.
212. Char JE, Wolfe MH, Cho HJ, Park IH, Jeong JH, Frisbee E, Dunn C, Davies Z, Milla C, Moss RB, Thomas EA, Wine JJ. (2014) A little CFTR goes a long way: CFTR-dependent sweat secretion from G551D and R117H-5T cystic fibrosis subjects taking ivacaftor. *PLoS One*, 9: e88564.

213. Van Goor F, Yu H, Burton B, Hoffman BJ. (2014) Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. *J Cyst Fibros*, 13: 29-36.
214. Lin WY, Jih KY, Hwang TC. (2014) A single amino acid substitution in CFTR converts ATP to an inhibitory ligand. *J Gen Physiol*, 144: 311-320.
215. Wang W, Wu J, Bernard K, Li G, Wang G, Bevenssee MO, Kirk KL. (2010) ATP-independent CFTR channel gating and allosteric modulation by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 3888-3893.
216. Wei S, Roessler BC, Chauvet S, Guo J, Hartman JLt, Kirk KL. (2014) Conserved allosteric hot spots in the transmembrane domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channels and multidrug resistance protein (MRP) pumps. *J Biol Chem*, 289: 19942-19957.
217. Chan KW, Csanady L, Seto-Young D, Nairn AC, Gadsby DC. (2000) Severed molecules functionally define the boundaries of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's NH(2)-terminal nucleotide binding domain. *J Gen Physiol*, 116: 163-180.
218. Cai Z, Scott-Ward TS, Sheppard DN. (2003) Voltage-dependent gating of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel. *J Gen Physiol*, 122: 605-620.
219. Jackson MB, Wong BS, Morris CE, Lecar H, Christian CN. (1983) Successive openings of the same acetylcholine receptor channel are correlated in open time. *Biophys J*, 42: 109-114.
220. Horovitz A. (1996) Double-mutant cycles: a powerful tool for analyzing protein structure and function. *Fold Des*, 1: R121-126.
221. Zhou Z, Wang X, Li M, Sohma Y, Zou X, Hwang TC. (2005) High affinity ATP/ADP analogues as new tools for studying CFTR gating. *J Physiol*, 569: 447-457.
222. Okeyo G, Wang W, Wei S, Kirk KL. (2013) Converting nonhydrolyzable nucleotides to strong cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) agonists by gain of function (GOF) mutations. *J Biol Chem*, 288: 17122-17133.

223. Wang W, Bernard K, Li G, Kirk KL. (2007) Curcumin opens cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by a novel mechanism that requires neither ATP binding nor dimerization of the nucleotide-binding domains. *J Biol Chem*, 282: 4533-4544.
224. Grosman C, Auerbach A. (2001) The dissociation of acetylcholine from open nicotinic receptor channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 14102-14107.
225. Wei S, Roessler BC, Icyuz M, Chauvet S, Tao B, Hartman JLt, Kirk KL. (2016) Long-range coupling between the extracellular gates and the intracellular ATP binding domains of multidrug resistance protein pumps and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels. *Faseb J*, 30: 1247-1262.
226. Wang W, Roessler BC, Kirk KL. (2014) An electrostatic interaction at the tetrahelix bundle promotes phosphorylation-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel opening. *J Biol Chem*, 289: 30364-30378.
227. Zhou Z, Wang X, Liu HY, Zou X, Li M, Hwang TC. (2006) The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J Gen Physiol*, 128: 413-422.
228. Bompadre SG, Li M, Hwang TC. (2008) Mechanism of G551D-CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) potentiation by a high affinity ATP analog. *J Biol Chem*, 283: 5364-5369.
229. Zeltwanger S, Wang F, Wang GT, Gillis KD, Hwang TC. (1999) Gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by adenosine triphosphate hydrolysis. Quantitative analysis of a cyclic gating scheme. *J Gen Physiol*, 113: 541-554.

## 10 Saját publikációk jegyzéke

### 10.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Csanády L, **Mihályi C**, Szollosi A, Töröcsik B, Vergani P. (2013) Conformational changes in the catalytically inactive nucleotide-binding site of CFTR. *J Gen Physiol.* 142: 61-73.

IF: 4.570

**Mihályi C**, Torocsik B, Csanády L. (2016) Obligate coupling of CFTR pore opening to tight nucleotide-binding domain dimerization. *Elife* 5. pii:e18164.

IF(2015): 8.282

### 10.2 Egyéb közlemények

Iordanov I, **Mihályi C**, Tóth B, Csanády L. (2016) The proposed channel-enzyme transient receptor potential melastatin 2 does not possess ADP ribose hydrolase activity. *Elife* 5. pii:e17600.

IF(2015): 8.282

## 11 Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani Csörgő Terézia és Dr. Wirthné Kalmár Eleonóra tanárnők lelkiismeretes pedagógiai munkájáért, és hogy a gimnáziumi éveim alatt felkeltették a természettudományos tárgyak iránti érdeklődésemet.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Csanády Lászlónak szakmai irányításáért, és amiért nem csak kutatói, de emberi mintát is állított elém.

Köszönöm Prof. Ádám Veronikának és Prof. Tretter Lászlónak, az Orvosi Biokémiai Intézet korábbi és jelenlegi igazgatóinak, hogy munkámat tanszékükön lehetővé tették és támogatták.

Szeretnék külön köszönetet mondani Dr. Törőcsik Beátának, amiért megismertetett az alapvető molekuláris biológiai technikákkal. Továbbá köszönöm társszerzőimnek: Dr. Tóth Balázsnak, Dr. Jordan Jordanov-nak, Dr. Szöllősi Andrásnak és Dr. Paola Vergani-nak, hogy munkájukkal hozzájárultak a doktori fokozat megszerzéséhez szükséges publikációk megszületéséhez.

Végül, de nem utolsósorban, hálával tartozom szüleimnek, amiért nyugodt, kiegyensúlyozott családi háttérrel biztosítottak, és mindig támogattak a céljaim megvalósításában.

## Ábrajegyzék

<b>1. ábra:</b> A CFTR topológiai felépítése .....	9
<b>2. ábra:</b> Humán CFTR NBD szekvenciáinak összehasonlítása.....	10
<b>3. ábra:</b> CFTR NBD1-NBD2 heterodimerjének szerkezeti modellje.....	11
<b>4. ábra:</b> ABC transzporterek szerkezete és működése .....	14
<b>5. ábra:</b> A CFTR pórust alkotó TM $\alpha$ -hélixek pozícióinak elérhetősége intra- és extracellulárisan alkalmazott MTS reagensekkel. ....	16
<b>6. ábra:</b> A SCAM kísérletek eredményeinek összefoglalása bakteriális ABC transzporter szerkezetek alapján épített humán CFTR homológiamodellek TMD-in.....	17
<b>7. ábra:</b> WT CFTR csatornák burst eloszlása igazolja a ciklikus kapuzási sémát [159] ..	26
<b>8. ábra:</b> A P355A-K978C mutáció egyaránt fokozza a spontán és ATP-függő nyitvatartási valószínűséget.....	38
<b>9. ábra:</b> A kádoldat klorid ionjainak glükonáttal történő helyettesítése -80 mV-on megszünteti a CFTR áramot.....	39
<b>10. ábra:</b> A háttér mutációk magas ATP-függő nyitvatartási valószínűséget eredményeznek.....	40
<b>11. ábra:</b> A CFTR spontán megnyílásakor az 555-ös arginin és a 1246-os treonin oldalláncok energetikai kapcsoltágba kerülnek .....	41
<b>12. ábra:</b> A P-ATP nagy affinitású, hatékony ATP analóg .....	45
<b>13. ábra:</b> A H1348A CFTR steady-state burst időtartama nem nyúlik meg magasabb ATP koncentráció mellett .....	46
<b>14. ábra:</b> A P-ATP és a H1348A mutáció csökkentik a CFTR nem-hidrolitikus záródási sebességét .....	47
<b>15. ábra:</b> A H1348A mutáció és a 415-432 szakasz deléciója ( $\Delta$ RI) megszünteti a P-ATP feniletil csoportjának hatását a CFTR hidrolitikus záródási sebességére.....	49
<b>16. ábra:</b> A H1348A mutáció és a 415-432 szakasz deléciója ( $\Delta$ RI) fokozza a P-ATP feniletil csoportjának hatását a CFTR nem-hidrolitikus záródási sebességére.....	51



<b>17. ábra:</b> WT, H1348A és $\Delta$ RI CFTR nukleotid elvonást követő makroszkópos áramlecsengéseiből nyert záródási sebességek összehasonlítása a mikroszkópikus steady-state záródási sebességekkel.....	54
<b>18. ábra:</b> A P-ATP-ben kapuzó WT CFTR csatornák átlagos vezetőképessége alacsonyabb, mint az ATP-ben kapuzóké .....	55
<b>19. ábra:</b> A P-ATP és a H1348A mutáció egyaránt lassítja a CFTR $O_1 \rightarrow O_2$ átmenetét.....	56
<b>20. ábra:</b> A CFTR spontán pórusnyitásainak mechanizmusa és a funkcionyeréssel járó mutációk, illetve az ATP-kötés kapuzási energetikára gyakorolt hatásai .....	60
<b>21. ábra:</b> A P-ATP és a H1348A mutáció CFTR kapuzási energetikájára gyakorolt hatásainak szemléltetése .....	65
<b>22. ábra:</b> A TM287/288 aszimmetrikus bakteriális ABC transzporter kristályszerkezetében a degenerált ATP-kötőhely két oldala részlegesen disszociált ...	68