

A nukleotidkötő domének kölcsönhatásainak szerepe a CFTR ioncsatorna kapuzásában

Doktori tézisek

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

Bevezetés

A cisztás fibrózis (CF) hátterében az adenzin-trifoszfát (ATP)-kötő kazetta (ABC, ATP-binding cassette) fehérjék aszimmetrikus C alosaládjába tartozó cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) ioncsatorna funkcióvesztéssel járó mutációi állnak. Az ABC fehérjék többnyire aktív transzporterek, amelyek változatos szerkezetű molekulák biológiai membránokon keresztüli transzportját végzik. A szubsztráttranszlokációs útvonalat a két transzmembrán domén (TMD) alkotja, amelyek a befele és kifelé néző konformációik között váltakoznak. E konformációváltásokat a nukleotidkötő doménekben (NBD) zajló ATP hasítási ciklus hajtja. Az ABC fehérjék NBD-i három erősen konzervált szekvenciát tartalmaznak: a Walker A (GXXXXGKS/T, ahol X bármilyen aminosav) és B ($\Phi\Phi\Phi\Phi$ DE, ahol Φ bármely hidrofób aminosav) valamint az ABC signature motívumot (LSGGQR/K). A hidrolitikus ciklusok során a Walker szekvenciák ATP-t kötnek, majd a két NBD dimert alkot, amely két kompozit ATP kötőhelyet fog közre. E kötőhelyeket az egyik NBD Walker szekvenciái és a másik NBD signature szekvenciája alkotják. A kötött ATP hidrolízisét követően a dimer disszociál és a nukleotid kicserélődik, lehetővé téve egy újabb ciklus megkezdését.

Az ABC-C alcsalád tagjaira is ez az alapvető doménszerkezet jellemző, de a két NBD szekvenciája jellemzően eltér egymástól. Az N-terminális NBD (NBD1) Walker B és más konzervált szekvenciáiban, valamint a C-terminális NBD (NBD2) signature szekvenciájában található nem kanonikus szubsztitúciók következtében, az ezen motívumok által alkotott kompozit kötőhely (1-es kötőhely) hidrolitikusan inaktív. Ezért az ABC-C fehérjék csupán egyetlen katalitikusan aktív kötőhellyel (2-es kötőhely) rendelkeznek, amelyet az NBD2 Walker motívumai és az NBD1 signature szekvenciája alkotnak.

A CFTR az ABC-C alcsalád egyetlen tagja, amelynek TMD-i Cl⁻ csatorna pórust képeznek. A kanonikus domének mellett a CFTR tartalmaz egy egyedi regulációs (R) domént is, amelyet a cAMP-dependens protein kináz (PKA) foszforilál – ez a csatorna kapuzásának előfeltétele. A foszforilált CFTR csatorna pórusát az ATP kötését követő NBD dimerizáció nyitja meg, és e dimernek a 2-es kötőhelyen kötött ATP hidrolízisét követő szétesése zárja be. Az NBD/TMD mozgások szoros kapcsoltságának megfelelően az NBD2 Walker A treonin (T1246) és az NBD1 signature szekvenciától C-terminálisan elhelyezkedő arginin (R555) oldalláncai között a pórus nyitott állapotában hidrogén kötés alakul ki, ami zárt csatornában nem figyelhető meg. Ez a hidrogén kötésben érintett két aminosav közös evolúciós nyomás alatt fejlődött, és az ATP-t kötött NBD dimer

kristályszerkezetekben hidrogén híd kapcsolja össze őket, amelyekben az arginin hidrogén donorként, míg a szerin vagy treonin hidrogén akceptorként szolgál. A donor és akceptor atomok optimális távolságának megzavarása – akár a donor oldallánc rövidítése (R555K) akár az akceptor oldallánc meghosszabbítása (T1246N) révén – megakadályozza a stabilizáló hidrogén híd kialakulását, míg az R555K-T1246N dupla mutáció helyreállítja ezt a lehetőséget.

A vad-típusú (WT, wild-type) csatornában minden kapuzási ciklus egy ATP molekula hidrolíziséhez kapcsolt. 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 (ciklikus kapuzási séma). Ezzel ellentétben, a katalitikusan inaktív 1-es kötőhely több kapuzási cikluson keresztül is kötve tartja az ATP-t, anélkül hogy elhidrolizálná azt. A nagy affinitású ATP analóg N^6 -(2-fenilettil)-ATP (P-ATP) gyorsítja a nyitási és lassítja a záródási sebességet. A nyitási sebességre gyakorolt hatás a vegyület alkalmazásakor azonnal jelentkezik, ezért feltételezhető, hogy azt a 2-es kötőhelyhez kötődő P-ATP okozza. Ezzel szemben, a záródási sebesség lassulása csak 30-50 s-os késéssel jelenik meg, ami megfelel a degenerált 1-es kötőhelyben történő lassabb ATP/P-ATP kicserélődésnek. Továbbá, mivel az 1-es kötőhelyben a nukleotid kicserélődésének sebességét az NBD2 signature szekvenciáinak mutációi is befolyásolják, és e

szekvencia csak a dimerizált szerkezetben vesz részt az 1-es kötőhely képzésében, feltételezhető, hogy az NBD dimer a csatorna zárt állapotában is csak részlegesen nyílik fel, olyan módon, hogy az 1-es kötőhely körül mindvégig zárva marad – legalábbis számos kapuzási cikluson keresztül. Ezen feltételezést az 1-es kötőhely szemközti oldalain lévő aminosav oldalláncok közötti energetikai kapcsoltság termodinamikai vizsgálata is megerősítette: a megfigyelt kapcsoltsági mintázat alapján az 1-es kötőhely számos kapuzási cikluson keresztül intakt, zárt állapotban marad. Ugyanakkor a degenerált kötőhely valamiképpen mégis szerepet kell hogy játszon a kapuzás energetikájában, tekintettel arra, hogy különféle 1-es kötőhely perturbációk (K464A mutáció az NBD1-ben, H1348A mutáció az NBD2-ben, vagy P-ATP kötődése ATP helyett) jelentős hatással vannak a kapuzás kinetikájára.

A WT CFTR csatornák az ATP-vezérelt kapuzási ciklus mellett rendkívül ritkán ATP hiányában is megnyílnak, de ezidáig nem tisztázott, hogy a csatorna spontán megnyílása az NBD-k dimerizációjához kapcsolt vagy attól független folyamat. A kérdés jelentősége túlmutat a spontán nyitások elenyésző gyakorisága alapján vártnál. Az NBD-k és a TMD-k kapcsoltságának szorossága a mai napig vitatott, jelentős kérdés, amelynek megértése kulcsfontosságú az ABC fehérjék ATP-függő konformációváltási ciklusát meghatározó erők megértésében. Továbbá, a G551D mutációt

hordozó betegek csatornáinak a spontán aktivitás a kizárólagos kapuzási módja, és a mai napig az egyetlen CF-es betegek klinikai kezelésére engedélyezett CFTR potenciátor, az ivacaftor, ezen mechanizmus fokozásán keresztül fejt ki hatását.

A spontán kapuzás vizsgálatát eddig korlátozta annak elenyészően alacsony nyitvatartási valószínűsége (P_o), 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) jelentős mértékben növelik a csatornák spontán aktivitását. Továbbá, ezen funkciónyeréssel járó mutációk hatásai additívnek bizonyultak a dupla mutáns P355A-K978C csatornában, alkalmassá téve azt a spontán aktivitás kvantitatív biofizikai elemzésére.

Célkitűzések

A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata

A WT CFTR csatornák, az ATP-vezérelt kapuzási ciklus mellett, rendkívül ritkán ATP hiányában is megnyílnak. Azonban az ennek hátterében álló molekuláris mechanizmus ismeretlen. Kísérleteink elsődleges célja volt meghatározni, hogy ezen spontán megnyílások, az ATP-függő aktivitáshoz hasonlóan, az NBD-k dimerizációjához kapcsolnak, vagy attól független események.

A degenerált ATP kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltásainak vizsgálata

Annak ellenére, hogy az 1-es ATP kötőhely érintkezési felszínei feltételezhetően számos kapuzási cikluson keresztül zárva maradnak, e kötőhely valamiképpen mégis szerepet kell hogy játszon a kapuzás energetikájában, mert perturbációi jelentős mértékben befolyásolják azt. Az NBD2 signature szekvenciájában elhelyezett H1348A mutációnak, és a kötőhelybe zárt ligand szerkezeti perturbációjának (P-ATP, ATP helyett) záródást lassító mechanizmusai ismeretlenek. Célunk volt, hogy betekintést nyerjünk e két utóbbi perturbációnak a csatorna energetikájára kifejtett hatásaiba, és ezeken keresztül következtethessünk arra, mely kapuzási lépések járnak együtt az 1-es kötőhely mozgásaival.

Módszerek

Molekuláris biológia

A humán WT CFTR-t pGEMHE bakteriális vektorba klónoztuk. A szükséges pontmutációkat a Stratagene QuikChange kittel, a forgalmazói előírásokat követve hoztuk létre. Az elkészített konstruktok genetikai kódját teljes szekvenálással (LGC Genomics) ellenőriztük. A cRNS-t in vitro transzkripcióval (T7 polimeráz (Applied Biosystems)) állítottuk elő.

Xenopus laevis petesejtek preparálása és injektálása

A petesejteket Dél-Afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) petefészek-lebenyéből kollagenázos emésztéssel izoláltuk. Az egyedicsatornás 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.

Izolált membrános inside-out patch clamp mérések

A mérésekhez használt pipetta oldat 136 mM N-metil-D-glukamin (NMDG) kloridot, 2 mM MgCl₂-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 kádoldatba merítettük. A kádoldat 134 mM NMDG-Cl-t, 2 mM

MgCl₂-t, 5 mM HEPES-t és 0.5 mM EGTA-t (pH NMDG-vel 7.1-re beállítva) tartalmazott. A K978C mutációt hordozó csatornák esetén, a cisztein oxidációját megelőzendő, a kádoldatot további 3 mM ditioneitróllal egészítettük ki. A MgATP-t (Sigma-Aldrich) és a P-ATP Na⁺ sóját (Biolog LSI) 2 mM-os, ill. 10 μM-os (a K1250A csatornák esetében 10 mM-os, ill. 50 μM-os) végkoncentrációkban alkalmaztuk. A mérések megkezdésekor a CFTR csatornákat a citoszolikus felszínen alkalmazott 300 nM PKA katalitikus alegység (Sigma-Aldrich) egy-két perces alkalmazásával foszforiláltuk. A kináz elvonását követően a csatornák részlegesen defoszforilálódnak, és ez az állapot ezután több tíz percen keresztül stabil marad. Számítógép-vezérelt szelepek (Heka) segítségével a kádoldat összetételét 20-50 ms-os időállanóval tudtuk megváltoztatni. Méréseinket 25 °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, a makroszkópos áramokat -20 és -80 mV közötti membránpotenciálokon mértük.

Steady-state mikroszkópikus mérések kinetikai elemzése

A nyitott (burst) és zárt (interburst) események átlagos időtartamainak meghatározása az 1-7 párhuzamosan nyitott csatornát

tartalmazó membránfoltok steady-state szakaszaiból történtek. A kapott eseménylisták illesztésére használt modellben az ATP-függő lassú kapuzást zárt-nyitott állapotokként (burst és interburst), míg az ATP-független rövid záródásokat pórus blokkként értelmeztük. A kapuzási kinetikai paramétereket (r_{CO} , r_{OC} , r_{OB} , és r_{BO}) az egyes vezetési szintekhez tartozó események időtartameloszlásainak a zárt-nyitott-blokkolt ($C \leftrightarrow O \leftrightarrow B$) kapuzási sémával történő maximum likelihood illesztésével határoztuk meg a szűrő holtidejének figyelembe vételével. Az átlagos burst, illetve interburst hosszakat az $(1/r_{OC})(1 + r_{OB}/r_{BO})$, illetve $1/r_{CO}$ összefüggések alapján határoztuk meg.

Egyedi-csatornás mérések burst időtartam eloszlásainak elemzése

Az egyedi burst-ök időtartamait az egyetlen aktív csatornát tartalmazó áramregisztrátumokból származó eseménylistákban a küszöb értéknél ("cutoff") rövidebb zárt események kitörlésével állítottuk elő. Az ilyen módszerrel elkülönített burst-ök időtartam eloszlásait egyszerű exponenciális eloszlással, illetve a $C_1 \rightarrow O_1 \rightarrow O_2 \rightarrow C_2$ ciklikus modellel illesztettük, maximum likelihood módszerrel. A második változó bevezetésének az illesztés pontosságára gyakorolt hatását a log-likelihood ratio teszt segítségével állapítottuk meg.

Makroszkópos áramlecsengések exponenciális illesztése

A makroszkópos záródási sebességet az ilyen áramok nukleotid elvonását követő lecsengési időállandójának inverzeként definiáltuk, és egyszerű exponenciális illesztésével (nem-lineáris legkisebb négyzetek módszere, pClamp10) határoztuk meg.

Termodinamikai mutáns ciklus analízis

A kiválasztott pozíció párok kölcsönhatási energiáiban ($\Delta\Delta G_{\text{int}}$) a kapuzási ciklus során bekövetkező változásokat mutáns ciklus analízis segítségével vizsgáltuk. Egy perturbáció hatásai a kapuzás egyes lépéseit kísérő szabadentalpia változásokra a mutáns ciklus két szomszédos sarkát (i és j) reprezentáló csatornák nyitvatartási valószínűségeiből (P_o), illetve nyitási/záródási sebességi állandóiból (r) számolhatók: $\Delta\Delta G = -RT\ln(P_{oj}/P_{oi})$, illetve $\Delta\Delta G = -RT\ln(r_j/r_i)$. A $\Delta\Delta G_{\text{int}}$ a mutáns ciklus két párhuzamos oldala között mérhető $\Delta\Delta G$ értékek különbségként definiálható. A $\Delta\Delta G$ értékeket átlag \pm standard hiba formában adtuk meg.

Statisztika

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

Eredmények

A spontán pórusnyitások mechanizmusának vizsgálata

Amíg ATP elvonást követően a WT CFTR csatornák gyorsan bezáródnak, addig a P355A-K978C CFTR csatornák esetében az ATP elvonás után hosszú ideig fennálló, jelentős klorid áram marad vissza ($P_{o(WT, \text{eATP})} = 0.000053 \pm 0.000021$ ($n = 5$) vs. $P_{o(P355A-K978C, \text{eATP})} = 0.15 \pm 0.03$ ($n = 21$)). A P355A-K978C CFTR csatornák ezen jelentős spontán aktivitása lehetővé teszi a spontán kapuzás megbízható kvantitatív elemzését néhány aktív csatornát tartalmazó membránfoltokban. Ez a dupla háttérmutációt tartalmazó CFTR csatorna (background, BG) alkalmas modell, amelyben vizsgálható ugyanazon két aminosav oldallánc energetikai kapcsoltságának spontán aktivitással együttjáró változásai, amelyek vizsgálata az ATP-függő kapuzás esetén az NBD/pórus kapcsoltság igazolásához vezetnek. 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 (0.034 ± 0.007 ($n = 18$), illetve 0.044 ± 0.009 ($n = 19$)), amit mindkét mutánsban a célzott aminosav oldallánc és a fehérje többi része között fennálló, a WT csatornában összességében a nyitott állapotot stabilizáló, mikroszkópikus kölcsönhatások megváltozása okoz.

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 lennének 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 hogy 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 ± 0.02 ($n=20$)). Vagyis, mindkét egyedi mutációnak a spontán P_o -ra gyakorolt hatása jelentős mértékben függ a másik pozícióban lévő aminosav kémiai természetétől.

Az ATP hiányában jellemző zárt-nyitott egyensúlyi állandó (K) a spontán P_o -ból számolható. A K értékekre épített termodinamikai mutáns ciklus -2.90 ± 0.49 kT, szignifikáns ($p = 0.0004$) kapcsoltsági energiaváltozást igazolt az R555-ös és T1246-os aminosavak oldalláncai között az ATP-mentes zárt és nyitott állapotok között. Ez az energetikai kapcsoltság a WT csatorna spontán nyitott állapotában megjelenő hidrogén híd kialakulásával magyarázható, amely mindkét szimpla mutánsban hiányzik, de a dupla mutánsban helyreáll. Ezen eredmények szerint az NBD dimer érintkezési felszínei

a 2-es kötőhely körül, ATP jelenlététől függetlenül, szorosra zárulnak a csatorna pórusának megnyílásakor.

A spontán nyitott és zárt állapotok közötti konformációs átmenet során a fehérje egy magas szabadentalpiájú, instabil, rövid élettartamú átmeneti állapotban (T^\ddagger) halad keresztül, amelynek relatív stabilitását az átlagos zárva- (τ_{ib}) és nyitvatartási (τ_b) idők inverzeként meghatározott spontán nyitási, illetve záródási 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 ($\Delta\Delta G_{(T-O)}$) állapotokhoz képest. A kinetikai elemzés eredményei szerint, a mindkét egyedi mutánsnál tapasztalt spontán P_o csökkenést elsősorban a csökkent nyitási sebesség okozza, amely a dupla mutánsban a kontrollhoz közeli értékre áll vissza. Ennek megfelelően az átmeneti állapot zárt alapállapot felőli elérését az R555 és a T1246 aminosav oldalláncok közötti -2.30 ± 0.46 kT 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. 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.

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. Vagyis, a ligandot nem kötő CFTR csatorna NBD dimer érintkezési felületének 2-es ATP kötőhely körüli része már az átmeneti állapotban zárul – hasonlóan ahhoz, ahogy az az ATP-t kötött csatorna megnyílásakor is történik.

A degenerált ATP kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltásainak vizsgálata

A kinetikai elemzés eredménye alapján a CFTR csatorna nyitvatartási valószínűsége magasabb P-ATP-ben mint ATP-ben, amit az interburst időtartamok kisebb mértékű rövidülése mellett elsősorban a burst időtartamok kétszeresére nyúlása okoz. Az utóbbi hatásról ismert, hogy azt az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP okozza. Az NBD2 signature szekvenciájának H1348A mutációja kb. háromszorosára nyújtja a 2 mM ATP-ben kapuzó CFTR csatorna átlagos burst időtartamát. Annak érdekében, hogy ezen 1-es kötőhely perturbációknak a csatorna záródási mechanizmusára kifejtett hatásait kvantitatív módon összehasonlíthassuk, vizsgáltuk azok nem-hidrolitikus és hidrolitikus záródási sebességekre gyakorolt hatásait.

A nem-hidrolitikus záródási sebsségeket hidrolízisre képtelen csatornák (NBD2 Walker A mutáns K1250A és Walker B mutáns E1371S) makroszkópos áramainak záródási sebességeivel modelleztük. A P-ATP és a H1348A mutáció mindkét hidrolízis-képtelen csatornában markánsan csökkentik az áramlecsengések sebességét a kontroll csatornák ATP elvonást követő relaxációihoz képest. Hidrolitikus körülmények között a burst-ök két szakaszra oszthatók: egy kezdeti, hosszabb időintervallumra, amelynek során a csatorna 2-es kötőhelye ATP-t köt (stabil, prehidrolitikus O_1 állapot), 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). Mivel a nem-hidrolitikus záródási sebesség (k_{-1} , $O_1 \rightarrow C_1$ lépés) igen lassú, 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) határozzák meg. E sebességi állandók megbecsülhetők a burst időtartamok eloszlásának a ciklikus kapuzási modellel történő maximum likelihood illesztésével. Meg kívántuk határozni, 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, majd a burst hosszakat burst analízis segítségével határoztuk meg. Az így nyert burst-hossz eloszlás maximum likelihood illesztésével becsültük a

mikroszkópikus sebességi állandókat. A 10 μ M P-ATP-ben kapuzó WT és a 2 mM ATP-ben kapuzó H1348A 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 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 felére-harmadára csökkent k_1 sebességi állandót adott mind a P-ATP, mind a H1348A mutáció esetében. Ezzel szemben sem a P-ATP, sem a H1348A mutáció nem befolyásolja szignifikánsan a k_2 sebességi állandót. Tehát az 1-es kötőhelyen kötött P-ATP és az NBD2 signature szekvenciájának H1348A mutációja szelektíven stabilizálják a prehidrolitikus nyitott állapotot a nem-hidrolitikus záródási sebesség ($O_1 \rightarrow C_1$) és a hidrolízis sebességének ($O_1 \rightarrow O_2$) lassításával.

Következtetések

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 kapcsolódtak. 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 érik 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.

A degenerált ATP kötőhely kapuzáshoz kapcsolt konformációváltásainak vizsgálata

A H1348A mutáció és az ATP/P-ATP csere csökkentik 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 $k_{C_1 \rightarrow O_1}$ és a k_{-1} sebességi állandókra. Ez egyrészt tovább erősíti azt a következtetést, hogy a csatorna megnyílásakor az 1-es ATP kötőhelyben lokális konformációváltás zajlik, valamint arra is utal, hogy ez a lokális konformációváltás az átmeneti állapotban még nem fejeződött be. Tehát az 1-es kötőhely csak a pórus megnyílásakor éri el végső, nyitott állapotra jellemző lokális konformációját.

Saját publikációk jegyzéke

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

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